

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. H. Van Aken

---

**Inhibition der durch Lysophosphatidylsäure induzierten  
Superoxidanionen- Sekretion in humanen neutrophilen  
Granulozyten durch Lokalanästhetika**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur  
Erlangung des doctor medicinae  
der Medizinischen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Beate Conrad  
aus Gütersloh  
(2003)

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen  
Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. H. Jürgens

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. A. Sielenkämper
2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. H. Becker

Tag der mündlichen Prüfung: 24.10.2003

**Meinen Großeltern**

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin  
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. H. Van Aken -  
Referent: Priv.-Doz. Dr. med. A. Sielenkämper  
Koreferent: Priv.-Doz. Dr. med. H. Becker

## ZUSAMMENFASSUNG

Conrad, Beate

„Inhibition der durch Lysophosphatidylsäure induzierten Superoxidanionen  
Produktion und -Sekretion in humanen neutrophilen Granulozyten durch  
Lokalanästhetika“

Neutrophile Granulozyten (PMNs) stellen im Rahmen der körpereigenen Abwehr Vermittler unspezifischer Entzündungsreaktionen dar. Infolge angemessener Stimulation sorgen die von ihnen produzierten Sauerstoffmetaboliten für eine adäquate Abtötung von eingedrungenen Mikroorganismen. Eine überproportionale Stimulation jedoch führt zu einer übermäßigen Sekretion dieser Produkte - insbesondere von Superoxidanionen ( $O_2^-$ ) - und damit zu Zellschädigungen. Resultat können systemische Entzündungsgeschehen (MOF, SIRS) oder eine verzögerte Wundheilung sein.

Pilotstudien über die Aktivierbarkeit von PMNs konnten Lysophosphatidylsäure (LPA) als „Priming“-Substanz identifizieren. Dem klinischen „Two-hit“-Modell entsprechend kann durch einen solchen „Priming“-Vorgang ein zweiter ansonsten harmloser Stimulus zu einer überschießenden Reaktion im Sinne einer vermehrten Superoxidanionen-Produktion führen.

Lokalanästhetika (LA) sind bekannt für ihre hemmende Wirkung auf die metabolische Aktivität von PMNs. In dieser *in vitro*-Studie wurden isolierte humane PMNs über 10 Minuten bzw. eine Stunde mit Lidocain, Ropivacain ( $S^-$ ) und Tetracain inkubiert, bevor sie einem „Priming“ mit LPA ( $10^{-4}M$ ) und anschließender Aktivierung mit formylierten Peptiden bzw. Phorbolestern unterzogen wurden.

Alle getesteten LA reduzierten in klinisch relevanten Konzentrationen ( $10^{-6}$  -  $10^{-4}M$ ) die durch LPA-„Priming“ potenzierte  $O_2^-$ -Produktion in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Somit könnten LAs bei der Modulation von Entzündungsprozessen, induziert durch LPA, eine bedeutsame Rolle zukommen.

1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	4
2. EINLEITUNG .....	6
3. ALLGEMEINER TEIL .....	9
3.1 Physiologische Rolle humaner neutrophiler Granulozyten.....	9
3.2 Superoxidanionen .....	10
3.2.1 Synthese .....	10
3.3 „Priming“ in neutrophilen Granulozyten.....	12
3.3.1 Definition und Bedeutung .....	12
3.3.2 Mechanismen des „Priming“-Prozesses .....	13
3.4 Plättchen-aktivierender Faktor (PAF) im „Two-Hit“-Entzündungsmodell. 14	
3.4.1 Plättchen-aktivierender Faktor - Synthese und Funktion.....	14
3.4.2 Signaltransduktionsweg von PAF .....	14
3.5 Lysophosphatidylsäure (LPA) .....	15
3.5.1 Vergleich zu Plättchen-aktivierendem Faktor .....	15
3.5.2 Synthese und physiologische Funktion .....	16
3.5.3 Reagible Zellen .....	17
3.6 Direkte Aktivatoren: N-Formylmethionin-Leucin-Phenylalanin (fMLP) ....	19
3.6.1 Nachahmung bakterieller Effekte .....	19
3.6.2 Signaltransduktionsweg.....	20
3.7 Lokalanästhetika (LA) .....	20
3.7.1 Pharmakologische Aspekte und klinische Anwendung.....	21
3.7.2 Hemmender Einfluss auf Entzündungsreaktionen.....	22
3.7.3 Alternative Signaltransduktionswege - Beispiel: Lidocain.....	22
3.7.4 Wundheilungsstörungen.....	24
3.7.5 Ropivacain (S-) und Tetracain.....	25
4. MATERIAL UND METHODEN .....	26
4.1 Separation neutrophiler Granulozyten .....	26
4.2 Ferricytochrom C- Assay.....	27
4.3 Experimenteller Aufbau.....	28

4.4 Studienablauf .....	31
4.4.1 Pilotstudien (vgl. Dissertationsschrift von B. Tigges, geb. Krumm) ..	31
a) Direkter Aktivierungseffekt von LPA .....	31
b) Aktivierungseffekt von fMLP .....	31
4.4.2 Effekte der LA auf LPA-„Priming“ .....	32
a) Nachweis der Hemmbarkeit des LPA-„Priming“-Effektes durch das LA Lidocain .....	32
c) Effekt verschiedener Inkubationszeiten der LA.....	33
d) Vergleich der Hemmwirkung verschiedener LA auf den „Respiratory Burst“ .....	33
e) „Priming“-Kontrolle mit PAF .....	34
4.4.3 Mechanismus des LPA-Signalweges .....	34
a) PMA als Aktivatorssubstanz.....	34
4.5 Substanzen .....	35
5. ERGEBNISSE .....	37
5.1 Effekte von Lokalanästhetika auf LPA-„Priming“.....	37
a) Nachweis der Hemmbarkeit des LPA-„Priming“-Effektes durch das LA Lidocain.....	37
b) Sicherung des Angriffspunktes der LA durch den Versuch einer Inhibition der direkten Aktivierung mit fMLP.....	38
c) Effekt verschiedener Inkubationszeiten der LA .....	39
d) Vergleich der Hemmwirkung verschiedener LA auf den „Respiratory Burst“ .....	40
e) Positive „Priming“-Kontrolle durch PAF .....	41
5.2 Mechanismus des LPA-Signalweges.....	42
PMA als Aktivatorssubstanz.....	42
6. DISKUSSION .....	44
6.1 Diskussion des Versuchaufbaus .....	44
6.2 Diskussion der Ergebnisse.....	46
6.2.1 Darstellung der eigenen Ergebnisse.....	46

6.2.2 Vergleich der Resultate mit Ergebnissen anderer publizierter Studien .....	48
6.2.3 Hemmung der metabolischen Aktivität neutrophiler Granulozyten durch andere Substanzgruppen als LA .....	54
6.3 Zusammenfassung .....	56
7. LITERATURVERZEICHNIS.....	58
8. DANKSAGUNG .....	67
9. CURRICULUM VITAE .....	68
I. ANHANG .....	70
I.1 Ergänzende Tabellen zum Ergebnisteil .....	70



### 1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ATP	Adenosintri-phosphat
BSA	bovines Serumalbumin
Ca <sup>++</sup>	Kalzium
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
Cl <sup>-</sup>	Chlor
Cyt C	Ferricytochrom C
DAG	Diacylglycerol
edg	endotheliales Differenzierungsgen
fMLP	N-Formylmethion-Leucin-Phenylalanin
G-Protein	GTP-bindendes Protein
GTP	Guanosintri-phosphat
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HBSS	Hank's balancierte Salzlösung
IL-1a	Interleukin 1a
IP <sub>3</sub>	1,4,5-Inositol-Triphosphat
K <sup>+</sup>	Kalium
LA	Lokalanästhetikum
La <sup>3+</sup>	Lanthanid
Lido	Lidocain
LPA	Lysophosphatidylsäure
LPS	Lipopolysaccharid
LTB <sub>4</sub>	Leukotrien B <sub>4</sub>
MOF	Multiorganversagen
Na <sup>+</sup>	Natrium
NADPH-Oxidase	Nikotinamid-Dinukleotid-Phosphat-O <sub>2</sub> <sup>-</sup> -Oxidoreduktase-System
NIM	Neutrophilen Isolationsmedium
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superoxidanion
PAF	Plättchen-aktivierender Faktor
PLA <sub>2</sub>	Phospholipase A <sub>2</sub>

## 1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
PMA	Polymyrinstat Azetat
PMN	neutrophile Granulozyten
PTx	Pertussistoxin
rhG-CSF	rekombinanter Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
ROM	reaktive Sauerstoffmetaboliten
Ropi	Ropivacain
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
SOD	Superoxid-Dismutase
Tetra	Tetracain
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor $\alpha$
VTD	Veratridin

### 2. EINLEITUNG

Neutrophile Granulozyten übernehmen im menschlichen Körper eine wichtige Abwehrfunktion gegen invasive Mikroorganismen. Dazu ist es nötig, dass sie durch regulierte Signalkaskaden und Mediatorsysteme adäquat aktiviert werden, um - neben anderen Abwehrmechanismen - schließlich ausreichend zytotoxische Substanzen wie das Superoxidanion ( $O_2^-$ ), ein radikaler Sauerstoffmetabolit (ROM), zu produzieren.

Im Falle einer inadäquaten, überschießenden Aktivierung wird das leukozytäre Enzymsystem zur Herstellung der Radikalen überstimuliert. Resultat ist die Sekretion von unverhältnismäßig großen Mengen  $O_2^-$  in das direkt umgebene Mikromilieu. Gewebsschädigung durch Einzelzelluntergang ist die Folge. Klinische Beispiele solcher pathophysiologischer Vorgänge sind die Herzmuskelnarbe nach Myokardinfarkt und Reperfusion, das Multiorganversagen (MOF) oder das „systemic inflammatory response syndrome“ (SIRS).

Von besonderem Interesse sind hierbei zum einen die spezifischen Mediatoren und ihre Signaltransduktionswege, die zu einer Überstimulation der Neutrophilen Granulozyten führen, zum anderen aber auch mögliche Optionen, die eine solche Überstimulation inhibieren oder wenigstens reduzieren können.

Zahlreiche Untersuchungen haben gezeigt, dass eine Sequenz von „Priming“ und Aktivierung einen besonders stimulierenden Effekt auf die metabolische Aktivität von neutrophilen Granulozyten ausübt. Als „Priming“ wird hierbei ein der Aktivierung vorausgehender Vorgang bezeichnet, bei dem die Morphologie und die äußerlich messbare Aktivität der neutrophilen Granulozyten zwar unverändert bleiben, die für die metabolische Aktivität verantwortlichen Enzymsysteme jedoch auf einen zweiten aktivierenden Stimulus vorbereitet werden. Die metabolische Antwort auf diesen zweiten Reiz, beispielsweise in Form von Produktion und Sekretion zytotoxischer Substanzen, ist dann deutlich größer als man es bei einfacher Aktivierung erwarten würde. Gay zeigte in einem *in vitro* - Modell an neutrophilen Granulozyten, dass eine Vorinkubation dieser Zellen mit Plättchen-

aktivierendem Faktor (PAF) vor einer Stimulation mit formylierten Peptiden (fMLP) oder Phorbolestern (PMA) zu einer signifikant erhöhten  $O_2^-$ -Produktion im Vergleich zu alleiniger direkter Stimulation führte [23]. Worthen et al. konnte ebenfalls in einem *in vitro* - Modell an neutrophilen Granulozyten ähnliche Effekte mit Lipopolysaccharid (LPS) als „Priming“- und fMLP als Aktivierungssustanz hervorrufen [77].

Zusammengefasst hat es also den Anschein, dass bioaktive Lipide potente „Priming“-Substanzen für die metabolische Aktivität neutrophiler Granulozyten darstellen. In unserem *in vitro*- Modell untersuchten wir einen weiteren Vertreter der Phospholipide auf seine „Priming“-Qualitäten: Lysophosphatidylsäure (LPA) ist bekannt für seine zahlreichen physiologischen Funktionen wie Zellproliferation, Thrombozytenaggregation oder Chemotaxis [53]. Seine Freisetzung wird durch Entzündungsreize induziert, was auf eine stimulierende Funktion im Rahmen eines inflammatorischen Geschehens hinweist [22].

Im Tiermodell konnte bei induziertem koronaren Verschluss und systemisch antiarrhythmischer Therapie mit Lidocain nachgewiesen werden, dass die Größe der myokardialen Narbe nach Reperfusion signifikant kleiner war als die von vergleichbaren Tieren mit Placebo-Behandlung [76]. Ursächlich scheint eine verminderte ROM-Sekretion neutrophiler Granulozyten am Ort des Geschehens zu sein. Da diese Abwehrzellen auch hier ein „Priming“ mit anschließender Aktivierung durchlaufen haben, liegt die Vermutung nahe, dass Lokalanästhetika (LA) die Superoxidanionen-Produktion und -Sekretion in „doppelt“ stimulierten neutrophilen Granulozyten zumindest teilweise inhibieren können. Somit könnte neben einer Reduktion der Größe der Myokardinfarktnarbe auch ein besseres „Outcome“ nach systemischen Ereignissen, in denen der Organismus mit „Priming“- und aktivierenden Substanzen überschüttet wird, erwartet werden. Im Falle einer Sepsis, MOF oder SIRS könnte der Patient aufgrund einer verminderten Gewebsschädigung, insbesondere im Bereich der Lunge, von einer solchen Behandlung profitieren. Entsprechende *in vivo*- Tierstudien von Nishina und Takao et al. konnten einen hemmenden Effekt von Lidocain auf die metabolische Aktivität neutrophiler

Granulozyten während einer durch Salzsäure ausgelösten Pneumonie nachweisen [60, 72]. *In vitro* konnten Kanbara et al. beobachten, dass Lidocain die  $O_2^-$ -Produktion in neutrophilen Granulozyten supprimiert. Auch hierbei wurde eine Stimulationssequenz mit Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) als „Priming“-Substanz und fMLP zur Aktivierung eingehalten; die Konzentration des LA war mit 0,75 mM für einen halbmaximalen Effekt jedoch relativ hoch.

Die exakten Mechanismen, die zum einen hinter der Aktivierung neutrophiler Granulozyten stehen, zum anderen für den antiinflammatorischen Effekt von LA verantwortlich sind, sind derzeit aber noch ungeklärt und bedürfen weiterer Untersuchungen.

In Pilotstudien unseres Labors (vgl. Dissertationsschrift von Herrn Boris Tigges, geb. Krumm) wurde bereits die „Priming“-Fähigkeit neutrophiler Granulozyten durch LPA untersucht. Diese Studie zeigte dass, LPA als „Priming“-Substanz einen verstärkten „Respiratory Burst“ in neutrophilen Granulozyten nach Zugabe eines zweiten Stimulus (fMLP) zur Folge hat, ohne jedoch diese Zellen direkt zu aktivieren.

In der vorliegenden Studie gingen wir von der Hypothese aus, dass LA einen negativen Einfluss auf die metabolische Aktivität humaner neutrophiler Granulozyten ausüben. Im Einzelnen wollten wir zur Klärung folgender Fragen beitragen:

1. Ist die lokalanästhetische Inhibition eines „Respiratory Burst“, der durch „Priming“ und Aktivierung induziert wurde, konzentrationsabhängig?
2. Lässt sich eine Zeitabhängigkeit erkennen?
3. Besteht ein Unterschied in der Hemmfähigkeit der verschiedenen Substanzgruppen (Amid-Typ vs. Ester-Typ)?
4. Wirken LA hemmend auf den „Priming“- oder aber auf den Aktivierungsprozess?
5. Auf welcher Höhe interferieren LA mit dem Signaltransduktionsweg der „Priming“-/ Aktivierungssequenz in neutrophilen Granulozyten?

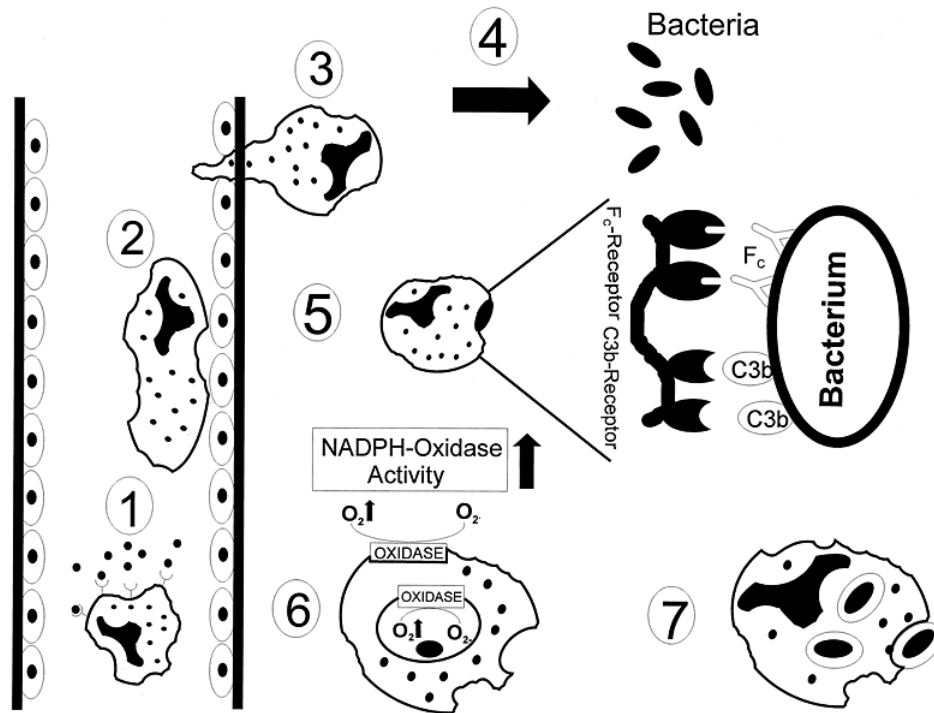
### 3. ALLGEMEINER TEIL

#### 3.1 Physiologische Rolle humaner neutrophiler Granulozyten

Aus der Granulozytopoese gehen sowohl eosinophile und basophile, als auch neutrophile Granulozyten hervor. Letztere machen mit 40-65% den größten Anteil der Granulozyten im peripheren Blut aus und werden gewöhnlich in einer Konzentration von etwa  $3-5 \times 10^6$  Zellen/ml Blut gefunden. Unter physiologischen Umständen kann man sie in der Zirkulation in einem ruhenden oder nicht-aktivierten Zustand mit einer durchschnittlichen Überlebenszeit von 8-20 Std. beobachten. Da sie zu den ersten Zellen gehören, die an den Ort einer Infektion gelangen, müssen sie die Fähigkeit besitzen, schnell und potent reagieren zu können. Dazu gehört, dass sich im Falle einer Aktivierung ihre Überlebenszeit bis hin zu mehreren Tagen verlängert [43] und sich ihre Anzahl im Plasma beträchtlich erhöht.

Die Funktion neutrophiler Granulozyten im Falle von Infektionen besteht zum einen in der Zerstörung mikrobieller Pathogene, zum anderen in der Stimulation und Regulation des Entzündungsprozesses durch Freisetzung von Aktivatoren des Immunsystems (z.B. Zytokine) und anderer proinflammatorischer Moleküle wie beispielsweise Lipidmediatoren [32]. Generell werden neutrophile Granulozyten durch verschiedene Faktoren (Zytokine, aktiviertes Komplementsystem, etc.) aktiviert, bevor sie sich dann an die Kapillarwände anheften (Margination) (Abb.1). Diesem Prozess folgt die so genannte Diapedese, ein Hindurchtreten der Leukozyten durch Lücken zwischen benachbarten Endothelzellen, welche durch morphologische Veränderungen innerhalb des Zytoskeletts entstehen. Anschließend migrieren die Entzündungszellen in das betroffene Gewebe (Chemotaxis) und beginnen mit der Phagozytose pathogener Keime. Eine Abtötung solcher Mikroorganismen wird durch Sekretion degenerativer Enzyme aus zellinternen Vesikeln eingeleitet. Zusätzlich unterstützt die Aktivierung des Multienzymkomplexes der Nikotinamid-Dinukleotid-Phosphat- $O_2^-$ -Oxidoreduktase-Systems (NADPH-Oxidase) diesen Prozess [62]. Durch sie

kommt es zur Produktion reaktiver Sauerstoff-Metaboliten (ROM). Diese werden in die Phagosomen sezerniert, welche anschließend unter Bildung von degenerierenden Phagolysosomen mit den Lysosomen verschmelzen.



**Abb. 1:**

Aktivierungskaskade neutrophiler Granulozyten (aus [32]). 1: Sensibilisierung der neutrophilen Granulozyten durch Chemokine, 2: Margination und Adhäsion, 3: Diapedese, 4: Chemotaxis, 5: Opsonierung (Anlagerung von Plasmabestandteilen, z.B. Komplementfaktor C3b, an antigene Substanzen, wodurch deren Elimination durch Phagozytose begünstigt wird), 6: Superoxidanionenproduktion, 7: Phagozytose

## 3.2 Superoxidanionen

### 3.2.1 Synthese

Durch den Multienzymkomplex der NADPH-Oxidase [11] wird während des so genannten „Respiratory Burst“ ein bedeutsamer Metabolit, das Superoxidanion ( $O_2^-$ ), produziert. Unter dem „Respiratory Burst“ versteht man die vermehrte

Sauerstoffaufnahme der Leukozyten als Grundvoraussetzung der  $O_2^-$  - Produktion im Verlauf ihrer Aktivierung, welche von der mitochondrialen Respiration unabhängig ist [32]. Die Signalkaskade zur Initiation der Zusammensetzung der NADPH-Oxidase beginnt mit der Besetzung von Rezeptoren, die sich auf der Plasmamembran neutrophiler Granulozyten befinden [11]. Diese transferieren extrazelluläre Signale (beispielsweise endogene Mediatoren) mittels GTP-bindender Proteine (G-Proteine) auf intrazelluläre „second Messenger“-Systeme. Dazu gehören zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP), Diacylglycerol (DAG) und 1,4,5-Inositol-Triphosphat ( $IP_3$ ), die für die Umsetzung eines extrazellulären Stimulus in eine zelluläre Reaktion verantwortlich sind.

Zusammengefasst wird nach Aktivierung spezifischer G-Proteine und anschließender Vermittlung via „second Messenger“ die ruhende Oxidase an der Plasmamembran, der Membran spezifischer Vesikel und Gelatinase-enthaltender bzw. sekretorischer Granula vollständig zusammengesetzt. Es bildet sich eine Elektronen-Transportkette von NADPH zu  $O_2^-$ :



$O_2^-$  an sich ist nur geringfügig toxisch; eine sich anschließende Konversion jedoch - katalysiert via Haber-Weiss-Reaktion - kann unter Mithilfe der Myeloperoxidase in der Produktion hochtoxischer Metabolite wie Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), Hydroxylchlorid (HOCl) oder Hydroxidionen ( $OH^-$ ) münden:



So wird ein Großteil der Zellschädigungen im Zusammenhang mit  $O_2^-$  -Toxizität durch eben diese Metaboliten hervorgerufen [43].



#### 3.2.2 Folgen einer überschießenden Superoxidanionen-Produktion

Grundsätzlich sind Entzündungsreaktionen sowohl für die körpereigene Abwehr als auch für die strukturelle und funktionelle Reparatur von verletztem Gewebe essentiell. Wenn die Produkte der Granulozyten-eigenen NADPH-Oxidase im Rahmen einer Inflammation anstatt in Phagolysosomen allerdings in die naheliegende Umgebung neutrophiler Granulozyten sezerniert werden, können diese Zellen, denen im Ablauf einer Entzündung eine bedeutende Rolle zukommt, eine beträchtliche Gewebsschädigung verursachen [43]. Dieses Resultat ist als überschießende Stimulation des Enzymsystems zu deuten und kann eine nahezu ungehemmte inflammatorischen Antwort bewirken. Die gleichen Zellen, deren Aufgabe es ist, den Körper zu schützen, können diesen also auch schädigen, wenn sie in unkontrollierter und exzessiver Weise stimuliert und aktiviert werden.

### **3.3 „Priming“ in neutrophilen Granulozyten**

#### 3.3.1 Definition und Bedeutung

Neutrophile Granulozyten können in verschiedenen Aktivitätsstufen vorliegen: *ruhend* (mit einer geringen Rate an  $O_2^-$ -Produktion, da die NADPH-Oxidase nur partiell zusammengesetzt ist) oder *aktiv*. Sie können sich jedoch auch in einem dritten Zustand, dem sog. „*Priming*“, der der eigentlichen Aktivierung vorausgeht, befinden, wobei die Zellen „äußerlich“ (beispielsweise in Morphologie und Sauerstoffverbrauch) einer unstimulierten Zelle ähneln. „*Priming*“ ist als eine unspezifische, frühe Reaktion auf Infektion oder Trauma jeglicher Art zu werten [15]. Es intensiviert die Antwort neutrophiler Granulozyten auf einen zweiten, potentiell aktivierenden Stimulus, wobei der „*Priming*“-Reiz in Abhängigkeit von der Substanz eine variable Zeit vor der eigentlichen Aktivierung eingesetzt haben muss. Dieser Zeitraum vom „*Priming*“-Reiz bis zur Aktivierung ist abhängig von der entsprechender Transduktionsroute und reicht von wenigen Sekunden (Adenosintriphosphat (ATP)) bis hin zu einer Stunde (LPS) [15]. Die „*Priming*“-Substanz *per se*

aktiviert den „Respiratory Burst“ nicht direkt, sondern verstärkt die  $O_2^-$  -Produktion als Antwort auf einen nachfolgenden aktivierenden Reiz [24] auf bis zu 20-fach höhere Werte [26]. Viele physiologische Prozesse fördern inflammatorische Kaskaden über „Priming-“ und Aktivierungssequenzen [1]. Deutlich wird dies beispielsweise anhand der Vielfalt möglicher „Priming“-Substanzen, die sowohl pharmakologische [15] als auch physiologische Agenzien wie Zytokine und Phospholipidmediatoren (beispielsweise PAF) und bakterielle Produkte einbezieht [2].

Eine bedeutende Konsequenz des „Priming“ neutrophiler Granulozyten ist - abgesehen von dem direkten Effekt auf die Zellpolarisation, Formänderung und Integrin-/Selektin-Expression [15] - die verbesserte  $O_2^-$  -abhängige Abtötung von Mikroorganismen [62]. Im eigentlichen Aktivierungsprozess sprechen neutrophile Granulozyten, die den „Priming“-Prozeß durchlaufen haben, auf Aktivierungssignale verstärkt an. Diese Erkenntnisse wurden zwar größtenteils in *in vitro*-Versuchen gewonnen, jedoch konnten die experimentell gewonnenen Daten auch in klinisch relevanten Modellen bestätigt werden. So konnte beispielsweise nach Infusion potenzieller „Priming“-Substanzen in einen tierischen Organismus oder aber an isolierten neutrophilen Granulozyten von Patienten mit unterschiedlichen Infektionen eine erhöhte Reaktivität dieser Leukozyten nachgewiesen werden [15] .

#### 3.3.2 Mechanismen des „Priming“-Prozesses

Auch wenn genaue Mechanismen des „Priming“-Prozesses nicht bekannt sind [5, 51], werden folgende Möglichkeiten diskutiert:

- (a) Vermehrung der Rezeptoranzahl auf der Zelloberfläche neutrophiler Granulozyten oder Verbesserung ihrer Rezeptoraffinität;
- (b) spätere Inaktivierung des aktiven Rezeptor-Liganden-Komplexes, was zu einem Anstieg des Levels an „second Messenger“ führt;
- (c) Translokation der verschiedenen zytosolischen NADPH-Oxidase-Komponenten an die Plasmamembran;
- (d) spätere Inaktivierung des Oxidase-Komplexes [21]

#### **3.4 Plättchen-aktivierender Faktor (PAF) im „Two-Hit“-Entzündungsmodell**

Ein klinisch wichtiges Entzündungsmodell ist das „Two-Hit“-Modell. Ein initialer traumatischer Insult „primt“ die Entzündungsantwort, so dass ein nachfolgender, ansonsten relativ harmloser, entzündlicher Reiz eine überschießende Antwort auslösen kann. Zirkulierende neutrophile Granulozyten reagieren in Analogie zu diesem Modell auf endogene, proinflammatorische Lipidmediatoren wie beispielsweise PAF, indem sie einen „Priming“-Vorgang durchlaufen [62].

##### 3.4.1 Plättchen-aktivierender Faktor - Synthese und Funktion

PAF wird von einer Vielzahl aktivierter Zellen, einschließlich neutrophiler, basophiler und eosinophiler Granulozyten, Thrombozyten, natürlicher Killer (NK) Zellen, Monozyten, Makrophagen, Mastzellen und Endothelzellen während des Entzündungsprozesses mit Hilfe der Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) [43] aus Membranlipiden synthetisiert. *In vivo* konnte gezeigt werden, dass PAF die pulmonale Sequestration neutrophiler Granulozyten, Blutdruckabfall, Thrombozytenaggregation, Bronchokonstriktion sowie eine erhöhte vaskuläre Permeabilität induziert [62]. *In vitro* führte PAF, abhängig von der verwendeten Konzentration [38], sowohl zur Chemotaxis neutrophiler Granulozyten, als auch zur Aggregation, Kapillaranheftung, zur Stimulation des „Respiratory Burst“ und Degranulation neutrophiler Granulozyten.

##### 3.4.2 Signaltransduktionsweg von PAF

Neben einer unspezifischen Membraninteraktion bindet PAF zusätzlich an zwei spezifische, mit einem Membranrezeptor verbundene G-Proteine und übt unter Mithilfe des „second Messengers“ Kalzium (Ca<sup>++</sup>) seine Funktionen aus [43].

#### 3.4.3 Die Rolle als „Priming“-Substanz

Zwar ist PAF selbst nur ein relativ schwacher direkter Aktivator, im Rahmen eines „Priming“-Prozesses jedoch stellt es eine durchaus potente „Priming“-Substanz dar, wenn es in einer Konzentration zwischen 0.2 nM – 20 µM vorliegt [23]. Zum Vergleich findet man es bei septischen Patienten in einer Konzentration von ca. 3,8 nM im Blut [49].

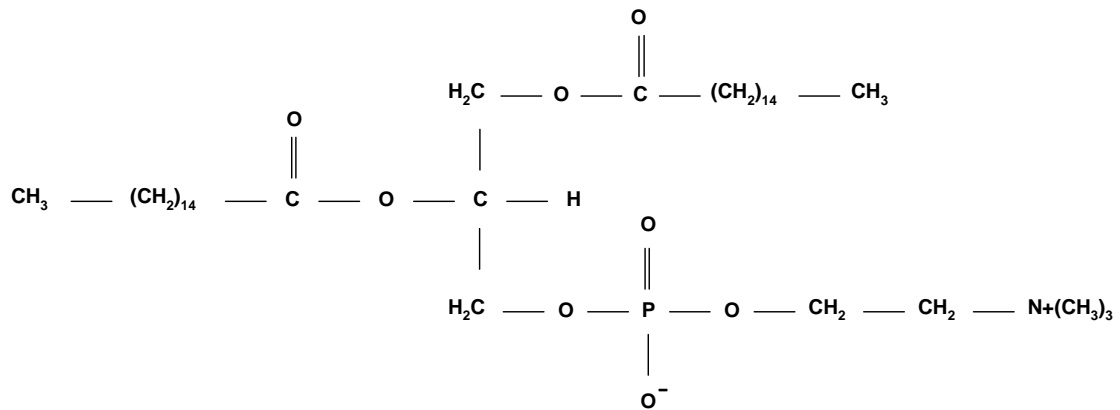
PAF wird im Falle einer Zellaktivierung rasch synthetisiert und sezerniert, allerdings ebenso von den gleichen Zellen, die es zuvor produziert haben, wieder aufgenommen und via PLA<sub>2</sub>, Phospholipase C (PLC) und Phospholipase D (PLD) katabolisiert. Eine Vielzahl nachfolgender pathophysiologischer Stimuli führt dann zum eigentlichen Aktivierungseffekt, der mit einer verstärkten O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Sekretion einhergeht.

### **3.5 Lysophosphatidylsäure (LPA)**

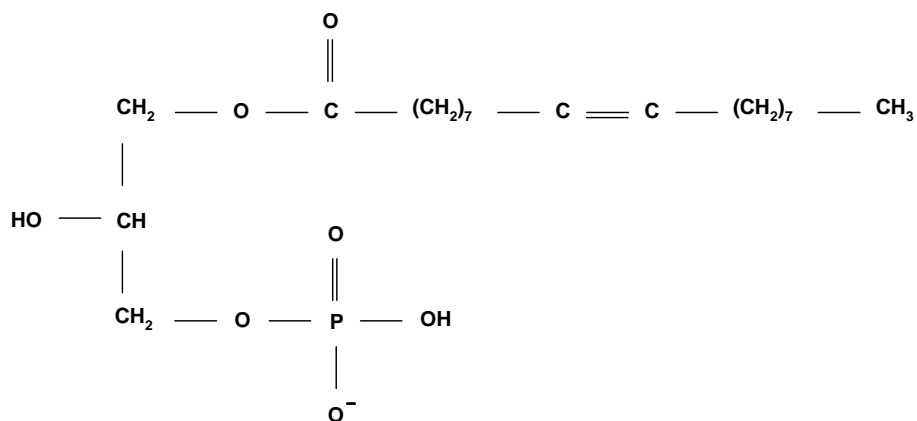
#### 3.5.1 Vergleich zu Plättchen-aktivierendem Faktor

Aufgrund der engen Verwandtschaft des PAF mit LPA (Abb. 2) als einem Phospholipid, das eine ähnliche biologische Aktivität wie PAF aufweist und ebenso an Serumalbumin gebunden ist, liegt die Vermutung über eine ähnliche „Priming“-Fähigkeit von LPA auf menschliche neutrophile Granulozyten nahe. Zudem wiesen einige Gruppen einen direkten Aktivierungseffekt durch LPA auf verschiedene Zelllinien (Jurkat T-Zellen, murine Makrophagen [78, 44]) nach. In einem Fall konnten auch neutrophile Granulozyten durch LPA aktiviert werden [12].

A



B



**Abb. 2:**

Strukturformeln von A: Plättchen-aktivierendem Faktor (PAF),  
 B: Lysophosphatidylsäure (LPA)

### 3.5.2 Synthese und physiologische Funktion

LPA ist ein Phospholipidmediator mit einer Vielzahl biologischer Effekte. Unter physiologischen Umständen wird LPA (hauptsächlich Oleoyl- und Palmitoyl-LPA) aus Phospholipidspeichern zellulärer Membranen freigesetzt [54] und liegt dann bei Säugetieren mit einem Serum-Level zwischen 2-20  $\mu\text{M}$  vor [54]; im

Falle einer Infektion oder Verletzung jedoch wird es größtenteils durch aktivierte Thrombozyten freigesetzt. Diese synthetisieren und sezernieren die Substanz während der sekundären Blutgerinnung [55, 18]. Desweiteren setzen verletzte Fibroblasten, Leukozyten, Phagozyten und Endothelzellen [57] LPA vor allem im Verletzungs- und Entzündungsfeld frei. Daran wird deutlich, dass LPA insbesondere bei Wunden und Verletzungen eine wichtige Rolle zukommt.

Physiologischerweise erfüllt es eine Vielzahl von Funktionen [55]. In fast allen Zelltypen führt es zu einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration ( $\text{Ca}^{++}$ ). Im Bereich der Wundheilung stellt es einen wirksamen Modulator der Fibronektinverbindung dar und führt so zu Veränderungen der Zellform sowie des Aktin-Zytoskeletts. Generell fördert es die Proliferation von Fibroblasten, in Ratten- und Carcinomzellen werden sogar DNS-Synthese und Zellteilung angeregt. An glatter Muskulatur von Uterus, Intestinum und Gefäßen bewirkt es eine Kontraktion und ist somit auch für die Entstehung eines Hypertonus verantwortlich [19]. Auch ein Anstieg in der Permeabilität zwischen den „Tight-Junction“ der zerebralen Endothelzellen wird beobachtet. Desweiteren wirkt es konzentrationsabhängig chemotaktisch auf Monozyten und leitet eine Thrombozyten-Aggregation ein [55].

#### 3.5.3 Reagible Zellen

Obwohl eine eindeutige Rolle für LPA in der Pathophysiologie der Entzündung noch etabliert werden muss, sind bisher nur wenige Zelltypen gefunden worden, die nicht auf LPA reagieren. Auffallend ist, dass all diese Zellen der hämatopoetischen Reihe angehören und zum größten Teil Zellen des Immunsystems sind wie Mastzellen, Jurkat-T-Zellen, Monozyten, Lymphozyten des peripheren Blutes, erythroleukämische K-562 Zellen und humane neutrophile Granulozyten, wobei über letztere widersprüchliche Berichte existieren [57].

#### 3.5.4 Signaltransduktionsweg

Die Art der Informationsvermittlung von dem extrazellulären Stimulus (LPA) zur intrazellulären Antwort war lange Zeit umstritten. Eine unspezifische Membraninteraktion und eine Rezeptor-vermittelte Signaltransduktion wurden diskutiert. Jedoch sprach schon zum Zeitpunkt der experimentellen Phase dieser Dissertation folgendes für die Existenz eines LPA-Rezeptor-Systems:

- a) LPA agiert extrazellulär: Lanthanid ( $\text{La}^{3+}$ ), welches membran-impermeabel ist [39], terminiert den durch LPA induzierten intrazellulären  $\text{Ca}^{++}$ -Anstieg ( $[\text{Ca}^{++}]_i$ ) in Fibroblasten [19];
- b) einige Reaktionen auf LPA sind Pertussistoxin (PTx)-sensitiv, was auf eine Beteiligung von PTx-sensitiven  $\text{G}_i$ -Proteinen hinweist;
- c) die durch LPA ausgelöste Signalkette wird durch direkte Aktivatoren bzw. Inaktivatoren von G-Proteinen beeinflusst;
- d) ein photoaktives Analog ( $[\text{}^{32}\text{P}]$ -Diazirin-LPA) kennzeichnet - im Gegensatz zu den meisten LPA-insensitiven Zelltypen - in diesen Zellen ein LPA-bindendes Protein in der Plasmamembran [75].

Die LPA-Signalkette zeigt hier außerdem bemerkenswerte Sensitivität gegenüber Veränderungen in der molekularen Struktur des Agonisten LPA [57, 19], während die intrazelluläre Applikation von LPA oftmals ohne Effekt bleibt [18].

Untersuchungen haben gezeigt, dass LPA über drei verschiedene G-Proteine agiert:  $\text{G}_q$  führt zu einem Anstieg von  $[\text{Ca}^{++}]_i$  (via PLC) und damit zu Aktivierung der Proteinkinase C (PKC), während Bindung an  $\text{G}_i$  den cAMP-Level sinken lässt und ein drittes G-Protein die  $\text{PLA}_2$  aktiviert [19].

- a)  $\text{G}_q$  (durch Phorbolster inhibierbar)  $\rightarrow$  Aktivierung der PLC  $\rightarrow \text{IP}_3 \uparrow$  & DAG  $\uparrow \rightarrow \text{Ca}^{++} \uparrow \rightarrow$  Aktivierung der PKC
- b)  $\text{G}_i$  (PTx-sensitiv)  $\rightarrow$  Inaktivierung der Adenylatzyklase  $\rightarrow \text{cAMP} \downarrow$

- c) **G-Protein** (durch Phorbolster inhibierbar) → PLA<sub>2</sub> → freie Arachidonsäure ↑

Daneben gibt es Hinweise auf die Beteiligung sog. kleiner leichter G-Proteine (LMWGP) wie Ras/ Raf, die PTx-sensibel sind und in der Signalkette weiter distal die Mitogen-aktivierte Protein (MAP) -Kinase aktivieren sowie eine Rho-abhängige Tyrosin-Phosphorylation [54] bewirken.

Kürzlich konnte mit Hilfe der Klontechnik die Existenz dreier G-Protein gekoppelter LPA-Rezeptoren direkt nachgewiesen werden. Während der LPA<sub>1</sub>-Rezeptor aus Herz, Gehirn, Kolon, Dünndarm und Prostata extrahierbar ist, gelang es, den LPA<sub>3</sub>-Rezeptor aus Niere, Lunge, Herz, Pankreas und Prostata zu isolieren. Der LPA<sub>2</sub>-Rezeptor hingegen scheint lediglich auf Leukozyten beschränkt zu sein [14].

Stimulation des LPA<sub>1</sub>-Rezeptors führt zum einen zu einer Aktivierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) und zum anderen zu einer Inhibition der Adenylatzyklase (beides in PTx-sensitiver Weise). Besetzung des LPA<sub>2</sub>-Rezeptors resultiert in einer PTx-insensitiven Aktivierung der PLC $\beta$  und folglich in einer Erhöhung der intrazellulären Ca<sup>++</sup>-Konzentration. Auch der Signaltransduktionsweg des LPA<sub>3</sub>-Rezeptors mündet in einer Ca<sup>++</sup>-Mobilisierung. Dies geschieht ebenfalls PTx-insensitiv, wahrscheinlich über ein G<sub>q/11</sub> $\alpha$ -Protein [37].

### **3.6 Direkte Aktivatoren: N-Formylmethionin-Leucin-Phenylalanin (fMLP)**

#### 3.6.1 Nachahmung bakterieller Effekte

Im Gegensatz zu bisher erwähnten „Priming“-Substanzen, existieren auch Substanzen, die zu einer direkten Aktivierung neutrophiler Granulozyten fähig sind. Hierzu gehören u.a. formylierte Peptide, wie das potente fMLP. Dieses synthetische Tripeptid imitiert eine Reihe bakterieller Effekte. Grund hierfür ist die typische Aminosäuresequenz, die im Bakterium nach Synthese der ursprünglichen bakteriellen Wandproteine letztendlich oft wieder - zusammen



mit angrenzenden Peptidresten - abgespalten wird [43]. So stimuliert fMLP beispielsweise konzentrationsabhängig Chemotaxis, Leukozytenaggregation, Produktion reaktiver Oxidantien, Veränderungen des Zytoskeletts und Degranulation neutrophiler Granulozyten [43]. Es wird als „Gold-Standard“ in Studien über neutrophile Granulozyten im Rahmen von Infektionen, Sepsis und bakteriellen Gewebsschädigungen genutzt [9]. Aufgrund der Provozierbarkeit signifikanter sekretorischer und chemotaktischer Reaktionen in menschlichen Abwehrzellen dient es außerdem als Substanz der Wahl in Studien zur Aufklärung der Mechanismen, denen „Priming“ und Aktivierung unterliegen.

#### 3.6.2 Signaltransduktionsweg

Der fMLP-Rezeptor stellt, ähnlich dem PAF-Rezeptor, ein weiteres Beispiel für einen G-Protein gekoppelten Rezeptor dar [62]. Da eine Besetzung dieses Rezeptors die NADPH-Oxidase aktiviert [8], was durch die Produktion reaktiver Oxidantien nachweisbar ist, wird fMLP häufig in Studien zur Aufklärung Rezeptor-vermittelter Prozesse benutzt. Das spezielle G-Protein, das an einen solchen Rezeptor koppelt, ist vom  $G_i$ -Typ und aktiviert über mehrere Zwischenschritte die PLC (zur Bereitstellung von Inositol-Phosphaten und Diacylglycerol), die  $PLA_2$  (zur Bereitstellung von Arachidonsäure) und die PLD (zur Sekretion von Phosphatidsäure und Diacylglycerol), welche für die fMLP-vermittelte Umsetzung der  $O_2^-$ -Sekretion verantwortlich sind [43].

#### **3.7 Lokalanästhetika (LA)**

Im klinischen Alltag laufen „Priming“ und Aktivierung auf lokaler Ebene schon bei kleineren entzündlichen Prozessen ab [2]. Nach schwerwiegenden Traumen überflutet der menschliche Organismus hingegen die körpereigenen Abwehrzellen mit entsprechend großen Mengen an „Priming“- (beispielsweise PAF und  $TNF-\alpha$ ) und aktivierenden Substanzen (Antigene eingedrungener Mikroorganismen). Dies kann dazu führen, dass unter normalen Umständen harmlose Stimuli - separat gesehen - nun unter gegenseitiger Beeinflussung

synergistisch eine zytotoxische Antwort in neutrophilen Granulozyten induzieren, die bis hin zu wirtseigenen Gewebsschädigungen reichen kann [62].

Wie in vorhergehenden Studien gezeigt werden konnte, haben LA einen hemmenden Effekt auf den LPA-Signaltransduktionsweg sowohl im Xenopus-Oozyten Model [70] (an dem Ionenströme über die äußere Oozytenmembran gemessen werden) als auch auf Funktionen humaner neutrophiler Granulozyten [40].

#### 3.7.1 Pharmakologische Aspekte und klinische Anwendung

Bei LA handelt es sich um schwach basische tertiäre Amine mit einem  $pK_a$ -Wert von 7.7 – 9 [42]. Bei physiologischem pH-Wert liegen sie überwiegend in dissoziiert-kationischer (also amphiphiler) Form vor. Während nur die undissoziierte, lipidlösliche Base das Perineurium und Axolemm penetrieren und somit zum Wirkort gelangen kann, stellt das dissoziierte Kation die aktive Wirkform dar: dieses reagiert vom Axoplasma aus mit dem Porenprotein des Natrium ( $Na^+$ )- Kanals und lagert sich mit seinem hydrophilen Kopf derartig in den  $Na^+$ -Kanal, dass der Durchtritt von  $Na^+$ -Ionen aufgrund der positiven Ladung nicht mehr möglich ist. Zusätzlich kann sich das LA in seiner amphiphilen Form in die das Porenprotein umgebende Phospholipid-Doppelschicht einlagern und damit auch strukturell die Aktivierbarkeit des  $Na^+$ -Kanals aufheben [48].

In der klinischen Anwendung wirken Lokalanästhetika durch regionale Blockade spannungsabhängiger  $Na^+$ -Kanäle an freien Nervenendigungen sensibler Nerven und weiterer erregbarer Strukturen wie dem Reizleitungssystem des Herzens [67]. Durch diese Unterbindung des  $Na^+$ -Einstroms in die Zelle wird der erste Schritt der Depolarisation inhibiert und folglich auch kein Aktionspotential mehr fortgeleitet; eine Erregungsentstehung mit Weiterleitung zu zentralen wahrnehmenden Strukturen wird verhindert [42].

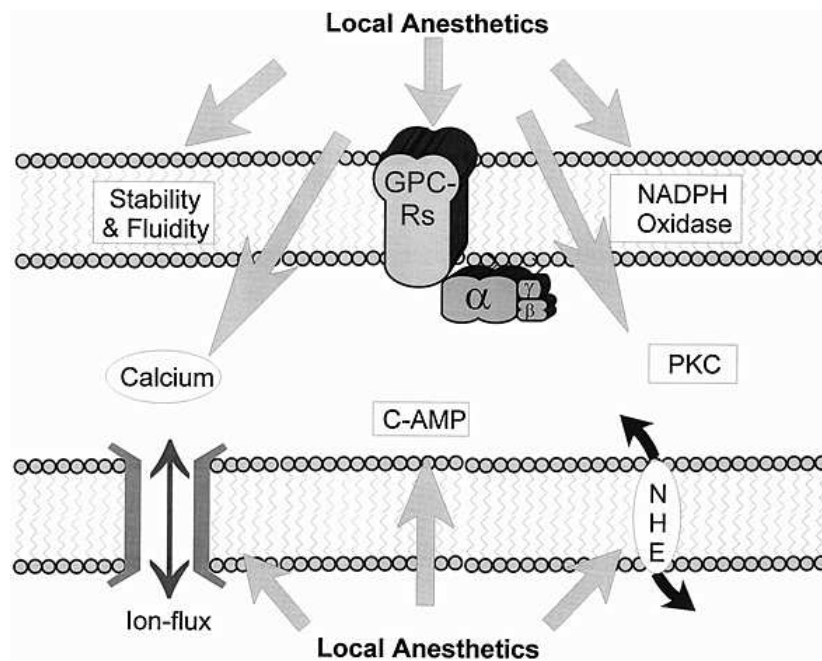
#### 3.7.2 Hemmender Einfluss auf Entzündungsreaktionen

Außer dieser klinisch genutzten Fähigkeit der LA konnten aber auch erstaunliche Effekte bei der Interaktion von LA mit Entzündungsreaktionen beobachtet werden. Die Entzündung, als körpereigene Antwort auf Verletzungen (Gewebstraumen, Pathogene), wird reguliert durch ein Zusammenspiel von Chemokinen, Komplement-System, Lipidmediatoren und Zytokinen, deren Aufgabe es dabei ist, das Entzündungsgeschehen zu koordinieren und mit Hilfe der Chemotaxis neutrophile Granulozyten aus dem Knochenmark zu mobilisieren. LA dagegen hemmen die Freisetzung von Zytokinen (Interleukin-1 $\alpha$ , Leukotrien-B<sub>4</sub>), Prostaglandinen und Histaminen [32] und schränken somit die Induktion weiterer Reaktionen ein. Des Weiteren führen sie durch Zellkontraktion nach Synthese von Retraktionsfibrillen zum sog. „Zell-Rounding“, einem Zustand, in dem ein allgemeiner Rückgang an Zellaktivität zu beobachten ist [32]. Dies hat zur Folge, dass Adhäsion, Phagozytose, Degranulation, „Respiratory Burst“ und die Migration neutrophiler Granulozyten nur noch eingeschränkt stattfinden. Letztere wird zusätzlich durch einen reduzierten Metabolismus und eine herabgesetzte „Random Mobility“ dieser Zellen negativ beeinflusst. Osaka et al. demonstrierten, dass LA die Sekretion lysosomaler Enzyme, Expression zellulärer Adhäsionsmoleküle und Aggregation neutrophiler Granulozyten, die durch rekombinanten Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor (rhG-CSF) *in vitro* stimuliert wurden, reduzieren können [61]. Außerdem hemmen sie perioperativ Koagulation und Plättchenaggregation [27]. Dass dabei die inhibitorische Fähigkeit der LA mit dem entsprechenden Partitionskoeffizienten korreliert und damit von der Lipophilie eines LA abhängig ist, konnten Hattori et al. ebenfalls in einem *in vitro* Modell zeigen [29].

#### 3.7.3 Alternative Signaltransduktionswege - Beispiel: Lidocain

Einige der oben erwähnten hemmenden Effekte auf neutrophile Granulozyten *in vivo* treten schon bei Konzentrationen weit unterhalb der für die Blockade der

Na<sup>+</sup>-Kanäle notwendigen Konzentration auf. Während z.B. Lidocain für einen halbmaximalen Effekt bei der Blockade von Na<sup>+</sup>-Kanälen 50-100 µM benötigt, kann eine LA-Konzentration im Blut von 4-20 µM, wie sie nach Epiduralanästhesie oder LA-Infusion registriert wird, eine inhibierende Wirkung auf neutrophile Granulozyten ausüben [32], was alternative Signaltransduktionswege wahrscheinlich macht (Abb. 3). Im Gegensatz dazu benötigt man *in vitro* meist Wirkstoffkonzentrationen oberhalb klinischer Dosen [32]. Ein weiterer Hinweis auf die Existenz zusätzlicher Wirkmechanismen ist die Tatsache, dass neutrophile Granulozyten keine Na<sup>+</sup>-Kanäle auf ihrer Oberfläche besitzen [32].



**Abb. 3:**

Alternative Signaltransduktionswege von LA auf humane neutrophile Granulozyten (aus [7]). NHE:Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Austauscher, GPC-Rs: G-Protein gekoppelter Rezeptor, Ion-flux: Ionenstrom, PKC: Proteinkinase C, c-AMP: zyklisches Adenosinmonophosphat, α/β/γ: Untereinheiten des GTP-bindenden Proteins

Daher werden drei Hypothesen für alternative Angriffspunkte der LA am Beispiel des klinisch häufig verwendeten Aminoamids Lidocain vorgeschlagen [28]:

- 1) Lidocain (d-diethylamino-2,6-acetoxylylidid) agiert durch Insertion in den Lipid-Bilayer der Zellmembranen, ohne jedoch zur physikalischen Beeinträchtigung der Lipid/Lipid- oder der Lipid/Protein-Interaktion zu führen ;
- 2) Lidocain greift an einem membrangebundenen Rezeptor oder einem Rezeptor des Plasmalemmas an, was zu einer Dissoziation des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiports und somit zur Inhibition des Ionentransports während der Signalübertragung führt; und
- 3) Lidocain neutralisiert das Membranpotential des Plasmalemmas durch seine asymmetrische elektrostatische Einbettung.

Nietgen et al. konnten an *Xenopus*-Oozyten unspezifische Membraninteraktionen mit großer Wahrscheinlichkeit ausschließen [58].

#### 3.7.4 Wundheilungsstörungen

In verschiedenen Modellen hat Lidocain zu einer verzögerten Wundheilung geführt, die möglicherweise im Zusammenhang mit der Beeinträchtigung der Funktion neutrophiler Granulozyten zu sehen ist [18]. Dabei ist die funktionelle Hemmung dieser Abwehrzellen durch LA besonders in hohen Konzentrationen, wie sie beispielsweise bei der topischen Applikation erreicht werden (liegen in millimolarer Höhe [32]), von besonderer Bedeutung. Diese bedingen ein erhöhtes Infektionsrisiko bei Anwendung im Bereich von kontaminierten Wunden. Außerdem besteht der Verdacht, dass Lidocain *per se* antiinflammatorische Eigenschaften besitzt und somit durch eine reduzierte Wirkung proinflammatorischer Zytokine zu einer Verzögerung des Wundheilungsprozesses führt [61, 16]. Im Gegensatz dazu haben andere Untersuchungen direkte antimikrobielle Eigenschaften von LA *in vitro* und *in*

*vivo* gezeigt [32, 41], wobei der Mechanismus unbekannt ist und eine höhere, klinisch irrelevante Konzentration an LA voraussetzt.

#### 3.7.5 Ropivacain (S-) und Tetracain

Analog der Inhibition durch Lidocain, welches sowohl in der Leitungs- und Infiltrationsanästhesie Verwendung findet als auch in niedriger Dosierung als Antiarrhythmikum eingesetzt wird [67], konnte auch für andere LA ein ähnliches Wirkspektrum in Bezug auf die Beeinflussung der Funktion neutrophiler Granulozyten gefunden werden.

Das (S)-Propyl-Homolog von Bupivacain, das Aminoamid Ropivacain [73], fällt klinisch durch seine analgetischen und antiarrhythmischen Eigenschaften bei relativ geringem Nebenwirkungsprofil (relativ geringe Kardio- und Neurotoxizität) auf [36]. Unterschiede in der biologischen Aktivität sind durch die unterschiedliche dreidimensionale Struktur der beiden Enantiomeren bedingt, da der entsprechende Rezeptor ein chirales Zentrum besitzt und somit stereoselektiv ist [73].

Ein Beispiel für LA vom Aminoester-Typ stellt Tetracain (2-Dimethylaminoethyl-4-butylaminobenzoat) dar. Dieses LA anästhesiert effektiv topisch an mukösen Membranen [4, 67]. Es besitzt eine hohe analgetische Potenz, zeigt aber gleichzeitig die höchste Toxizität aller LA. In bisherigen Studien hemmt es weder die körpereigene Abwehr, noch begünstigt es evtl. auftretende Infektionen [4].

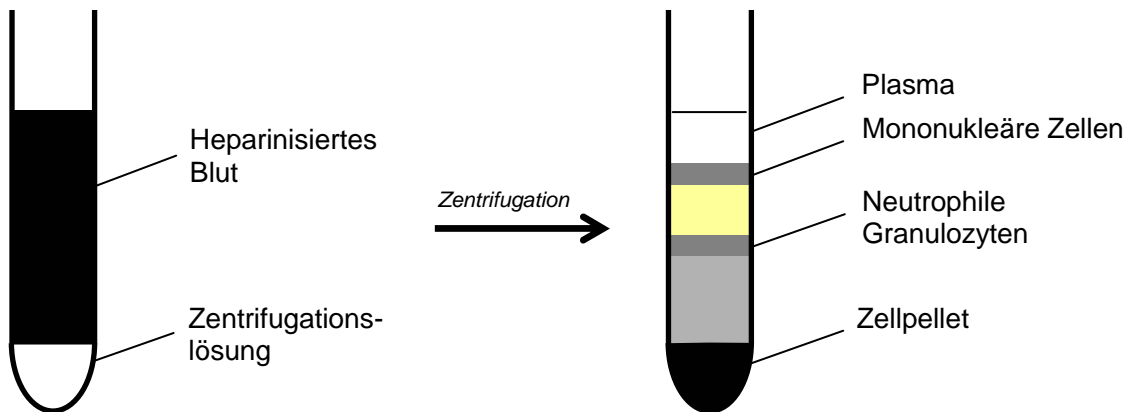
Aus dem oben gesagten wird deutlich, dass die Verwendung eines LA während eines inflammatorischen Geschehens nicht nur Vorteile mit sich bringen kann: Inhibition von Proliferation und Motilität der Zellen des Immunsystems kann – u.a. durch die abgeschwächte Funktion neutrophiler Granulozyten - zu einer Reduktion der körpereigenen Abwehr führen. Im Gegensatz dazu senkt die gehemmte metabolisch-oxidative Antwort eine überschießende Reaktion stimulierter neutrophiler Granulozyten.

### 4. MATERIAL UND METHODEN

Die Untersuchung wurde von der Ethikkommission der Universität von Virginia genehmigt.

#### 4.1 Separation neutrophiler Granulozyten

Neutrophile Granulozyten wurden aus dem venösen Blut freiwilliger, gesunder erwachsener Blutspender, die über einen Zeitraum von mindestens zwei Wochen keine Medikamente eingenommen hatten, gewonnen und nach der Methodik von Ferrante [20] isoliert. Hierbei werden nach einer Dichtegradientenzentrifugation des Blutes über einen Ficoll-Hypaque / Neutrophilen Isolationsmedium (NIM) / Polymorph-Gradienten bei 1500g über 40 Min., die das Plasma enthaltende Schicht sowie die Schicht mit mononukleärer Zellen und das übrig bleibende „Zellpellet“ entfernt, und die Schicht neutrophiler Granulozyten isoliert (Abb. 4). Diese, suspendiert in HBSS + Heparin (10 U/ml), werden dreimal bei 1000g zentrifugiert und erneut isoliert. Dieses Vorgehen reduziert den Plasmarest und mögliche dadurch entstehende „Priming“-Effekte auf ein Minimum. Die separierten Granulozyten wurden dann – unabhängig von ihrer weiteren Behandlung - in reinem HBSS auf eine Konzentration von  $10^6$  Zellen/ml resuspendiert und für eine Stunde bei 37°C mit oder ohne Zugabe von LA unter konstantem moderatem Schwenken in einer Wärmekammer inkubiert.



**Abb. 4:**  
Neutrophilenseparation mittels Dichtegradientenzentrifugation

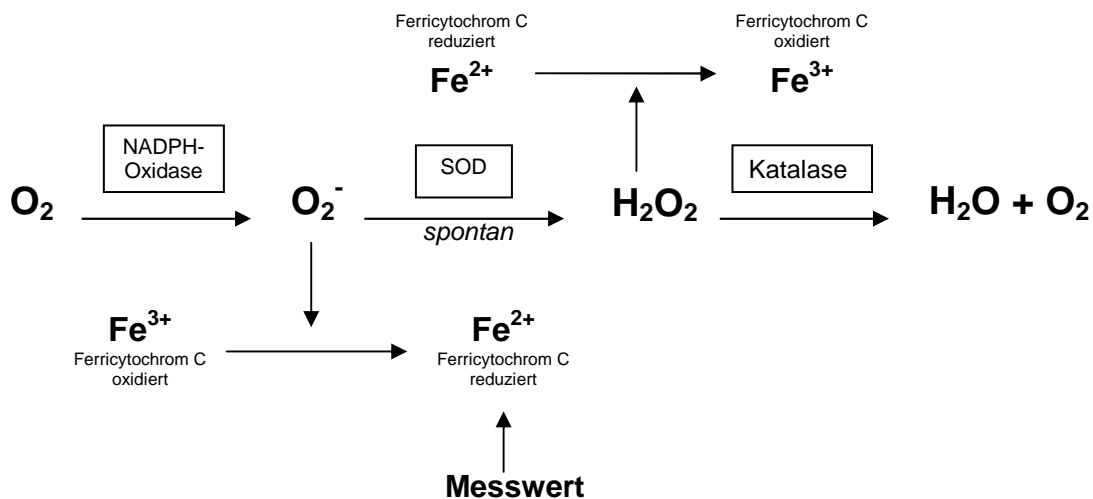
#### 4.2 Ferricytochrom C- Assay

Die Produktion und Sekretion von  $O_2^-$  wurde spektrophotometrisch (Genesys 5, Spectronic Instruments, Rochester, NY) mit Hilfe einer durch Superoxid-Dismutase (SOD)-inhibierbaren Reduktion von Ferricytochrom C (Cyt C) beobachtet [61].

200  $\mu$ l der Granulozyten-Suspension, verdünnt mit Hank's balancierter Salzlösung (HBSS) auf eine Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml, wurden dem Reaktionsgemisch, bestehend aus 700  $\mu$ l Puffer (HBSS + bovines Serumalbumin (BSA) 0.1%), 100  $\mu$ l Cyt C (gewonnen aus Pferdeherzen, 3.7 mg/ml) und Katalase (0.14 mg/ml), hinzugefügt. Auf gleiche Weise wurde eine „Leerprobe“ hergestellt, die zusätzlich zum Standardansatz 10  $\mu$ l SOD ( $10^{-2}$ M) enthält. „Priming“- und Aktivierungssubstanzen wurden zu dem Reaktionsgemisch mit einem endgültigen Gesamtvolumen von 1 ml gegeben. Anschließend wurde die Reduktion von Cyt C bei 550nm (Absorptionsmaximum des reduzierten Cyt C) während eines kontinuierlichen Assays gemessen. Hierbei wurde die durch  $O_2^-$ -Sekretion bewirkte Reduktion des Cyt C innerhalb eines definierten Zeitraums anhand der Differenz in der Absorption zwischen SOD- und nicht-SOD-enthaltenden Proben errechnet. SOD katalysiert die



Produktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$  aus  $\text{O}_2^-$ . Mit Hilfe dieses Enzyms konnte also in der „Leerprobe“ der Anteil der von  $\text{O}_2^-$  unterscheidbaren reduzierenden Substanzen (hauptsächlich ROM) ermittelt und die gemessene Absorption als „Nullwert“ definiert werden. Durch Subtraktion der Menge des spektrophotometrisch ermittelten reduzierten Cyt C in der „Leerprobe“ von dem gemessenen Wert in der eigentlichen Reaktionsküvette konnte selektiv die durch  $\text{O}_2^-$  verursachte Reduktion, als Indikator für die Aktivität der NADPH-Oxidase, bestimmt werden. Katalase degradiert  $\text{H}_2\text{O}_2$  in  $\text{H}_2\text{O}$  und  $\text{O}_2$  und wird oftmals derartigen Assays hinzugefügt, um zu verhindern, dass  $\text{H}_2\text{O}_2$  das reduzierte Cyt C reoxidiert (Abb. 5).



**Abb. 5:**

Prinzip des Ferricytochrom C - Assays (nach [33]). Nähere Angaben: siehe Text

### 4.3 Experimenteller Aufbau

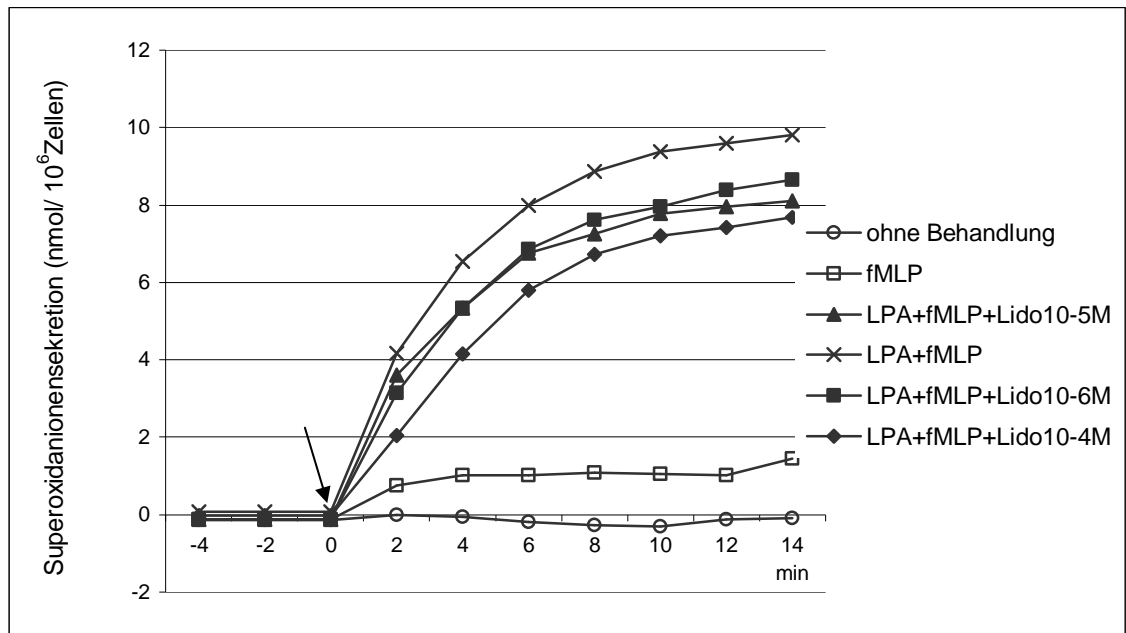
Die isolierten neutrophilen Granulozyten wurden mit HBSS zu einer Suspension mit einer Konzentration von  $10^6$  Zellen/ml verdünnt und für eine Stunde bei  $37^\circ\text{C}$  unter konstantem moderaten Schwenken inkubiert. Hiernach wurde die Granulozytensuspension zusammen mit dem Reaktionsgemisch auf die Messküvetten mit einem Gesamtvolumen von jeweils 1 ml verteilt und die

„Base-Line“-Produktion über 4 Min. registriert, um evtl. aufgetretene Aktivierungseffekte während der Granulozytenisolation aufzudecken. Anschließend wurden die „Priming“-Substanzen PAF bzw. LPA den Küvetten hinzugefügt. FMLP oder PMA, als Aktivierungsstimuli, wurden direkt nach dem „Priming“-Stimulus hinzugegeben und der zeitliche Verlauf der Ferricytochrom C -Reduktion über 14 min in jeweils 2 Minuten-Abständen aufgezeichnet (Abb.6). Die Veränderungen der Wellenlänge wurden in einer SOD- und einem Duplikat von nicht-SOD-enthaltenden Proben beobachtet. Mit Hilfe eines Konversionsfaktors (entspricht dem Unterschied im Extinktionskoeffizienten zwischen oxidiertem und reduziertem Ferricytochrom C bei 550 nm [40]) wurde anschließend die  $O_2^-$ -Sekretion berechnet.

In Vorversuchen wurde sichergestellt, dass weder die Inkubationszeit an sich noch das konstante Schwenken im Wasserbad Einfluss auf die Basisproduktion an  $O_2^-$  hat. Ebenso wurde eine direkte Beeinflussung des Ferricytochrom C- Assays durch LPA mit Hilfe einer Absorptionsmessung an einer mit LPA versetzten zellfreien Kontrollprobe ausgeschlossen. Außerdem wurde in separaten Versuchen festgehalten, dass das Reaktionsgemisch an sich - ohne Zugabe jeglicher „Priming“- oder Aktivierungssubstanzen - keine Auswirkungen auf die  $O_2^-$ -Produktion und -sekretion in humanen neutrophilen Granulozyten besitzt.

Der Vorteil des hier zunächst verwendeten kinetischen Assays (vgl. Abb. 6, nächste Seite) im Vergleich zu einem sogenannten Endpunkt-Assay war, dass sowohl die absolute Menge an sezerniertem  $O_2^-$  als auch der Zeitpunkt maximaler  $O_2^-$ -Freisetzung bestimmt werden konnte [35]. Dies war gerade bei einem direkten Vergleich zweier verschiedener „Priming“-Substanzen (z.B. PAF und LPA) von besonderer Bedeutung, da die Kinetik der  $O_2^-$ -Freisetzung in neutrophilen Granulozyten von den entsprechenden „Priming“- und Aktivierungsstimuli abhing. Im konkreten Fall zeigte sie eine nicht-lineare Bewegung [50], deren Maxima zu unterschiedlichen Zeitpunkten erreicht wurde.

#### 4. MATERIAL UND METHODEN



**Abb. 6:**

Beispielhafter Verlauf eines Versuchsansatzes mit einstündiger Lidocain (Lido)-Inkubation ( $10^{-6}\text{M}$  -  $10^{-4}\text{M}$ ). Pfeil: Zugabe des „Priming“- bzw. des Aktivierungsstimulus, „Priming“ mit Lysophosphatidylsäure (LPA)  $10^{-6}\text{M}$ , Aktivierung mit N-Formylmethionin-Leucin-Phenylalanin (fMLP)  $10^{-6}\text{M}$

### 4.4 Studienablauf

#### 4.4.1 Pilotstudien (vgl. Dissertationsschrift von B. Tigges, geb. Krumm)

##### a) Direkter Aktivierungseffekt von LPA

Im ersten Schritt wurde zunächst untersucht, ob LPA neutrophile Granulozyten direkt aktiviert. Es sollte sicher gestellt werden, dass die beobachteten Veränderungen in der  $O_2^-$ -Produktion durch oben beschriebenen „Priming“-Effekt und nicht durch eine direkte Wirkung potenziert wurden.

LPA zeigte - wie erwartet - keinen direkten Aktivierungseffekt bei neutrophilen Granulozyten: Die  $O_2^-$ -Sekretion erhöhte sich nicht signifikant im Vergleich zu unbehandelten Granulozyten.

##### b) Aktivierungseffekt von fMLP

Um den Potenzierungseffekt des LPA-„Primings“ abschätzen zu können, wurde das direkte Aktivierungsvermögen von fMLP getestet. Dazu wurde die Granulozytensuspension mit der Aktivierungssubstanz fMLP in verschiedenen Konzentrationen ( $10^{-8}M$  -  $10^{-4}M$ ) ohne Zugabe von LPA stimuliert und die  $O_2^-$ -Sekretion gemessen. Da eine direkte Aktivierung durch fMLP ( $10^{-6}M$ ) bereits bekannt war [68], diente dieser Ansatz gleichzeitig der Testung der Funktionstüchtigkeit unseres Versuchsaufbaus.

Im Vergleich zu unbehandelten neutrophilen Granulozyten zeigte sich die  $O_2^-$ -Sekretion in allen aktivierten Ansätzen erhöht. Das Maximum der  $O_2^-$ -Sekretion wurde durch eine Stimulation mit fMLP  $10^{-6}M$  nach einem Zeitintervall von 14 Min. erreicht. Im Rückschluss ließ dieses Ergebnis also auf eine positive interne Versuchskontrolle schließen und diente parallel dazu als Maßstab für den Grad der Potenzierung des „Respiratory Burst“ durch einen vorangestellten „Priming“-Prozess.

##### *c) Effekte des LPA-„Primings“ auf neutrophile Granulozyten*

In den folgenden Versuchen wurde die Potenzierung der  $O_2^-$ -Produktion durch LPA-„Priming“ untersucht: LPA wurde unterschiedlich lang (0,20,40,60 Min.) zusammen mit der Granulozytensuspension (Inkubationszeit der Granulozyten in jedem Versuchsansatz eine Std.) inkubiert, bevor der Aktivator fMLP hinzugefügt und die Messung mittels kontinuierlichem Ferricytochrom C-Assay über 14 Min. durchgeführt wurde. Ziel des Versuches war die Bestimmung der optimalen Inkubationszeit der potentiellen „Priming“- Substanz LPA.

Zugabe von LPA ( $10^{-4}M$ ) zu der Granulozytensuspension zu verschiedenen Zeitpunkten (60, 40, 20 min oder direkt vor Gabe von fMLP) vor der Aktivierung mit fMLP ( $10^{-6}M$ ) führte zu einer Steigerung der  $O_2^-$ -Sekretion gegenüber der Kontrollgruppe von unbehandelten Granulozyten und der direkt mit fMLP aktivierten Zellen in allen getesteten Zeitabschnitten. Das Ergebnis unterschied sich in den einzelnen Untergruppen nicht signifikant.

Insgesamt zeigen die Pilotstudien, dass die überproportionale Potenzierung der  $O_2^-$ -Produktion und -Sekretion nach Gabe eines zweiten Aktivierungsstimulus auf einem „Priming“- Effekt basiert.

##### 4.4.2 Effekte der LA auf LPA-„Priming“

##### *a) Nachweis der Hemmbarkeit des LPA-„Priming“-Effektes durch das LA Lidocain*

In den Pilotstudien war die direkt durch fMLP ( $10^{-6}M$ ) induzierte  $O_2^-$ -Sekretion in neutrophilen Granulozyten mit den Werten der durch LPA ( $10^{-4}M$ ) vorbehandelten Gruppe verglichen worden. Gleichzeitig wurde nun ein Anteil derselben Granulozytensuspension mit verschiedenen Konzentrationen Lidocain ( $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}M$ ) für eine Std. inkubiert, bevor „Priming“- (LPA ( $10^{-4}M$ )) und Aktivierungsstimulus fMLP ( $10^{-6}M$ ) hinzugefügt wurden.

##### *b) Sicherung des Angriffspunktes der LA durch den Versuch einer Inhibition der direkten Aktivierung mit fMLP*

Um sicher zu sein, dass LA den „Priming“- Effekt *per se* und nicht die direkte Aktivierung inhibieren, untersuchten wir den Einfluss der LA auf die direkt durch fMLP ( $10^{-6}$ M) provozierte  $O_2^-$  Sekretion in den Granulozyten. Dazu wurde Lidocain in einer Konzentration von  $10^{-4}$ M über eine Stunde mit der Granulozytensuspension inkubiert, bevor die Aktivierungssubstanz fMLP hinzugefügt und 14 Min. später die  $O_2^-$ -Produktion bestimmt wurde.

##### *c) Effekt verschiedener Inkubationszeiten der LA*

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss verschiedener Inkubationszeiten von Lidocain auf den LPA -„Priming“-Effekt untersucht. Wie in den Pilotstudien wurde die gesamte Granulozytensuspension für eine Std. bei 37°C inkubiert. Ein Teil dieser Suspension wurde nach dem Beispiel anderer Arbeitsgruppen [61, 52] 10 Min., ein weiterer Anteil 60 Min. mit Lidocain ( $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ M) versetzt, bevor „Priming“- und Aktivierungssequenz folgten. Ziel war es einen Unterschied in der Hemmfähigkeit der LA durch verschiedene Inkubationszeiten darzustellen. In einem zusätzlichen Ansatz wurde Lidocain mit einer Konzentration von  $10^{-5}$ M erst 2 Min. nach Zugabe der „Priming“- und Aktivierungssubstanz hinzugegeben, um zu untersuchen, ob das LA einen bereits eingeleiteten „Respiratory Burst“ hemmen konnte.

##### *d) Vergleich der Hemmwirkung verschiedener LA auf den „Respiratory Burst“*

Die nächste Testreihe sollte zeigen, ob es einen Unterschied in der Hemmung des „Respiratory Burst“ zwischen den verschiedenen LA-Typen gibt. Dazu wurden LA vom Amid-Typ (Lidocain, Ropivacain (S-)) mit Tetracain, einem LA vom Ester-Typ, verglichen (alle in Konzentrationen von  $10^{-6}$ M -  $10^{-4}$ M). Vor Zugabe der „Priming“- und Aktivierungsstimuli (LPA  $10^{-4}$ M und fMLP  $10^{-6}$ M)

wurden alle ausgewählten LA über eine Std. zusammen mit den Granulozyten bei 37°C inkubiert. Ein solch paralleles Vorgehen hatte den Vorteil, dass man neben dem potentiellen Inhibierungseffekt des „Respiratory Burst“ durch jedes einzelne LA gleichzeitig auch einen Vergleich der Wirkstärke aller getesteten LA im Hinblick auf die Hemmstärke erhielt.

##### e) „Priming“-Kontrolle mit PAF

Als interne Positivkontrolle für den „Priming“-Effekt wurde die bereits in zahlreichen Untersuchungen getestete Substanz PAF verwendet [7, 62]. Wie Pilotstudien zeigten, musste PAF hierbei 10 Min. vor Zugabe des Aktivierungsstimulus in einer Konzentration von  $10^{-6}$  M zu der Granulozytensuspension gegeben werden und mit dieser zusammen bei 37°C inkubiert werden. Nach der Gesamtinkubationszeit von 60 Min. wurde fMLP ( $10^{-6}$  M) hinzugefügt und der Cyt C-Assay über 14 Min. aufgezeichnet. Darüber hinaus wurde untersucht, inwieweit die mit Hilfe dieses „Priming“- Vorgangs provozierte  $O_2^-$ -Produktion durch eine einstündige Präinkubation mit  $10^{-4}$  M Lidocain hemmbar ist.

#### 4.4.3 Mechanismus des LPA-Signalweges

##### a) PMA als Aktivatorsubstanz

In den folgenden Versuchen wurde die Aktivatorsubstanz fMLP durch PMA ersetzt. Dieser Phorbolster wirkt als direkter Aktivator der PKC intrazellulär und konnte somit im Falle einer Inhibierbarkeit durch Lidocain weitere Rückschlüsse auf die Angriffsstelle von LA zulassen [70]. Zunächst wurde die direkte Wirkstärke des Aktivators PMA allein getestet. Die  $O_2^-$ -Sekretion der Kontrollgruppe (LPA  $10^{-4}$ M + fMLP  $10^{-6}$ M) wurde gleich 100% gesetzt und mit dem Resultat der PMA-aktivierten ( $10^{-6}$ M) Granulozyten verglichen. Gleichzeitig wurde ein Anteil der gleichen Granulozytensuspension mit Lidocain ( $10^{-4}$  M)

versetzt und ebenfalls 1 Std. bei 37°C inkubiert, bevor mit PMA ( $10^{-6}$  M) der „Respiratory Burst“ induziert wurde.

#### 4.5 Substanzen

1-Oleoyl-2-hydroxy-*sn*-glycero-3-Phosphat (Natriumsalz, LPA), Superoxid Dismutase (SOD) (EC 1.15.1.1), Ferricytochrom C (Cyt. C), Katalase (EC 1.11.1.6), Polymyrinstat Azetat (PMA) und N-Formylmethionin-Leucin-Phenylalanin (fMLP) wurden von Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA), Lidocain, Tetracain und S(-)Ropivacain von AstraZeneca Pharmaceuticals LP (Westborough, MA, USA), Hank's balancierte Salzlösung (HBSS, ohne Phenolrot, mit  $\text{Ca}^{++}$ /  $\text{Mg}^{++}$ ) von Bio-Whittaker (Walkersville, MD, USA), und Heparin-Natrium 10.000 USP Units/ml von Fujisawa (Deerfield, IL, USA) erworben. Bovines Serum-Albumin (BSA) und Mono-Poly resolving Medium (Ficoll-Hypaque) wurden von ICN Biomedicals Inc. (Aurora, Ohio, USA), 1-step Polymorphs von Accurate Chemical & Scientific Corp (Westbury, NY, USA), und das Neutrophilen-Isolationsmedium (NIM) von Cardinal Associates (Santa Fe, NM, USA) bezogen. Den Plättchen-aktivierenden Faktor (PAF) lieferte Avanti Polar-Lipids (Alabaster, AL, USA).

Die Lokalanästhetika wurden in HBSS, LPA / PAF in HBSS + BSA (1%), und fMLP, Cyt. C, und Katalase in HBSS + BSA (0,1%) gelöst.



### 4.6 Berechnungen und statistische Analyse

Die metabolische Aktivität behandelter neutrophiler Granulozyten wurde als prozentuelle Abweichung von einer Kontrollgruppe ohne spezielle Präparation (Mittel  $\pm$  SEM) präsentiert. Analysen wurden mit Hilfe des „One-Way-ANOVA“, gefolgt von dem „Student-t-Test“ oder „Pairwise Multiple Comparison Procedure“ („Dunn’s Method“), durchgeführt. Für alle statistischen Analysen wurde Jandel SigmaStat Version 2.0 benutzt.

Alle Ergebnisse sind als prozentuale Abweichungen von einer Kontrollgruppe, die für 1 Std. bei 37°C inkubiert wurde, bevor LPA in einer Konzentration von  $10^{-4}$  M bzw. PAF in einer Konzentration von  $10^{-6}$ M und anschließend fMLP ( $10^{-6}$ M) oder PMA ( $10^{-6}$ M) hinzugefügt wurde, dargestellt. Dieser Kontrollwert besteht aus dem prozentuellen Mittel aller Versuche, die mit dieser Gruppe durchgeführt wurden. Für jedes einzelne Experiment wurden die erhaltenen Werte der Kontrollgruppe gleich 100% gesetzt.

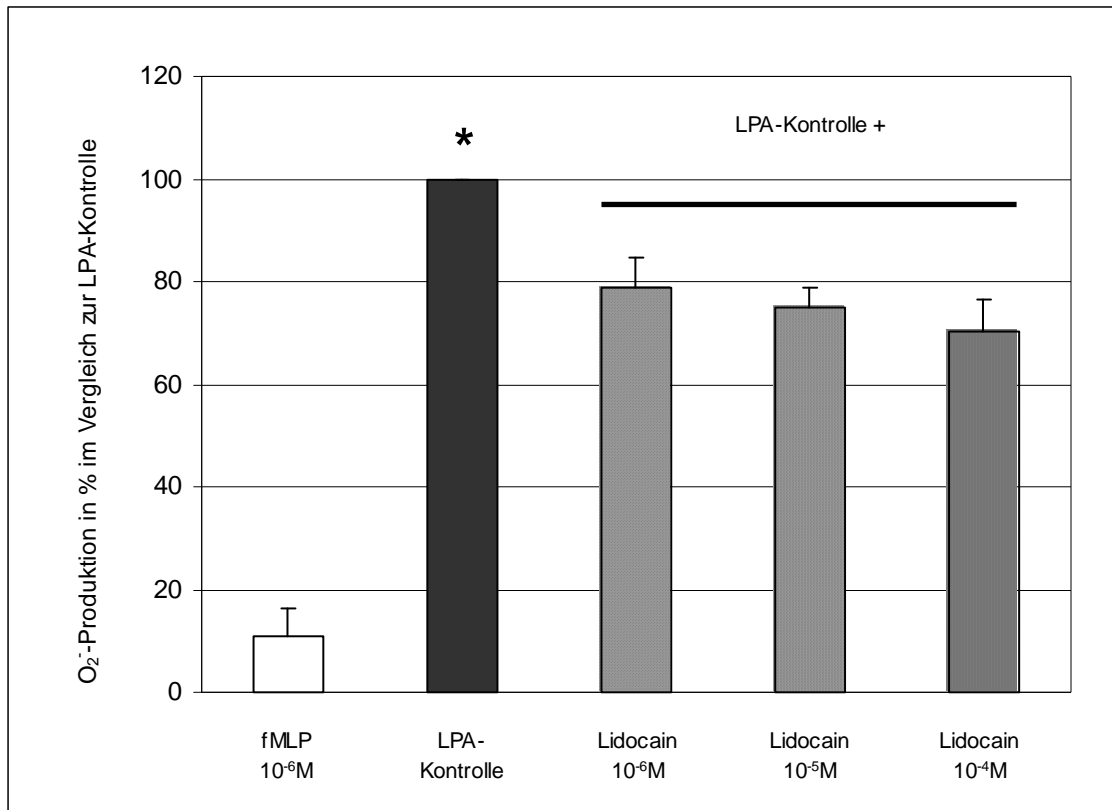
## 5. ERGEBNISSE

### 5.1 Effekte von Lokalanästhetika auf LPA-„Priming“

#### a) Nachweis der Hemmbarkeit des LPA-„Priming“-Effektes durch das LA Lidocain

Eine Inkubation der Granulozytensuspension über eine Std. mit Lidocain ( $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ M) vor Zugabe von LPA ( $10^{-4}$ M) und fMLP ( $10^{-6}$ M) verminderte die  $O_2^-$ -Sekretion im Vergleich zu der LPA-Kontrollgruppe ( $p < 0,05$ ), die nur mit LPA und fMLP stimuliert wurde (Abb. 7, nächste Seite). Die Ergebnisse der verschiedenen Lidocain-Konzentrationen unterschieden sich nicht signifikant, zeigten jedoch einen konzentrationsabhängigen Trend. Ein beispielhafter Verlauf dieses Versuchsansatzes ist in Abb. 6 (Seite 30) aufgeführt.

Trotz der Inkubation mit Lidocain war die  $O_2^-$ -Produktion dieser Ansätze noch immer größer als die der nur mit fMLP stimulierten Zellen, was darauf schließen ließ, dass der „Priming“-Effekt nur partiell inhibiert werden konnte.



**Abb. 7:**

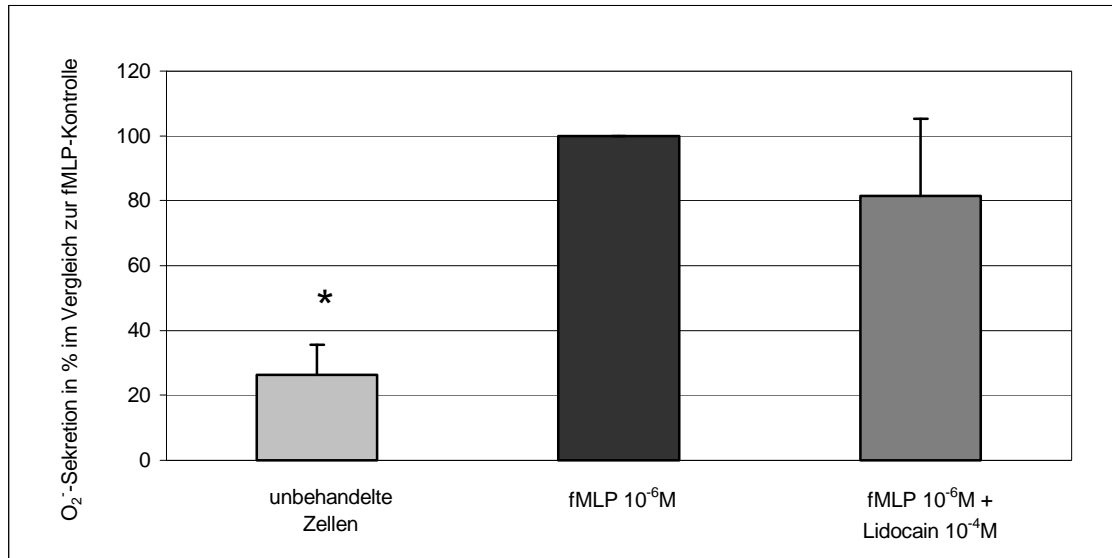
Einfluss einer einstündigen Inkubation mit Lidocain in verschiedenen Konzentrationen auf die Superoxidanionensekretion (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) humaner neutrophiler Granulozyten. Im Vergleich dazu O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Sekretion in direkt mit N-Formylmethionin-Leucin-Phenylalanin (fMLP) stimulierten Zellen. LPA-Kontrolle: Lysophosphatidylsäure (LPA) 10<sup>-4</sup>M + fMLP 10<sup>-6</sup>M

\*: p < 0,05 vs. Lidocain-Ansätze und fMLP 10<sup>-6</sup>M

b) Sicherung des Angriffspunktes der LA durch den Versuch einer Inhibition der direkten Aktivierung mit fMLP

Im Gegensatz zu einer durch ein „Priming“ getriggerten O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Produktion in neutrophilen Granulozyten, zeigte Lidocain (10<sup>-4</sup>M) nach einer einstündigen Inkubation mit der Zellsuspension im Falle einer alleinigen direkten Aktivierung mit fMLP (10<sup>-6</sup>M) keinen hemmenden Einfluss auf den „Respiratory Burst“ (Abb. 8, nächste Seite). Dieser hielt sich in der gleichen Größenordnung wie in den direkt stimulierten Granulozyten und war größer als in der unbehandelten

Gruppe ( $p < 0,05$ ). Schlussendlich konnte mit diesem Versuchsansatz gezeigt werden, dass LA keinen inhibierenden Einfluss auf die direkte Aktivierung haben, wohl aber auf den „Priming“- Effekt.



**Abb. 8:**

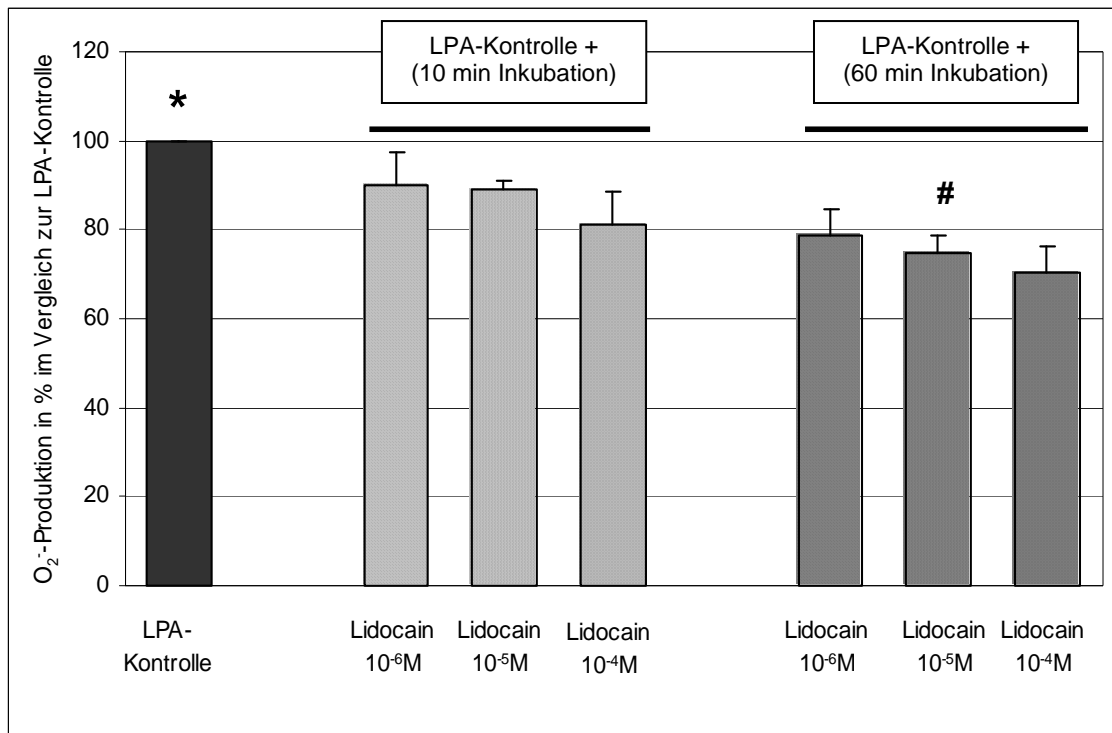
Einfluss einer einstündigen Inkubation mit Lidocain auf die Superoxidanionen-Sekretion ( $O_2^-$ ) in direkt mit N-Formylmethionin-Leucin-Phenylalanin (fMLP) stimulierten neutrophilen Granulozyten. Im Vergleich dazu  $O_2^-$ -Produktion in unbehandelten Zellen.

\*:  $p < 0,05$  vs. fMLP und fMLP + Lidocain

### c) Effekt verschiedener Inkubationszeiten der LA

Im Vergleich zu einer 10-minütigen Inkubation der Granulozytensuspension mit Lidocain ( $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ M) war nach einer 60-minütigen Inkubation die Hemmung der  $O_2^-$ -Sekretion größer (Abb. 9, nächste Seite). Dieser Unterschied war jedoch nur bei einer LA-Konzentrationen von  $10^{-5}$  M signifikant ( $p < 0,05$ ), in den anderen Konzentrationen war nur ein Trend erkennbar.

Applikation des LA ( $10^{-5}$  M) 2 Min. nach dem Aktivierungsstimulus zeigte keinen Einfluss auf die Aktivität des „Respiratory Burst“.



**Abb. 9:**

Einfluss der Inkubationszeit von Lokalanästhetika verschiedener Konzentrationen auf die Superoxidanionen-Sekretion (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) humaner neutrophiler Granulozyten. LPA-Kontrolle: Lysophosphatidylsäure (LPA) 10<sup>-4</sup>M + N-Formylmethionin-Leucin-Phenylalanin (fMLP) 10<sup>-6</sup>M

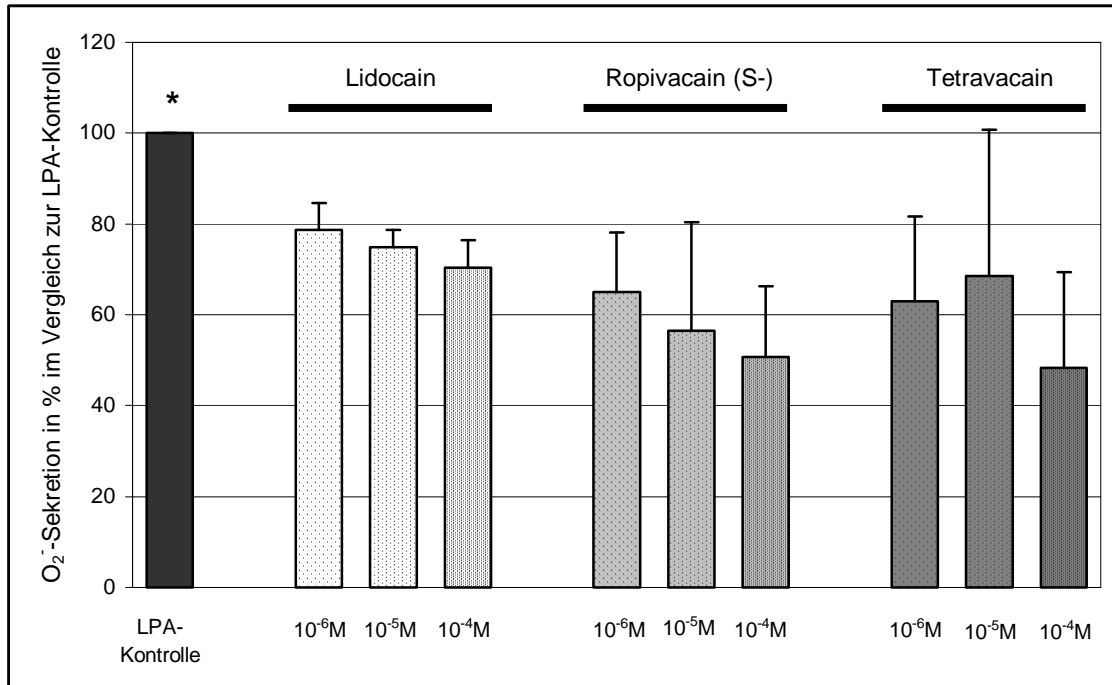
\*: p < 0,05 vs. Lidocain-Ansätze mit 10 min Inkubation/ 60 min Inkubation,

#: p < 0,05 vs. Lidocain 10<sup>-5</sup>M mit 10 min Inkubation

d) Vergleich der Hemmwirkung verschiedener LA auf den „Respiratory Burst“

Sowohl Lidocain und Ropivacain (S-) als Vertreter der LA vom Amid-Typ, als auch Tetracain als Vertreter der LA vom Ester-Typ zeigten in allen untersuchten Konzentrationen (10<sup>-6</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-4</sup>M) nach 1 Std. Inkubation mit der Granulozytensuspension eine Hemmung der O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Produktion im Vergleich zur Kontrollgruppe (p < 0,05), die nur mit LPA (10<sup>-4</sup>M) und fMLP (10<sup>-6</sup>M) stimuliert wurde (Abb. 10, nächste Seite). Die Ergebnisse der verschiedenen Konzentrationen innerhalb einer LA-Gruppe unterschieden sich nicht signifikant, zeigten jedoch größtenteils einen konzentrationsabhängigen Trend mit der größten Inhibition bei einer Konzentration von 10<sup>-4</sup>M: so suppressierte Lidocain

nach einstündiger Inkubation die provozierte Reaktion maximal auf  $70 \pm 4,0\%$ , Ropivacain (S-) auf  $49 \pm 4,4\%$  und Tetracain auf  $48 \pm 7,0\%$ .



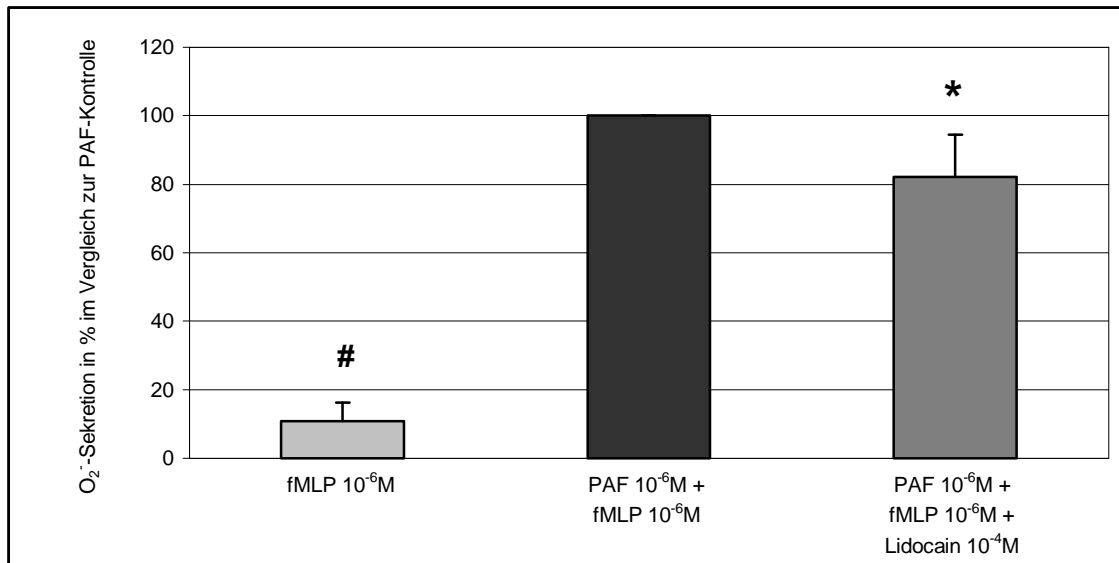
**Abb. 10:**

Hemmwirkung verschiedener Lokalanästhetika nach einstündiger Inkubation mit humanen neutrophilen Granulozyten auf die Superoxidanionen (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)-Sekretion. LPA-Kontrolle: Lysophosphatidylsäure (LPA) 10<sup>-4</sup>M + N-Formylmethionin-Leucin-Phenylalanin (fMLP) 10<sup>-6</sup>M. Alle LA-Ansätze sind nach einer Stunde Inkubation mit LPA-Kontrolle stimuliert worden.

\*: p < 0,05 vs. jegliche Lidocain-/ Ropivacain (S-) -/ Tetracain-Ansätze.

#### e) Positive „Priming“-Kontrolle durch PAF

„Priming“ mit PAF (10<sup>-6</sup>M) für 10 Min. vor fMLP-Stimulation (10<sup>-6</sup>M) führte erwartungsgemäß zu einer gesteigerten O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Sekretion (p < 0,05) im Vergleich zur einfachen Stimulation der Granulozyten mit fMLP (Abb. 11, nächste Seite). Diese ließ sich wiederum durch einstündige Präinkubation mit Lidocain (10<sup>-4</sup>M) senken (p < 0,05). Die interne Versuchskontrolle fiel also positiv aus.



**Abb. 11:**

Hemmwirkung von Lidocain auf die Superoxidanionen-Sekretion (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) humaner neutrophiler Granulozyten, die mit Plättchen-aktivierendem Faktor (PAF) „geprimt“ und mit N-Formylmethionin-Leucin-Phenylalanin (fMLP) aktiviert wurden. Im Vergleich dazu O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Sekretion in direkt mit fMLP stimulierten Zellen.

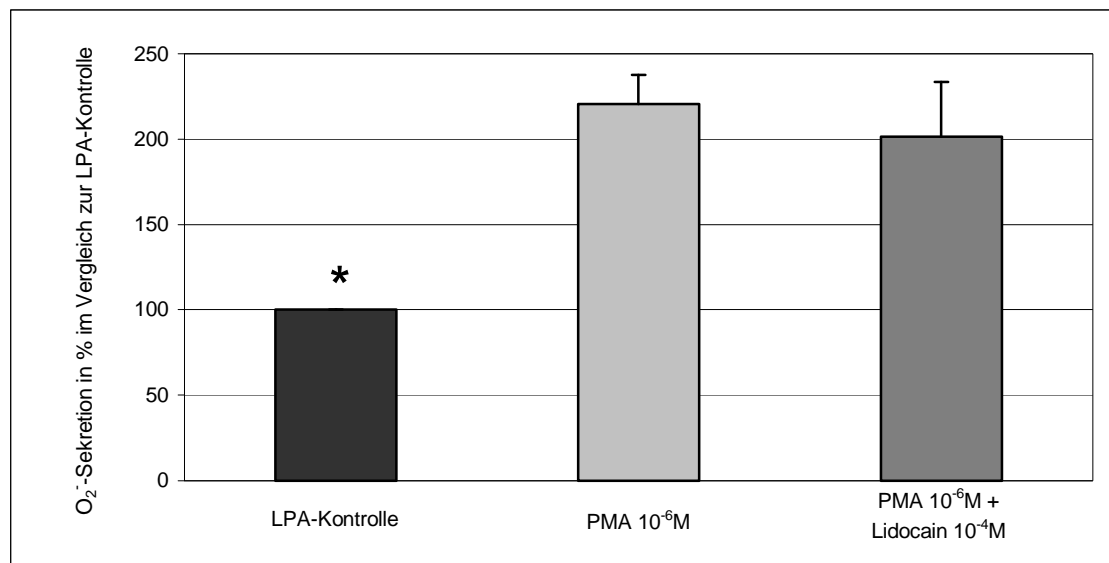
#: p < 0,05 vs. PAF + fMLP und PAF + fMLP + Lidocain

\*: p < 0,05 vs. PAF + fMLP

## 5.2 Mechanismus des LPA-Signalweges

### PMA als Aktivatorsubstanz

Die O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Produktion der direkt mit PMA (10<sup>-6</sup>M) stimulierten Granulozyten war höher als die der LPA-Kontrollgruppe (p < 0,05) (Abb. 12, nächste Seite). Eine Zugabe von Lidocain (10<sup>-4</sup>M) während der einstündigen Inkubationszeit führte allerdings nicht zu einer Reduktion der direkt provozierten Antwort.



**Abb. 12:**

Superoxidanionen ( $O_2^-$ )-Sekretion nach direkter Aktivierung humaner neutrophiler Granulozyten mit Polymyristat Azetat (PMA) im Vergleich zur LPA-Kontrolle (Lysophosphatidylsäure (LPA)  $10^{-4}M$  + N-Formylmethionin-Leucin-Phenylalanin (fMLP)  $10^{-6}M$ ), bzw. Hemmfähigkeit von Lidocain auf diese Reaktion.

\*:  $p < 0,05$  vs. PMA  $10^{-6}M$  / PMA  $10^{-6}M$  + Lidocain  $10^{-4}M$ .

Zugabe von LPA in einer Konzentration von  $10^{-4}M$  zu den mit PMA ( $10^{-6}M$ ) stimulierten Zellen führte zu keiner weiteren Potenzierung des „Respiratory Burst“.



### 6. DISKUSSION

#### 6.1 Diskussion des Versuchsaufbaus

In dem hier verwendeten *in vitro*- Modell über die metabolische Aktivität humaner neutrophiler Granulozyten und deren Inhibierbarkeit durch den Einsatz verschiedener LA wurde ein spektrophotometrischer Ferricytochrom C- Assay zur Messung der sezernierten Superoxidanionen ( $O_2^-$ ) gewählt. Vorteil dieser Methodik ist die ausschließliche Registration der in das extrazelluläre Mikromilieu sezernierten  $O_2^-$ . Im Gegensatz dazu registriert die ansonsten ebenso etablierte Chemilumineszenz nicht nur die sezernierte Menge an  $O_2^-$ , sondern auch die in den Leukozyten verbliebenen ROM, die nicht für eine direkte Gewebsschädigung verantwortlich gemacht werden können.

Um die experimentellen Ergebnisse möglichst zu standardisieren, wurden die Messungen mit einem kinetischen Assay begonnen. Durch die kontinuierliche Detektion der Absorptionsänderung im Cyt C-Assay über 20 Min., konnte gezeigt werden, dass das Maximum der  $O_2^-$ -Sekretion in neutrophilen Granulozyten infolge eines vorherigen „Priming“- Vorgangs mit LPA ( $10^{-4}M$ ) und einer anschließenden Aktivierung mit fMLP ( $10^{-6}M$ ) bei 14 Min. lag. Ein solches Vorgehen war aufgrund der vorher nicht bekannten Kinetik der Reaktionspartner in diesem Versuchsansatz erforderlich und ermöglichte uns im Weiteren die nachfolgenden Experimente mit Hilfe eines praktikableren Endpunktassays durchzuführen.

Desweiteren konnte durch einen 6-minütigen spektrophotometrischen Vorlauf vor Zugabe der „Priming“- und Aktivierungsstimuli eine interne Präparationskontrolle der neutrophilen Granulozyten durchgeführt werden. Sollte es in der Zeit zwischen Materialgewinnung und Versuchsbeginn auf irgendeiner Stufe zu einer Aktivierung der Zellen gekommen sein, so würde sie in diesem Vorlauf auffällig und das Experiment abgebrochen.

Mit Hilfe des Zusatzes von SOD und Katalase zu dem eigentlichen Cyt C- Assay konnte eine höhere Spezifität für  $O_2^-$  als Ursache der Absorptionsänderung erreicht werden. Dabei katalysierte SOD die weitere

Umwandlung der sezernierten  $O_2^-$  zu Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) und schaffte so eine Vergleichsbasis zu der  $O_2^-$ - Sekretion in nicht mit SOD versetzten Proben. Katalase hingegen verhinderte die Reoxidation des durch  $O_2^-$  reduzierten Ferricytochroms C durch Umwandlung des  $H_2O_2$  in Wasser und molekularen Sauerstoff.

Durch ständig gleiche Aufgabenverteilung der Untersucher wurde der Erhalt einer gewissen Stabilität in der Versuchsdurchführung versucht. Dennoch blieb die spektrophotometrische Messung ein manuelles Verfahren, das vom Untersucher und seiner „Tagesform“ abhängig war. Eine Optimierung in Form eines immer gleich bleibenden Zeitintervalls wäre beispielsweise durch eine Automatisierung des Einzugs der Messproben in das Spektrophotometer möglich gewesen. Ebenso konnte nicht verhindert werden, dass die isolierten neutrophilen Granulozyten sowohl in der Phase zwischen Blutgewinnung und Inkubation als auch während der Messung eine Abkühlung auf Raumtemperatur erfahren haben. Durch Klimatisierung des Labors auf von der Wetterlage unabhängig gleichbleibende Temperaturen wurde dieser Einfluss jedoch bei jedem Versuchsansatz konstant gehalten.

Weitere Bestrebungen dienten der Konstanz der Versuchsergebnisse in Abhängigkeit von individuellen Variablen, beispielweise in Form der freiwilligen Blutspender. Vorversuche zeigten eine veränderte Reagibilität der Zellen, die von allergisch veranlagten Spendern stammten. Wir entschlossen uns daher, derartig veranlagte Individuen vom Spenderpool auszuschließen. Ebenso wurde mit Spendern verfahren, die unter einer ständigen Medikation standen.

### 6.2 Diskussion der Ergebnisse

#### 6.2.1 Darstellung der eigenen Ergebnisse

Mit der Versuchsreihe konnte gezeigt werden, dass LA einen durch „Priming“ und Aktivierung provozierten „Respiratory Burst“ in humanen neutrophilen Granulozyten supprimieren können.

Aufbauend auf Pilotstudien in Zusammenarbeit mit Herrn B. Tigges (geb. Krumm) nutzten wir LPA als „Priming“- und fMLP als Aktivierungsstimulus. In dieser ersten Versuchsphase konnte nachgewiesen werden, dass LPA als Lipidmediator Einfluss auf die metabolische *in vitro*- Aktivität neutrophiler Granulozyten besitzt: die „Priming“- Fähigkeit von LPA in einer Konzentration von  $10^{-4}$ M führte im Falle des Hinzutretens eines direkten Aktivators wie beispielsweise fMLP ( $10^{-6}$ M) zu einer größeren Produktion und Freisetzung von  $O_2^-$  als man es durch den direkten Stimulus alleine erwartet hatte. Dabei übte LPA an sich - ohne einen entsprechenden direkten Aktivator - jedoch keinen messbaren stimulierenden Effekt auf diese Zellen aus.

Hauptaspekt meiner Untersuchungsreihe war die Inhibition einer derartig provozierten  $O_2^-$ -Produktion und -Sekretion in neutrophilen Granulozyten durch Zusatz von LA *in vitro*. Dieser Effekt zeigte neben einer Abhängigkeit von der Art und der Inkubationszeit der LA mit der Granulozytensuspension auch eine Abhängigkeit von der Konzentration des verwendeten LA. Sowohl Lidocain und Ropivacain (S-) als Vertreter der LA vom Amid-Typ als auch Tetracain als Vertreter der LA vom Ester-Typ (alle in Konzentrationen von  $10^{-6}$ M bis  $10^{-4}$ M) zeigten den stärksten inhibitorischen Effekt bei einer Konzentration von  $10^{-4}$ M unter einer Inkubationszeit von einer Stunde (im Vergleich zu einer 10-minütigen Inkubation). Hierbei erwies sich Tetracain vor Ropivacain und Lidocain als inhibitorisch stärkste Substanz. Im Gegensatz zur Vorbehandlung mit LA zeigte sich bei Zugabe des LA zwei Min. nach der Aktivierungssequenz keine Hemmung des bereits eingeleiteten „Respiratory Burst“.

Festzuhalten gilt weiterhin, dass einzig Lidocain in einer Konzentration von  $10^{-5}$ M nach einer einstündigen Inkubation eine signifikant stärkere

Suppression der  $O_2^-$ - Sekretion bewirkte als nach einer 10-minütigen Inkubation, wohingegen bei den anderen getesteten LA lediglich ein Trend erkennbar war.

Im Gegensatz zu einer „geprimten“ Antwort ließ sich eine direkt stimulierte Reaktion mit fMLP  $10^{-6}M$  (ohne vorherige Zugabe von LPA) durch Lidocain selbst in einer Konzentration von  $10^{-4}M$  nicht beeinflussen. Dieses Ergebnis sprach für einen inhibitorischen Einfluss der LA auf der Ebene des „Priming“-Prozesses und gegen eine direkte Hemmung der Aktivierung. Diese Hypothese wurde außerdem dadurch unterstützt, dass nicht nur eine durch LPA potenzierte Reaktion, sondern auch eine mit PAF „geprimte“  $O_2^-$ - Sekretion durch LA supprimierbar war.

Insgesamt war die Höhe der durch LA reduzierten  $O_2^-$ - Sekretion nach „Priming“ und Aktivierung in beiden Fällen jedoch weiterhin größer als der direkt durch fMLP provozierte „Respiratory Burst“. Da also keine vollkommene Aufhebung des „Priming“- Effektes erreicht werden konnte, liegt die Vermutung nahe, dass ein über bioaktive Lipide vermittelter „Priming“- Prozess verschiedenen Signaltransduktionsrouten unterliegt. Möglichkeiten diesbezüglich sind beispielsweise verschiedene Rezeptorsysteme oder unspezifische Membraninteraktionen.

Nach Austausch des Aktivierungsstimulus fMLP gegen PMA als direkten Aktivator der PKC, einem in der Signalkaskade der NADPH-Oxidase-Aktivierung weiter distal gelegenen Enzym, konnte ein erheblich größerer Wert für die  $O_2^-$ - Sekretion während des Ferricytochrom C- Assays gemessen werden. Da der Angriffspunkt hierbei dem Ziel-Enzymkomplex NADPH-Oxidase wesentlich näher war, die Signalübertragung also direkter geschah, ist dieses Ergebnis nicht überraschend. Die Gabe von LA zu diesem Versuchsansatz hatte keinen Einfluss auf die  $O_2^-$ - Sekretion, folglich muss die Suppression des „Respiratory Burst“ durch LA oberhalb der PKC stattfinden.

### 6.2.2 Vergleich der Resultate mit Ergebnissen anderer publizierter Studien

Neben den Ergebnissen dieser Studie, die auf eine antiinflammatorische Wirkung von LA hinwiesen, führten auch andere Gruppen weitere entzündungshemmende Effekte von LA *in vitro* auf. So wurde beispielsweise demonstriert, dass eine Inkubation von LA mit neutrophilen Granulozyten, die durch Lipopolysaccharid (LPS) stimuliert wurden, die Mediatorfreisetzung (z.B. LTB<sub>4</sub>, IL-1a) inhibiert [69]. Dies führte aufgrund einer gestörten Zell-Zellkommunikation bei relativem Mediatormangel zu einer verminderten Migrationsbewegung der Entzündungszellen an den Ort des eigentlichen Reizes. Außerdem konnten Ohsaka et al. zeigen, dass noch eine weitere Voraussetzung für die Migration, die Adhäsion von Leukozyten am Endothelium, durch LA unterdrückt werden kann [61]. Grund hierfür ist eine herabgesetzte CD11b/ CD18- Expression auf neutrophilen Granulozyten, die als Mitglieder der Integrin-Familie für die Adhärenz der Leukozyten am Endothel verantwortlich sind.

Folglich könnte eine Gewebsschädigung durch den Einsatz von LA zum einen direkt durch eine verminderte Produktion an ROMs und zum anderen indirekt über eine verminderte Rekrutierung von Leukozyten an den Entzündungsort reduziert werden. In der klinischen Praxis können diese Erkenntnisse eventuell Hinweise auf die Möglichkeit einer Modulation exzessiver Entzündungsprozesse geben.

Hauptaspekt dieser Untersuchungsreihe war die Darstellung der supprimierenden Wirkung von Ester- und Amid-LA auf eine durch LPA-„Priming“ potenzierte metabolische Reaktion humaner neutrophiler Granulozyten.

Hinweise auf einen derartigen negativen Einfluss von LA auf eine durch LPA provozierte Reaktion ergaben sich schon bei Studien an *Xenopus*-Oozyten. Hierbei handelt es sich um ein Modell, bei dem Ionenströme an der Membran von Frosch-Oozyten gemessen werden. Der Vorteil dieser Zellen liegt in ihrer Größe: sie sind so groß, dass man zum einen bestimmte Substanzen gezielt ins Zellinnere injizieren, zum anderen dadurch provozierte Ionenströme

(Ca<sup>++</sup>-abhängige Cl<sup>-</sup>-Einströme) direkt an der Zellmembran über Elektroden erfassen kann.

Im Xenopusoozyten-Modell erschien eine direkte Wechselwirkung von LA mit LPA unwahrscheinlich. QX314 beispielsweise, ein permanent geladenes und damit membran-impermeables Lidocain-Analogon, wirkte nur nach intrazellulärer Injektion hemmend auf den durch LPA verursachten Ionenstrom [70], während dieses Phospholipid von extrazellulär über einen Rezeptor anzugreifen schien [70, 34]. Auch eine Interaktion von LA mit LPA in seiner Albuminbindung konnte von Tigyi et al. im Xenopus-Oozytenmodell ausgeschlossen werden [74]. Vielmehr wurde hier ein unveränderter Ionenstrom nach extrazellulärer LPA-Applikation gemessen, falls dem ebenfalls im umgebenen Medium befindlichen LA keine Vorinkubationszeit mit der Eizelle gegeben wurde.

Nietgen et al. zeigten, dass Lidocain und Bupivacain im Oozytenmodell konzentrationsabhängig (jedoch nur bei relativ hohen LA- Konzentrationen im millimolaren Bereich) hemmend auf den LPA-Signalweg wirken, mit der Folge, dass die Ionenströme über der Oozytenmembran abnahmen [58]. Interessanterweise geschah dies, ohne dass der intrazelluläre Ca<sup>++</sup>-Signalweg beeinflusst wurde. Ionenströme, die durch intrazellulär appliziertes IP<sub>3</sub> ausgelöst wurden, konnten durch LA nicht gehemmt werden. Da IP<sub>3</sub> in diesem Fall erwiesenermaßen zum Signaltransduktionsweg der durch LPA provozierten Reaktion gehörte und intrazellulär Ca<sup>++</sup> freisetzte, deutete also vieles daraufhin, dass die Hemmung der Signalweiterleitung oberhalb dieses Schrittes auf Höhe des Rezeptors bzw. dem daran gekoppelten G-Protein (sprich: intrazellulär) stattfand.

Für einen intrazellulären Angriffspunkt sprachen außerdem weitere Versuche am Xenopus-Oozytenmodell, in denen QX314 - intrazellulär injiziert - eine Inhibition der durch LPA provozierten Antwort erbrachte, wohingegen eine extrazelluläre Applikation keine Wirkung zeigte [34]. Desweiteren ergab diese Studie nach Injektion von Antisens-Oligonukleotiden gegen bestimmte G-Protein- $\alpha$ -Untereinheiten, dass QX314 nach LPA-Stimulation sogar selektiv mit

der  $G\alpha_q$ - Untereinheit von G-Proteinen und damit nur indirekt mit dem dazugehörigen Rezeptor interagiert.

Wurden Benzocain, ein permanent ungeladenes LA, und QX314 (jeweils  $10^{-6}$  -  $10^{-2}$ M) gemeinsam intrazellulär appliziert [70], so konnte ein synergistischer inhibitorischer Effekt auf einen durch LPA induzierten Ionenstrom über die Oozytenmembran verzeichnet werden. Dies ließ auf zwei unterschiedliche Angriffsstellen - beispielsweise für geladene und ungeladene LA - schließen [47], da ansonsten nur ein additiver Effekt zu erwarten gewesen wäre. Im Gegensatz zu Hollmann et al. demonstrierten Sullivan et al., dass LA den LPA-Rezeptor an sich funktionell blockierten [70]. Weder Benzocain noch QX314 konnten hier bei Zusatz eines permanenten Aktivators für G-Proteine ( $GTP_{\delta}S$ ) eine Hemmung der so provozierten Reaktion erzielen, was für eine Inhibition proximal der GTP-Bindung, wahrscheinlich im Sinne einer Rezeptor-Blockade spricht.

Festzuhalten ist jedoch, dass Grundlage der beiden letzten Studien LPA-Rezeptoren waren, die von Amphibien statt von humanen Zellen stammten. Außerdem wurden Lokalanästhetika eingesetzt, die eine gezielte Ladung aufwiesen und eine Reaktion beobachtet, die direkt durch LPA provoziert wurde und nicht das Produkt eines LPA-„Primings“ darstellte.

Letztlich kann auch eine unspezifische Membraninteraktion, wie sie für bioaktive Lipide typisch ist [54], nicht ausgeschlossen werden. Durch eine parallele Existenz der beiden möglichen Angriffspunkte von LPA (spezifische Interaktion mit LPA-Rezeptoren und unspezifische Membraninteraktionen), wie man dies auch bei strukturell nah verwandten Phospholipiden wie PAF beobachtet [54], könnte erklärt werden, warum mit Hilfe der LA nur eine Suppression und keine vollkommene Inhibition der durch LPA getriggerten Antwort gelingt. Grundvoraussetzung für diese Hypothese ist, dass LA nur an einen Rezeptor bzw. dem dazugehörigen G-Protein binden.

Nach Abschluss der experimentellen Phase dieser Dissertation erbrachten verschiedene Autoren den Nachweis der Existenz humaner LPA-Rezeptoren [37]. Mit Hilfe der Klontechnik entdeckten sie insgesamt acht G-Protein gekoppelte Lysophospholipid-Rezeptoren, die als „Endotheliale

Differenzierungsgene“ (Edg 1-8) bezeichnet wurden, da sie erstmalig aus humanen Endothelzellen der Umbilikalvene isoliert wurden. Drei von ihnen erwiesen sich im Nachhinein als LPA-spezifisch. So wurde aus Edg-2 LPA<sub>1</sub>, aus Edg-4 LPA<sub>2</sub> und aus Edg-7 LPA<sub>3</sub> [14]. Nähere Untersuchungen zeigten, dass von diesen drei Proteinen nur der LPA<sub>2</sub>-Rezeptor auf Leukozyten nachweisbar war [1]. Interessanterweise scheint auch der PAF-Rezeptor in ferner Verwandtschaft mit den Edg-Proteinen zu stehen [14].

Leider ist bisher kein spezifischer LPA<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonist isoliert worden, mit dessen Hilfe die „Priming“-Fähigkeit von LPA in direkter Weise verifiziert werden konnte. Lediglich für LPA<sub>1</sub>- und LPA<sub>3</sub>-Rezeptoren wurden Antagonisten beschrieben [31].

Bezüglich der weiter distal gelegenen intrazellulären LPA-Signaltransduktionsroute konnten Sullivan et al. mit Hilfe des direkten PKC-Aktivators PMA eine Inhibition der durch LPA direkt provozierten Antwort in *Xenopus*-Oozyten erreichen [70], während in unserem Granulozytenmodell kein signifikanter Unterschied nach Zugabe von PMA zu einem eingeleiteten „Priming“-Vorgang mit LPA zu verzeichnen war. Auch hier gilt es zu berücksichtigen, dass Sullivan et al. mit *Xenopus*-Oozyten gearbeitet und mit Ionenstromänderungen eine direkte Reaktionsform nach LPA-Stimulation beobachtet haben. Dabei könnte der hemmende Einfluss von PMA auf die direkte LPA-Antwort in *Xenopus*-Oozyten mit einer PKC-bedingten Phosphorylierung und konsekutiven Deaktivierung bestimmter LPA-Rezeptoren erklärt werden. In unserem Versuchsansatz war die Zeitspanne zwischen Zugabe des PMA und „Priming“ mit LPA wahrscheinlich zu kurz, um eine Modulation der Rezeptorfunktion durch Phosphorylierung zu erreichen.

Zusammengefasst fand sich allerdings sowohl in diesem Versuchsansatz [70] als auch in unseren Untersuchungen kein Hinweis auf eine intrazelluläre Beeinflussung des LPA-Signaltransduktionsweges durch LA.

Wie auch in unserer Untersuchungsreihe provozierten Hollmann et al. mit Hilfe von PMA einen konzentrationsabhängig vermehrten „Respiratory Burst“ in humanen neutrophilen Granulozyten, wobei sie ein Maximum bei einer Konzentration von  $10^{-7}$ M fanden [33]. Ein vorangestelltes „Priming“ durch PAF



erhöhte nur die anfängliche Anstiegsgeschwindigkeit der  $O_2^-$ -Sekretion, nicht jedoch das absolute Maximum im Vergleich zur alleinigen direkten Aktivierung mit PMA. Im Gegensatz zu unserer Studie umfasste der Beobachtungszeitraum hier allerdings 50 Minuten, wobei nach einer Beobachtungszeit von 14 Minuten aufgrund der anfänglich höheren Anstiegsgeschwindigkeit - begründet mit dem frühzeitigen Einsetzen der „Priming“- Wirkung von PAF - ein vermehrter „Respiratory Burst“ registriert werden konnte. Erklärung des im Endresultat nicht weiter steigerbaren „Respiratory Burst“ durch ein solches vorangegangenes „Priming“ könnte mit einer gleichzeitigen „Priming“- und Aktivierungsfähigkeit des PMAs gegeben werden, wobei der „Priming“-Effekt dieser Substanz erst verspätet einsetzt. In diesem Fall würde PAF nur für eine Beschleunigung des „Priming“-Vorgangs in der Anfangsphase der Reaktion sorgen [33]. Allerdings änderten sich in diesem Versuchsansatz die jeweils durch PMA provozierten Reaktionen nach Zugabe von LA nur unwesentlich [33]. Dies könnte ebenfalls als Hinweis darauf zu sehen sein, dass LA den „Priming“- Prozess nicht distal der PKC beeinflussen.

Hattori et al. beobachteten die Hemmfähigkeit von acht verschiedenen LA in Bezug auf eine direkt durch PMA provozierte  $O_2^-$ -Produktion in humanen neutrophilen Granulozyten [29]. Die dabei gefundenen relativen Inhibitionsstärken der verschiedenen LA glich in ihrer Reihenfolge der unsrigen: Tetravacain > S(-) Ropivacain > Lidocain (in allen getesteten Konzentrationen). Dabei gilt es jedoch zu beachten, dass diese Gruppe eine vollkommene Suppression der  $O_2^-$ -Produktion erreichte, dazu jedoch auch bedeutend höhere Konzentrationen an LA benutzte (1-200 mM). Eine Ausnahme stellte dabei Ropivacain dar, mit dessen Hilfe nur eine partielle Suppression gelang. Wie in unseren Experimenten wurde auch hier nur das klinisch relevante (S-) - Enantiomer verwendet, so dass eventuell der fehlende allosterische Effekt für die verminderte Wirkstärke verantwortlich gemacht werden kann. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen jedoch, zeigten Hattori et al., dass eine Erhöhung der LA-Konzentration nicht nur zu einer Abschwächung des „Peaks“ in der  $O_2^-$ -Produktion führte, sondern außerdem auch eine Verzögerung der maximalen  $O_2^-$ -Produktion verursachte. Ein möglicher Erklärungsversuch könnte die

entsprechende Methodik sein, wobei in diesem Fall die Chemilumineszenz gewählt wurde, welche außer der extrazellulären Sekretion auch die intrazelluläre Superoxidanionenproduktion berücksichtigt. Interessant an der Reihenfolge der Hemmstärke der verschiedenen LA ist, dass sie abhängig von der Lipidlöslichkeit der Substanzen und damit proportional zu der relativen Potenz einer Nervenblockade zu sein scheint. Wie Versuche mit Veratridin (VTD), einem Na<sup>+</sup>-Kanal-Aktivator, belegten [29], ist dabei jedoch die Qualität der Hemmwirkung dieser Substanzklasse unabhängig vom Na<sup>+</sup>-Einstrom.

In einer unserer Versuchsreihe ähnlichen Untersuchung benötigte Hyvonen et al. 2-8 mg/ml Lidocain (1000-fach höhere Konzentration als die von uns benutzte), um den „Respiratory Burst“ zu hemmen [36]. Ursächlich hierfür können die unterschiedlichen „Priming“- und Aktivierungssubstanzen sein. So wurde hier Hydroxyapatit als „Priming“- und PMA als Aktivierungssagens eingesetzt.

Mikawa et al. befanden Lidocain und Mepivacain sogar als ineffektiv in Bezug auf die Hemmung der O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Produktion in humanen neutrophilen Granulozyten [52]. Im Gegensatz zu unserem Protokoll, benutzten sie opsoniertes Zymosan als „Priming“-Agens und hielten eine LA-Inkubationszeit von nur 10 Min. ein.

Die Untersuchungen von Peck et al. hingegen zeigten nach einer LA-Inkubationszeit von nur 15 Min. eine deutliche Hemmung der O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Produktion, hervorgerufen durch eine direkte Aktivierung mit PMA oder opsonierten Zymosan [63]. Die hier gewählte Konzentration an Lidocain war mit 5,5×10<sup>-3</sup> M allerdings deutlich höher als die von uns gewählte, die gerade so hoch war wie die, die beispielsweise nach einer Spinalanästhesie im Blut erreicht wird (100-200 µM [74]).

Alle drei Beispiele demonstrieren, dass der Erfolg der Suppression der O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Produktion in humanen neutrophilen Granulozyten von den verwendeten „Priming“- und Aktivierungssubstanzen abhängig ist, die eine unterschiedliche Sensitivität auf die verschiedenen LA aufzuweisen scheinen. Auch die Konzentration und Inkubationszeit der LA mit den Leukozyten ist dabei wahrscheinlich von großer Bedeutung [27].

„Kontraproduktiv“ - im Sinne einer Funktion als direkter Entzündungsmediator - erwies sich im Rahmen einer *in vivo*-Studie an Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen allein Ropivacain [3]. In unseren *in vitro*-Versuchen jedoch bewies auch diese Substanz eine hemmende Wirkung auf die  $O_2^-$ -Produktion.

### 6.2.3 Hemmung der metabolischen Aktivität neutrophiler Granulozyten durch andere Substanzgruppen als LA

Mit unseren Versuchen konnten wir zeigen, dass LA hemmend auf den „Respiratory Burst“ und die  $O_2^-$ - Sekretion in humanen neutrophilen Granulozyten wirken. Aber auch andere Substanzgruppen lassen ähnliche Effekte erkennen.

In einer *ex vivo* Studie konnten Heine et al. ähnliche Wirkungen an neutrophilen Granulozyten von Patienten, die eine Narkose durch intravenös appliziertes Propofol durchlaufen haben, feststellen [30]. Hierbei wurde zwei und vier Stunden nach Einleitung der intravenösen Narkose heparinisertes Blut abgenommen und einer Aktivierungssequenz mit TNF- $\alpha$  und fMLP zugeführt. Der Anteil an neutrophilen Granulozyten mit einer „Respiratory Burst“- Aktivität wurde mit Hilfe intrazellulärer Oxidation von Dihydrorhodamin gemessen. Ähnlich wie bei uns konnte im Vergleich zu den  $O_2^-$ - Werten vor Propofolgabe sowie auch im weiteren Verlauf zeitabhängig eine Inhibition der  $O_2^-$ - Produktion beobachtet werden.

Rocks et al. konnten - ebenfalls in einem *ex vivo* Modell - die Hemmfähigkeit von Dexamethason auf den „Respiratory Burst“ neutrophiler Granulozyten der Maus nachweisen [65]. Zur Stimulation der Entzündungszellen *in vivo* wurde in diesem Fall eine LPS-Inhalation genutzt. *Post mortem* wurde die  $O_2^-$ -Produktion mittels Messung der intrazellulären Oxidation von Dichlor-Dihydrofluorescein-Diazetat abgeschätzt. Es zeigte sich, dass Dexamethason in einer Dosierung von 10 mg/ kg Körpergewicht nach einmaliger intratrachealer oder intraperitonealer Applikation eine Stunde vor und sogar auch eine Stunde nach LPS- Provokation zu einer deutlichen

Suppression des „Respiratory Burst“ führte. Im Vergleich dazu konnte N-Acetylcystein, ein bekanntes intrazelluläres Antioxidant, auch in hohen Dosen (500 mg/ kg) keine Reduktion der spontanen  $O_2^-$ -Produktion *ex vivo* bewirken.

Ein weiteres Beispiel für eine medikamentöse Beeinflussung des „Respiratory Burst“ liefern Dunzendorfer et al. [17]. Sie untersuchten die inhibitorische Fähigkeit des Beta-Blockers Metoprolol auf eine durch fMLP ( $10^{-6}M$ ) oder PMA ( $2,5 \times 10^{-7}M$ ) provozierte intra- und extrazelluläre  $O_2^-$ -Produktion in humanen neutrophilen Granulozyten. Hier war die fluometrische Messung der Oxidation von Dichlorfluorescein-Diazetat Methode der Wahl. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen konnten sie mit diesem Antihypertensivum ( $0,3-300 \times 10^{-6}M$ ) sowohl bei fMLP als auch bei PMA eine Inhibition der provozierten Reaktion nachweisen. Wie Versuche mit dem Beta-Rezeptor- Agonisten Orciprenalin erkennen ließen, war dieser Effekt nicht Adrenozeptor-vermittelt und zeigte sowohl Zeit- als auch Konzentrationsabhängigkeit von dem verwandten Beta-Blocker.

Zusammenfassend scheint die Inhibition der metabolischen Aktivität neutrophiler Granulozyten nicht auf LA beschränkt zu sein. So konnte in vorangestellten Beispielen gezeigt werden, dass auch andere Substanzgruppen in ähnlichen experimentellen Arrangements eine Hemmung des „Respiratory Burst“ bewirken können. Wie erwartet lässt sich auch hier in den meisten Versuchsansätzen eine Konzentrations- und Zeitabhängigkeit der verschiedenen Substanzen erkennen.

### 6.3 Zusammenfassung

Insgesamt zeigt die vorliegende Studie erstmals, dass LPA ein „Priming“-Agens für die metabolische Aktivität humaner neutrophiler Granulozyten *in vitro* darstellt. Nach zusätzlicher direkter Aktivierung durch einen zweiten Stimulus kam es zu einer stark gesteigerten O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Produktion. Durch vorherige Inkubation der Leukozyten mit verschiedenen LA in klinisch relevanten Konzentrationen konnte dieser Effekt supprimiert werden.

Zusammen mit den weiteren bereits erläuterten antiinflammatorischen Effekten der LA auf neutrophile Granulozyten (verminderte Mediatorfreisetzung, reduzierte endotheliale Adhäsion), können die Resultate dieser Studie zur Erklärung der protektiven Wirkung dieser Substanzklasse *in vivo* dienen und gleichzeitig veranschaulichen, warum bei Betrachtung eines Einzelaspektes *in vitro* höhere Konzentrationen für eine Suppression benötigt werden als dies für antiinflammatorische Effekte *in vivo* notwendig ist.

Schon Wirkstoffspiegel im Blut wie sie beispielsweise nach epiduraler Applikation erreicht werden, können gewebsschützend wirken: Beispiele hierfür sind die schützenden Effekte von LA im Falle von chemisch, hyperoxämisch oder durch Endotoxin induzierten pulmonalen Erkrankungen [12], die Herabsetzung der mikrovaskulären Permeabilität [56], die die Grundlage von Erkrankungen wie z.B. dem „Adult Respiratory Distress Syndrome“ (ARDS), Sepsis, Verbrennungen und Peritonitis darstellt, und die Verminderung der Größe der myokardialen Narbe nach Myokardinfarkt [76].

Obwohl einzelne Berichte über direkte bakterizide Wirkungen von LA existieren [66], muss darauf hingewiesen werden, dass (bedingt durch ihren Wirkmechanismus) lokal applizierte LA die körpereigene Abwehr – zumindest hochkonzentriert im Bereich der Injektionsstelle – in erheblicher Weise schwächen können, was zu einem erhöhten Infektionsrisiko führen kann [64].

Zusammenfassend liegt die klinische Relevanz unserer Untersuchungsreihe in der Modulation von Entzündungsreaktionen, die durch unterschiedliche Reize wie beispielsweise Operationen oder Schock (welche mit einem „Priming“- Prozess verbunden sind) provoziert werden können. Dabei

handelt es sich um sterile Entzündungsprozesse, in denen die inflammatorische Reaktion der hauptsächlichste pathogenetische Faktor ist.

Natürlich sind vor einer klinischen Anwendung noch zahlreiche Untersuchungen notwendig, die insbesondere den Signaltransduktionsweg, die Rolle der existenten LPA-Rezeptoren und deren Antagonisten abklären sollten.

## 7. LITERATURVERZEICHNIS

**1:**

An S, Bleu T, Hallmark OG, Goetzl EJ (1998) Characterization of a novel subtype of human G Protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid. *J Biol Chem* 273: 7907-10

**2:**

Anderson BO, Harken AH (1990) Multiple organ failure inflammatory priming and activation sequences promote autologous tissue injury. *J Trauma* 30 (12 Suppl): S 44-9 (Übersichtsarbeit)

**3:**

Arlander E, Ost A, Stahlberg D, Lofberg R (1996) Ropivacaine gel in active distal ulcerative colitis and proctitis - a pharmacokinetic and exploratory clinical study. *Aliment Pharmacol Ther* 10(1): 73-81

**4:**

Barker W, Rodeheaver GT, Edgerton MT, Edlich RF (1982) Damage to tissue defenses by a topical anesthetic agent. *Ann Emerg Med* 11(6): 307-10

**5:**

Bass DA, Mc Phail LC, Schmitt JD, Morris-Natschke S, Mc Call CE, Wykle RL (1988) Selective priming of rate and duration of the respiratory burst of neutrophils by 1,2-diacyl and 1-O-alkyl-2-acyl diglycerides. Possible relation to effects on protein kinase C. *J Biol Chem* 263(36): 19610-7

**6:**

Bass DA, Olbrantz P, Szejda P, Seeds MC, McCall CE (1986) Subpopulations of neutrophils with increased oxidative product formation in blood of patients with infection. *J Immunol* 136: 860-6

**7:**

Botha AJ, Moore FA, Moore EE, Kim FJ, Banerjee A, Peterson VM (1995) Postinjury neutrophil priming and activation: An early vulnerable window. *Surgery* 118(2): 358-64; discussion 364-65

**8:**

Boulay F, Tardif M, Bouchon L, Vignais P (1990) The human N-formylpeptide receptor. Characterization of two cDNA isolates and evidence for a new subfamily of G-protein-coupled receptors. *Biochemistry* 29(50): 11123-33

**9:**

Brazil TJ, Rossi AG, Haslett C, McGorum B, Dixon PM, Chilvers ER (1998) Priming induces functional coupling of N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine receptors in equine neutrophils. *J Leukoc Biol* 63(3): 380-8

**10:**

Chan CK, Durieux ME (1997) Differential inhibition of lysophosphatidate signaling by volatile anesthetics. *Anaesthesiology* 86(3): 660-69

**11:**

Chanock SJ, el Benna J, Smith RM, Babior BM (1994) The respiratory burst oxidase. *J Biol Chem* 296(40): 24519-22. (Übersichtsarbeit)

**12:**

Chettibi S, Lawrence AJ, Stevenson RD, Young JD (1994) Effect of lysophosphatidic acid on motility, polarization and metabolic burst of human neutrophils. *FEMS Immunol Med Microbiol* 8(3): 271-81

**13:**

Chollet-Martin S, Montravers P, Gilbert C, Elbim C, Desmots JM, Fagon JY, Gougerot-Pocidalo MA (1992) Subpopulation of hyperresponsive polymorphonuclear neutrophils in patients with adult respiratory distress syndrome: role of cytokine production. *Am Rev Respir Dis* 146: 990-6

**14:**

Chun J, Goetzl EJ, Hla T, Igarashi Y, Lynch KR, Moolenaar W, Pyne S, Tigyi G (2002) International Union of Pharmacology. XXXIV. Lysophospholipid receptor nomenclature. *Pharmacol Rev* 54(2): 265-9

**15:**

Condliffe AM, Kitchen E, Chilvers ER (1998) Neutrophil priming: pathophysiological consequences and underlying mechanisms. *Clin Sci (lond)* 94(5):461-71. (Übersichtsarbeit)

**16:**

Davies B, Guyuron B, Husami T (1991) The role of lidocaine, epinephrine and flap elevation in woundhealing after chemical peel. *Ann Plast Surg* 26(3): 273-8

**17:**

Dunzendorfer S, Wiedermann CJ (2000) Modulation of neutrophil migration and superoxide anion release by metoprolol. *J Mol Cell Cardiol* 32(6): 915-24

**18:**

Durieux ME (1999) Anesthetics interactions with lysophosphatidate signaling. Proefschrift

**19:**

Durieux ME, Lynch KR (1993) Signalling properties of lysophosphatidic acid. *Trends Pharmacol Sci* 14(6): 249-54. (Übersichtsarbeit)



**20:**

Ferrante A, Thong YH (1980) Optimal conditions for simultaneous purification of mononuclear and polymorphonuclear leucocytes from human blood by the Hypaque-Ficoll method. *J Immunol Methods* 36(2): 109-17

**21:**

Follin P, Briheim G, Dahlgren C (1991) Mechanisms in neutrophil priming: Characterization of the oxidative response induced by formylmethionyl-leucyl-phenylalanine in human exudated cells. *Scand J Immunol* 34(3): 317-22

**22:**

Fourcade O, Simon MF, Viode C, Rugani N, Leballe F, Ragab A, Fournie B, Sarda L, Chap H (1995) Secretory phospholipase A2 generates the novel lipid mediator lysophosphatidic acid in membrane microvesicles shed from activated cells. *Cell* 80(6): 919-27

**23:**

Gay JC (1993) Mechanisms and regulation of neutrophil priming by platelet-activating factor. *J Cell Physiol* 156(1): 189-97

**24:**

Gay JC, Beckman JK, Zaboy KA, Lukens JN (1986) Modulation of neutrophil oxidative responses to soluble stimuli by platelet-activating factor. *Blood* 67(4):931-6

**25:**

Guo Z, Liliom K, Fischer DJ, Bathurst IC, Tomei LD, Kiefer MC, Tigyi G (1996) Molecular cloning of a high-affinity receptor for the growth factor-like lipid mediator lysophosphatidic acid from *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(25): 14367-72

**26:**

Guthrie LA, McPhail LC, Henson PM (1984) Priming of neutrophils for enhanced release of oxygen metabolites by bacterial lipopolysaccharide: Evidence for increased activity of the superoxide producing enzyme. *J Exp Med* 160(6): 1656-71

**27:**

Hahnenkamp K, Theilmeier G, Van Aken HK, Hoenemann CW (2002) The effects of local anesthetics on perioperative coagulation, inflammation, and microcirculation. *Anesth Analg* 94: 1441-7

**28:**

Haines KA, Reibman J, Callegari PE, Abramson SB, Philips MR, Weissmann G (1990) Cocaine and its derivatives blunt neutrophil functions without influencing phosphorylation of 47-kilodalton component of the reduced nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate oxidase. *J Immunol* 144(12): 4757-64

**29:**

Hattori M, Dohi S, Nozaki M, Niwa M, Shimonaka H (1997) The inhibitory effect of local anesthetics on superoxide generation of neutrophils correlate with their partition coefficients. *Anesth Analg* 84(2): 405-12

**30:**

Heine J, Jaeger K, Osthaus A, Weingaertner N, Munte S, Piepenbrock S, Leuwer M (2000) Anaesthesia with propofol decreases FMLP-induced neutrophil respiratory burst but not phagozytosis compared with isoflurane. *Br J Anaesth* 85(3): 424-30

**31:**

Heise CE, Santos WL, Schreihofner AM, Heasley BH, Mukhin YV, Macdonald TL, Lynch KR (2001) Activity of 2-substituted lysophosphatidic acid (LPA) analogs at LPA receptors: discovery of a LPA1/LPA3 receptor antagonist. *Mol Pharmacol* 60(6): 1173-80

**32:**

Hollmann MW, Durieux ME (2000) Local anesthetics and the inflammatory response: A new therapeutic indication? *Anesthesiology* 93(3): 858-75. (Übersichtsarbeit)

**33:**

Hollmann MW, Gross A, Jelacin N, Durieux ME (2001) Local anesthetic effects on priming and activation of human neutrophils. *Anesthesiology* 95: 113-22

**34:**

Hollmann MW, Wieczorek KS, Berger A, Durieux ME (2001) Local anesthetic inhibition of G protein-coupled signaling by interference with  $G_{\alpha q}$  protein function. *Molecular Pharmacology* 59(2): 294-301

**35:**

Humphries GM (1988) Multisample photometric biochemical analysis using Vmax and SOFTmax. *Biotechniques* 6(4): 354-60

**36:**

Hyvonen PM, Kowolik MJ (1998) Dose-dependent suppression of the neutrophil respiratory burst by lidocaine. *Acta Anaesthesiol Scand* 42 (5):565-9

**37:**

Im DS, Heise CE, Harding MA, George SR, O'Dowd BF, Theodorescu D, Lynch KR (2000) Molecular cloning and characterization of a lysophosphatidic acid receptor, Edg-7, expressed in prostate. *Mol Pharmacol* 57(4): 753-9

**38:**

Ingraham LM, Coates TD, Allen JM, Higgins CP, Baehner RL, Boxer LA (1982) Metabolic, membrane, and functional responses of human polymorphonuclear leukocytes to platelet-activating factor. *Blood* 59(6): 1259-66

**39:**

Jalink K, van Corven EJ, Moolenaar WH (1990) Lysophosphatidic acid, but not Phosphatic acid, is a potent  $Ca^{++}$ -mobilizing stimulus for fibroblasts. *J Biol Chem* 265(21):12232-9

**40:**

Kanbara T, Tomoda MK, Sato EF, Ueda W, Manabe M (1993) Lidocaine inhibits priming and protein tyrosine phosphorylation of human peripheral neutrophils. *Biochem Pharmacol* 45(8):1593-8

**41:**

Kanta J, Kopacova L, Patocova M, Bartos F (1984) Effect of carbanilate local anesthetics on granulation tissue formation. *Pol J Pharmacol Pharm* 36(6): 65-63

**42:**

Karow T, Lang R (1999) Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Druckerei F. Hansen, Bergisch-Gladbach, 7. Aufl., S 361

**43:**

Kinley J (1996) Neutrophils. Arctic, New York, 1. Aufl., S. 2-4, 149-222

**44:**

Koh JS, Lieberthal W, Heydrick S, Levine JS (1998) Lysophosphatidic acid is a major serum survival factor for murine macrophages which acts via the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway. *J Clin Invest* 102(4):716-27

**45:**

Krause KH, Demaurex N, Jaconi M, Lew DP (1993) Ion channels and receptor-mediated  $Ca^{2+}$  influx in neutrophil granulocytes. *Blood Cells* 19: 165-73

**46:**

Krause PJ, Maderazo EG, Bannon P, Kosciol K, Malech HM (1988) Neutrophil heterogeneity in patients with blunt trauma. *J Lab Clin Med* 112: 208-15

**47:**

Liliom K, Murakami-Murofushi K, Kobayashi S, Murofushi H, Tigyi G (1996) *Xenopus* oocytes express multiple receptors for LPA-like lipid mediators. *Am J Physiol* 270(3Pt1): C772-77

**48:**

Lüllmann H, Mohr K, Ziegler A (1990) Taschenatlas der Pharmakologie. Georg Thieme Verlag Stuttgart New York, 1. Aufl, S 188-193

**49:**

Mariano F, Guida G, Donati D, Tetta C, Cavalli PL, Verzetti G, Piccoli G, Camussi G (1999) Production of platelet-activating factor in patients with sepsis-associated acute renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 14(5): 1150-57

**50:**

Mayo LA, Curnutte JT (1990) Kinetic microplate assay for superoxide production by neutrophils and other phagocytic cells. *Methods Enzymol* 186: 567-75

**51:**

Mc Phail LC, Clayton CC, Snyderman R (1984) The NADPH oxidase of human polymorphonuclear leukocytes. Evidence for regulation by multiple signals. *J Biol Chem* 259(9): 5768-75

**52:**

Mikawa K, Akamatsu H, Nishina K, Shiga M, Maekawa N, Obara H, Niwa Y (1997) Inhibitory effect of local anesthetics on reactive oxygen species production by human neutrophils. *Acta Anaesthesiol Scand* 41(4):524-8

**53:**

Moolenaar WH (1995) Lysophosphatidic acid signaling. *Curr Opin Cell Biol* 7: 203-10

**54:**

Moolenaar WH (1995) Lysophosphatidic acid, a multifunctional phospholipid messenger. *J Biol Chem* 270(22): 12949-52

**55:**

Moolenaar WH, Kranenburg O, Postma FR, Zondag GC (1997) Lysophosphatic acid: G-protein signalling and cellular responses. *Curr Opin Cell Biol* 9(2): 171-73

**56:**

Naskret M, Platkiewicz M, Billert H, Drobnik L, Dyderski S (2001) The influence of lidocaine on the permeability of the blood-cerebrospinal fluid barrier in experimental acute hypercapnia in the rabbit. *Acta Neurobiol Exp (Warsz)* 61(2): 77-84

**57:**

Nietgen GW, Durieux ME (1998) Intercellular Signalling By Lysophosphatidate, Recent Developments. *Cell Adhes Commun* 5(3): 221-35. (Übersichtsarbeit)

**58:**

Nietgen GW, Chan CK, Durieux ME (1997) Inhibition of Lysophosphatidate Signaling by Lidocaine and Bupivacaine. *Anesthesiology* 86(5): 1112-9

**59:**

Nishina K, Mikawa K, Maekawa N, Takao Y, Obara H (1995) Does early posttreatment with lidocaine attenuate endotoxin-induced acute injury in rabbits? *Anesthesiology* 83(1): 169-77

**60:**

Nishina K, Mikawa K, Takao Y, Shiga M, Maekawa N, Obara H (1998) Intravenous lidocaine attenuates acute lung injury induced by hydrochloric acid aspiration in rabbits. *Anesthesiology* 88(5): 1300-09

**61:**

Ohsaka A, Saionji K, Sato N, Igari J (1994) Local anesthetic lidocaine inhibits the effect of granulocyte colony-stimulating factor on human neutrophil functions. *Exp Hematol* 22(5): 460-6

**62:**

Partrick DA, Moore FA, Moore EE, Barnett Jr CC, Silliman CC (1996) Neutrophil priming and activation in the pathogenesis of postinjury multiple organ failure. *New Horiz* 4(2): 194-210

**63:**

Peck SL, Johnston JR, RB, Horwitz LD (1985) Reduced neutrophil superoxide anion release after prolonged infusions of lidocaine. *J Pharmacol Exp Ther* 235(2):418-22

**64:**

Powell DM, Rodehaever GT, Foresman PA, Hankins CL, Bellian KT, Zimmer CA, Becker DG, Edlich RF (1991) Damage to tissue defenses by EMLA cream. *J Emerg Med* 9: 205-9

**65:**

Rocksén D, Lilliehook B, Larsson R, Johansson T, Bucht A (2000) Differential anti-inflammatory and anti-oxidative effects of dexamethasone and N-acetylcysteine in endotoxin-induced lung inflammation. *Clin Exp Immunol* 122(2): 249-56

**66:**

Sakuragi T, Ishino H, Dan K (1996) Bactericidal activity of clinically used local anesthetics on *Staphylococcus aureus*. *Reg Anesth* 21: 239-42

**67:**

Schmitz G, Lepper H, Heidrich M (1997) *Pharma Cards*. F.K. Schattauer Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 2.Aufl, S 57-59

**68:**

Simchowitz C, Spilberg I (1979) Generation of superoxide radicals by human peripheral neutrophils activated by chemotactic factor: evidence for the role of calcium. *J Lab Clin Med* 93(4): 583-93

**69:**

Sinclair R, Eriksson AS, Gretzer C, Cassuto J, Thomsen P (1993) Inhibitory effects of amide local anaesthetics on stimulus-induced human leukocyte metabolic activation, LTB<sub>4</sub> release and IL-1 secretion in vitro. *Acta Anaesthesiol Scand* 37: 159-65

**70:**

Sullivan LM, Hönemann CW, Arledge JA, Durieux ME (1999) Synergistic inhibition of lysophosphatidic acid signaling by charged and uncharged local anesthetics. *Anesth Analg* 88(5): 1117-24

**71:**

Santon BJ, Iohom G, Wang JH, Redmond HP, Shorten GD (2001) The effect of lidocaine on neutrophil respiratory burst during induction of general anaesthesia and tracheal intubation. *Eur J Anaesthesiol* 18(8): 524-29

**72:**

Takao Y, Mikawa K, Nishina K, Maekawa N, Obara H (1996) Lidocaine attenuates hyperoxic lung injury in rabbits. *Acta Anaesthesiol Scand* 40(3): 318-25

**73:**

Thomas JM, Schug SA (1999) Recent advances in the pharmacokinetics of local anaesthetics, Long-acting amide enantiomers and continuous infusions. *Clin Pharmacokinet* 36 (1): 67-83

**74:**

Tigyi J, Tigyi G, Liliom K, Miledi R (1997) Local anesthetics inhibit receptors coupled to phosphoinositide signaling in *Xenopus* oocytes. *Pflügers Arch - Eur J Physiol* 433: 478-87

**75:**

Van der Bend RL, Brunner J, Jalink K, Van Corven EJ, Moolenaar WH, Van Blitterswijk WJ (1992) Identification of a putative membrane receptor for the bioactive phospholipid, lysophosphatidic acid. *EMBO J* 11(7):2495-501

**76:**

Vitola JV, Forman MB, Holsinger JP, Atkinson JB, Murray JJ (1997) Reduction of myocardial infarct size in rabbits and inhibition of activation of rabbit and human neutrophils by lidocaine. *Am Heart J* 133(3): 315-22

**77:**

Worthen GS, Seccombe JF, Clay KL, Guthrie LA, Johnston Jr. RB (1988) The priming of neutrophils by lipopolysaccharide for production of intracellular platelet-activating Factor: Potential role in mediation of enhanced superoxide secretion. *J Immunol* 140(10): 3553-3559

**78:**

Xu Y, Casey G, Mills GB (1995) Effect of lysophospholipids on signaling in the human Jurkat T cell line. *J Cell Physiol* 163(3): 441-50

## 8. DANKSAGUNG

Vielen herzlichen Dank

möchte ich Herrn Universitätsprofessor Dr. med. H. Van Aken für die Möglichkeit und Unterstützung, meine Dissertation in Charlottesville zu beginnen, sowie Herrn PD Dr. med. A. Sielenkämper für die Überlassung des Themas aussprechen.

Herrn Prof. Dr. med. M.E. Durieux und den Mitarbeitern seines Labors gilt mein Dank für die Zuverfügungstellung eines Arbeitsplatzes sowie den zahlreichen Hilfestellungen, für die freundliche Atmosphäre und die kollegiale Zusammenarbeit.

Außerdem möchte ich Herrn Dr. med. L. Fischer für die engagierte Betreuung während der experimentellen Phase dieser Arbeit, die stete Ansprechbarkeit und die kritische Beurteilung während der theoretischen Phase, sowie für seine Ratschläge und Geduld meinen Dank aussprechen.

Meinem Bruder und allen Freunden, die mich in dieser Zeit begleitet haben, insbesondere Frau K. Schuchardt, danke ich für den Ansporn und die ständige Unterstützung.

Herrn Th. Vogel danke ich für die Einführung in den wissenschaftlichen Umgang mit dem Computer sowie für das geduldige Zuhören.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir durch ihr „Sponsoring“ erst diese Arbeit ermöglichten, mir ständig zur Seite standen und mir besonders gegen Ende des Zusammenfassens eine zügige Abgabe der Dissertationsschrift ans Herz legten.



## 9. CURRICULUM VITAE

### Persönliche Daten

Name: Beate Conrad  
Geburtsdatum/ -ort: 03. Februar 1976/ Gütersloh  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig  
Eltern: Horst und Marianne Conrad, geb. Blaurock

### Schulbildung

1982 – 1986 St. Georg-Grundschule, Verl  
1986 – 1995 Gymnasium Verl, Allgemeine Hochschulreife

### Hochschulbildung

1995 Kurzstudium Biologie an der „University of California“, Los Angeles, USA  
1995 Immatrikulation für Humanmedizin an der RWTH Aachen  
1997 Ärztliche Vorprüfung  
1998 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
1998 Immatrikulation für Humanmedizin an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster  
1999 Department of Anaesthesiology and Intensive Care Medicine, University of Virginia, Charlottesville, USA  
2001 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
2002 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung (widerrufliche Berufserlaubnis: 13.05.2002)

### Berufsausbildung

2002 ÄiP in der Medizinischen Klinik und Poliklinik B des Universitätsklinikums Münster; Ärztlicher Direktor Prof. Dr. med. Dr. hc W. Domschke

## Publikationen

- 2000 „Lysophosphatidic acid has a priming but no activating effect in human neutrophils“  
Internationaler Anästhesiekongress „IARS“, Hawaii (Poster)
- 2000 „Time-dependent attenuation by lidocaine of respiratory burst in human neutrophils primed with lysophosphatidic acid“  
Internationaler Anästhesiekongress „IARS“, Hawaii (Poster)
- 2000 „Lidocain reduziert zeitabhängig die durch Lysophosphatidylsäure induzierte Superoxidanionen-Produktion neutrophiler Granulozyten“  
Deutscher Anästhesiekongress „DAK International“, München (Poster)
- 2001 „Local anesthetics attenuate lysophosphatidic acid-induced priming in human neutrophils“  
Fischer LG, Bremer M, Coleman EJ, Conrad B, Krumm B, Gross A, Hollmann MW, Mandell G, Durieux ME  
Anesth Analg. 2001 Apr; 92(4): 1041-7

Münster, 17. Juni 2003

## I. ANHANG

## I.I Ergänzende Tabellen zum Ergebnisteil

Abb. 7:

Substanzen	n	X (%)	Min. (%)	Max. (%)
fMLP	4	10,74	4,72	19,65
LPA 10 <sup>-4</sup> M+fMLP	4	100,00	100,00	100,00
LPA+fMLP+Lido 10 <sup>-6</sup> M	4	78,74	73,02	88,56
LPA+fMLP+Lido 10 <sup>-5</sup> M	4	74,91	71,52	80,59
LPA+fMLP+Lido 10 <sup>-4</sup> M	4	70,37	61,26	77,36

Abb. 8:

Substanzen	n	X (%)	Min. (%)	Max. (%)
Unbehandelte Zellen	4	26,32	15,15	41,94
fMLP	4	100,00	100,00	100,00
fMLP+Lido 10 <sup>-4</sup> M	4	81,40	63,51	125,81

Abb. 9:

Substanzen, Inkubationszeit	n	X (%)	Min. (%)	Max. (%)
LPA 10 <sup>-4</sup> M+ fMLP, 10 min/ 1h	4	100,00	100,00	100,00
LPA+ fMLP+ Lido10 <sup>-6</sup> M, 10 min	4	90,15	83,44	100,45
LPA+ fMLP+ Lido10 <sup>-5</sup> M, 10 min	4	88,78	85,28	93,14
LPA+ fMLP+ Lido10 <sup>-4</sup> M, 10 min	4	80,93	70,35	89,19
LPA+ fMLP+ Lido10 <sup>-6</sup> M, 1h	4	78,74	73,02	88,56
LPA+ fMLP+ Lido10 <sup>-5</sup> M, 1h	4	74,91	71,52	80,59
LPA+ fMLP+ Lido10 <sup>-4</sup> M, 1h	4	70,37	61,26	77,36

Abb. 10:

Substanzen	n	X (%)	Min. (%)	Max. (%)
LPA+ fMLP	4	100,00	100,00	100,00
LPA+ fMLP+ Lido $10^{-6}$ M	4	78,74	73,02	88,56
LPA+ fMLP+ Lido $10^{-5}$ M	4	74,91	71,52	80,59
LPA+ fMLP+ Lido $10^{-4}$ M	4	70,37	61,26	77,36
LPA+ fMLP+ Ropi $10^{-6}$ M	7	65,01	45,32	88,26
LPA+ fMLP+ Ropi $10^{-5}$ M	7	56,50	13,41	90,64
LPA+ fMLP+ Ropi $10^{-4}$ M	7	50,66	29,36	82,48
LPA+ fMLP+Tetra $10^{-6}$ M	5	62,90	32,82	85,29
LPA+ fMLP+Tetra $10^{-5}$ M	5	68,59	17,08	97,99
LPA+ fMLP+Tetra $10^{-4}$ M	10	48,37	16,21	95,89

Abb. 11:

Substanzen	n	X (%)	Min. (%)	Max. (%)
fMLP $10^{-6}$ M	5	10,77	2,88	17,44
PAF $10^{-6}$ M+ fMLP	5	100,00	100,00	100,00
PAF $10^{-6}$ M+ fMLP+ Lido $10^{-4}$ M	5	82,26	68,03	103,54

Abb. 12:

Substanzen	n	X (%)	Min. (%)	Max. (%)
LPA+ fMLP	4	100,00	100,00	100,00
PMA $10^{-6}$ M	4	220,51	191,04	233,65
PMA $10^{-6}$ M+ Lido $10^{-4}$ M	4	201,29	165,67	239,33