
Aus der Universitätsklinik für Anaesthesiologie
und Transfusionsmedizin

Abteilung Anaesthesiologie und Intensivmedizin

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. K. Unertl

**Einfluß der Lokalanästhetika Lidocain, Bupivacain und
Ropivacain
auf Phagozytoseaktivität, oxidative Burst und
CD 11b - Expression
humaner Leukozyten in vitro**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

MICHAEL PLANK

aus Straubing

2004

Dekan: Professor Dr. C.D: Claussen
1. Berichterstatter: Professor Dr. K. Unertl
2. Berichterstatter: Professor Dr. D. Heuser

INHALTSVERZEICHNIS	SEITE
1. Einleitung	6
1.1 Geschichtlicher Überblick	6
1.2 Grundlagen	8
1.2.1 Allgemeine Wirkweise von Lokalanästhetika	8
1.2.2 Allgemeine Pharmakologie der Lokalanästhetika	8
1.2.2.1 Die Rolle der Ionisierung	9
1.2.2.2 Hydrophobie und Lokalanästhetikapotenz	9
1.2.2.3 Wirkort der Lokalanästhetika	9
1.2.2.4 Der molekulare Wirkmechanismus von Lokalanästhetika	10
1.3 Pharmakologie und klinische Verwendung von Lidocain, Bupivacain, Ropivacain	11
1.3.1 Lidocain	11
1.3.2 Bupivacain	13
1.3.3 Ropivacain	14
1.4 Immunfunktion und Entzündungsreaktion	16
1.4.1 Zellen des Immunsystems	16
1.4.1.1 Monozyten/Makrophagen	16
1.4.1.2 Granulozyten	16
1.4.2 Abwehr von Krankheitserregern	17
1.4.2.1 Opsonierung	17
1.4.2.2 Phagozytose	18
1.4.2.3 oxidative Burst und Killing	18
1.4.4 Adhäsionsmoleküle	19
1.4.4.1 Selektine / L-Selektin	19
1.4.4.2 Integrine / CD 11b	20
1.4.5 Wirkung von Lokalanästhetika Immunfunktion	20
1.5 Zusammenfassung und Ziel der Untersuchung	23

2.	Materialien und Methoden	24
2.1	Materialien	24
2.2	Methoden	26
2.2.1	Herstellung der Lösungen	26
2.2.2	Färbung der Staphylokokken	26
2.2.3	Phagozytoseassay	27
2.2.4	oxidative Burst - / CD 11b-Assay	31
2.2.5	L-Selektin	33
2.2.6	Durchflußzytometrie	33
2.2.7	Statistische Auswertung	37
3.	Ergebnisse	38
3.1	L-Selektin	38
3.2	Lokalanästhetika	39
3.2.1	Lidocain	39
3.2.2	Bupivacain	42
3.2.3	Ropivacain	46
4.	Diskussion	49
4.1	Methodik	49
4.1.1	Verwendung von <i>S.aureus</i>	49
4.1.2	Versuchsaufbau	50
4.1.2.1	Phagozytose	51
4.1.2.2	L-Selektin	52
4.1.2.3	oxidative Burst	53
4.2.	Untersuchte Anästhetika	54
4.2.1	Phagozytose	54
4.2.2	oxidative Burst	55
4.2.3	CD 11b-Expression	55
4.3	Konzentration der Lokalanästhetika	57

5.	Zusammenfassung	60
6.	Anhang	62
6.1	Tabellarische Zusammenstellung der Daten	62
6.2	Literaturverzeichnis	71
6.3	Danksagung	79

1. Einleitung

1.1 Geschichtlicher Überblick

Von *Erythroxylon coca*, dem Strauch der Cocapflanze, stammt das Cocain, der erste natürliche Wirkstoff, an dem lokalanästhetische Eigenschaften beobachtet wurden. Schon lange vor Kolumbus waren den Ureinwohnern Südamerikas die Eigenschaften der cocainhaltigen Blätter dieser Pflanze bekannt, die als Aufputsch- und Rauschmittel Anwendung fanden.

Die chemische Bearbeitung der wirksamen Inhaltsstoffe des Cocastrauches begann im Laboratorium von Wöhler. Im Jahre 1860 gelang Niemann die Isolierung und Reindarstellung des Cocains. Lossen klärte die Bruttoformel des Cocains auf und identifizierte diese als Benzoyl-methyl-ecgonin. Mit der Entdeckung der anästhetischen Eigenschaften legte Lossen den Grundstein für die Verwendung einer der heute klinisch am weitesten verbreiteten Substanzgruppe, die Lokalanästhetika.

Als Lokalanästhetikum wurde Cocain wenige Jahre später von Moreno y Maiz erstmals an Tieren angewandt. Diese tierexperimentellen Ergebnisse führten kurz darauf auch zur ersten Anwendung am Menschen. Im Selbstversuch entdeckte der Wiener Ophthalmologe Koller, dass Cocain bei Applikation auf Zunge oder Lippen eine Gefühllosigkeit hervorruft und überprüfte daraufhin die Möglichkeit der Schmerzausschaltung durch Cocain in der Augenheilkunde. In einer Reihe von Tier- und Selbstversuchen sowie an Patienten zeigte er, dass sich Cocain zur Schmerzausschaltung während Operationen am Auge eignet. Damit hielt im Jahre 1884 das erste Lokalanästhetikum Einzug in die klinische Medizin.

Die Nachteile des Cocains – seine leichte Zersetzung in Lösung beim Sterilisieren und seine suchterzeugende Eigenschaft – waren jedoch Anlass nach anderen Verbindungen zu suchen. Das von Chemikern und Pharmakologen angestrebte Ziel, unter Beibehaltung der erwünschten und Beseitigung der unerwünschten Wirkungen, den lokalanästhetisch wirksamen Teil des Cocain-Moleküls zu isolieren, gelang Einhorn im Jahre 1905 mit der Synthese von Procain. Das Esterlokanästhetikum Procain stellte bis weit über den zweiten Weltkrieg hinaus das meistverwendete Lokalanästhetikum dar. Im

Gegensatz zu Cocain führte Procain zu keiner Abhängigkeit, besaß jedoch den Nachteil, als Ester sehr schnell durch Plasmaesterasen gespalten und damit unwirksam zu werden. Durch die Kopplung eines Substituenten am Ring des Tetracains, wodurch die Affinität zu den Plasmaesterasen deutlich vermindert wurde, und durch den Ersatz der Esterbindung durch eine Säureamidbindung in der Zwischenkette versuchte man den schnellen Wirkverlust zu verhindern. Mit dieser Modifikation gelang Löfgren 1943 die Synthese von Lidocain, dem ersten Amidlokalanästhetikum. Lidocain zeichnete sich im Gegensatz zu den Esterlokalanästhetika vor allem durch sein sehr geringes allergisches Potential und eine unvergleichbare hohe Temperaturstabilität aus. Es war daher auch zur Sterilisierung geeignet.

Schon bald darauf wurde im Jahre 1957 von Bo von Ekenstam das Mepivacain entwickelt, das unter den Handelsnamen Scandicain® in Deutschland in den Handel kam. Weitere Modifikationen der Seitenketten und Substituenten führten im gleichen Jahre durch Ekenstam zur Entwicklung des langwirksamen Bupivacain. 1963 wurde es durch Widman und Telivuo in die Klinik eingeführt. Das vergleichbar lang wirksame Ropivacain wurde ebenfalls durch Ekenstam 1957 synthetisiert. Mit seiner klinischen Einführung im Jahre 1997 erfuhr Ropivacain seither eine Renaissance, da es klinisch relevante Vorteile im Vergleich zum Bupivacain besitzt. Diese bestehen in einer überlegenen differenzierten Blockadefähigkeit, damit Reduktion der klinisch relevanten motorischen Beeinträchtigung bei vergleichbarer Analgesiequalität und seiner deutlich geringeren Toxizität sowohl am Herzen als auch am Zentralnervensystem.

Aufgrund ihres, im Vergleich zu den Esterderivaten, wesentlich geringeren Nebenwirkungsprofils haben die Amidlokalanästhetika diese heute in der klinischen Anwendung, zumindest in Europa, weit in den Hintergrund gedrängt. Die bei der hydrolytischen Spaltung der Esterlokalanästhetika im Plasma entstehende Paraaminobenzoessäure, ein hochpotentes Allergen, hat diese Entwicklung noch beschleunigt. Procain wird nur noch zur Infiltrationsanästhesie bzw. zur Neuraltherapie, Tetracain und Benzocain als Oberflächenanästhetikum in Augen- und Ohrentropfen verwendet (46).

Die langwirksamen Amidlokalanästhetika Bupivacain und Ropivacain haben heute in der Klinik den größten Stellenwert. Vor allem Ropivacain wird wegen

seiner geringen Kardio- und Neurotoxizität heute überwiegend zur peri- und postoperativen Analgesie verwendet.

1.2 Grundlagen

1.2.1 Allgemeine Wirkweise von Lokalanästhetika

Lokalanästhetika blockieren reversibel die Entstehung und Fortleitung des Aktionspotentials in Nervenfasern und verhindern dadurch die Transmission nozizeptiver Signale und somit die Schmerzempfindung ohne Ausschaltung des Bewußtseins.

Durch ihre amphiphilen Eigenschaften diffundieren sie durch die Phospholipidschicht der Zellmembran und blockieren dann an der Innenseite der Zellmembran verschiedene Ionenkanäle. Die direkte Blockade von Natriumkanälen führt zu einer Abnahme der Amplitude und Anstiegsgeschwindigkeit des Aktionspotentials. Die Erregbarkeitsschwelle und Refraktärperiode nimmt zu. Es folgt eine temporäre und reversible vollständige Unerregbarkeit der Nervenmembran.

1.2.2 Allgemeine Pharmakologie der Lokalanästhetika

1.2.2.1 Die Rolle der Ionisierung

Lokalanästhetika liegen als ein Gemisch aus neutraler (elektrisch neutrales Molekül) und protonierter ionisierter Form (positiv geladenes Molekül) vor. Das Verhältnis aus ionisierten und neutralen Molekülen ergibt sich entsprechend der Henderson-Hasselbach'schen Gleichung,

$$\text{pH} = \frac{\text{pK} + \log [\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$$

wobei der pKa (=isoelektrischer Punkt) den pH Wert beschreibt bei dem die neutrale $[\text{A}^-]$ und die ionisierte $[\text{HA}]$ Form im Gleichgewicht vorliegen. Der pH Wert variiert bei den klinisch angewandten Lokalanästhetika zwischen pH 7,7 – 9,5 , so dass die ionisierten Molekülanteile in größerer Zahl vorliegen als die neutralen Molekülanteile. Generell besitzen beide Molekülformen pharmakologische Aktivität, was sich durch ihre blockierende Wirkung auf Natriumkanäle im und am isolierten Nervenpräparat nachweisen lässt (70).

1.2.2.2 Hydrophobie und Lokalanästhetikapotenz

Der Grad der Hydrophobie ist relevant für die Potenz des Lokalanästhetikums am isolierten Nerven. Je hydrophober das Lokalanästhetikum ist, desto stärker ist seine Eigenschaft Aktionspotentiale zu blockieren. Diese Blockadepotenz beruht nicht auf einer verlangsamten Dissoziationsrate vom Rezeptor weg, sondern auf der Geschwindigkeit der Assoziation, damit der Affinität zum Natriumkanal hin (18). Gegenwärtig werden zwei mögliche Wege für die Wirkung am Rezeptor postuliert. Erstens, ein hydrophiler Weg durch die Pore des Natriumkanals; zweitens, ein hydrophober oder lipohiler durch die Nervenzellmembran. Demgemäss stünden für ionisierte und neutrale Molekülformen selektive Angriffswege für die Wirkung auf den Natriumkanal zur Verfügung.

In der klinischen Situation wird jedoch die Wirkung des injizierten Lokalanästhetikums vor allem durch die Menge bestimmt, der es gelingt, durch die Nervenhüllmembranen an die Nervenfasern zu gelangen. Dies gelingt der neutralen, damit lipophilen Fraktion wesentlich besser, da diese Fraktion des Lokalanästhetikums im wesentlichen die Penetration der Nervenmembranen und somit das Erreichen des Wirkortes bestimmt (69).

1.2.2.3 Wirkort der Lokalanästhetika

Prinzipiell können Lokalanästhetika ihre Wirkung an den folgenden 3 Orten der Zellmembran ausüben: 1. an der Außenseite der Membran, 2. an der Innenseite der Membran und 3. am Natriumkanal selbst. Wahrscheinlich ist die Wirkung am Natriumkanal der entscheidende Wirkort, zumindest für die klassischen Vertreter unter den Lokalanästhetika, da experimentelle Daten in Richtung auf eine spezifische Interaktion zwischen Natriumkanal und Lokalanästhetikum weisen. Gerade die quaternären Derivate scheinen nur von der axoplasmatischen Seite am Nerven wirken zu können. Aus diesem Grunde scheint eine Wirkvermittlung durch die Penetration der Nervenmembran nicht in Frage zu kommen. Zweitens erscheinen die blockierenden Eigenschaften gerade dann verstärkt, wenn durch Änderungen der elektrophysikalischen Verhältnisse eine Konformationsänderung am Natriumkanal hervorgerufen wird, welche die offene oder inaktivierte Form durch einen sogenannten „use-dependent block“ oder phasischen Block ermöglicht (34).

Drittens existieren Hinweise auf einen stereoselektiven Block durch Enantiomere von Lokalanästhetika, die eine Erhöhung der lokalanästhetischen Potenz zwischen den Enantiomeren um den Faktor 2-5 bedingt. Während die Stereoselektivität die Reaktion mit Natriumkanälen deutlich beeinflusst, scheint sie die Wirkung auf Membranproteinen nicht zu beeinflussen (53).

Die These, dass Natriumkanäle die spezifischen Rezeptoren für Lokalanästhetika darstellen, wird durch Experimente unterstützt, in denen bewusste Punktmutationen in der Aminosäuresequenz des Natriumkanalproteines verursacht wurden. Solche Veränderungen in der Struktur des Kanalproteines führen zu potenten und spezifischen Veränderungen in den blockierenden Eigenschaften von Lokalanästhetika (68).

1.2.2.4 Der molekulare Wirkmechanismus von Lokalanästhetika

Experimentelle Befunde vor allem aus der Physiologie ergaben Hinweise auf die genaue Wirkung von LA auf molekularer Ebene. Verankert sind diese Befunde in der Beobachtung, dass LA eine stärkere Inhibition auf stimulierte (phasischer Block) als auf ruhende Kanäle (tonischer Block) ausüben.

Eine entsprechend formulierte Hypothese stellt die „modulated receptor hypothesis (MRH)“ dar (35). Zugrunde liegt dieser Hypothese, dass Kanalproteine auf Veränderungen des Membranpotentials mit einer Konformationsänderung reagieren. Beginnend mit einer Ruheposition (R), werden sie über eine (geschlossene) intermediäre (C) Form in eine offene Position aktiviert und erreichen letztendlich den geschlossenen inaktiven Zustand (I). Lokalanästhetika üben, entsprechend dieser Hypothese die stärkste Wirkung auf offene und inaktivierte Kanäle, als auf die ruhenden Kanäle aus (19). Unter Stimulation binden offene und inaktivierte Kanäle Lokalanästhetika wesentlich fester, wodurch der Kanal in einer nicht leitenden Konformation stabilisiert wird.

Für die blockierenden Eigenschaften der Lokalanästhetika scheinen aber v.a. die offenen und aktivierten Kanäle von besonderer Bedeutung, da diese offensichtlich am schnellsten mit Lokalanästhetika reagieren (18).

Diese beschriebenen Wirkungen erklären zwar die analgetische Potenz der Lokalanästhetika, es bleibt jedoch aus diesem Erklärungsmodell größtenteils unverständlich, wie eine Wirkung der Lokalanästhetika an Zellen des

Immunsystems zustande kommt. Da Granulozyten nicht über Natriumkanäle verfügen, kann eine Wirkung von Lokalanästhetika nicht über Natriumkanäle vermittelt werden. Eine Wirkung an der Außenseite oder der Innenseite der Zellmembran wurde postuliert. Lokalanästhetika üben jedoch auch Wirkungen auf andere Membranproteine außer den Natriumkanälen aus.

1.3 Pharmakologie und klinische Verwendung von Lidocain, Bupivacain und Ropivacain

1.3.1 Lidocain

Lidocain wurde 1943 von Löfgren und Lundqvist synthetisiert und 1944 für die klinische Verwendung zugelassen. Aufgrund seines raschen Wirkungseintritts (ca.1-2 Minuten), der mittellangen Wirkungsdauer und der guten lokalen anästhesiologischen Potenz etablierte sich Lidocain rasch in der Klinik und wurde für sämtliche Blockadetechniken zugelassen (52). Neben seiner Wirkung auf sensorische, motorische und autonome Nervenfasern zeigt es eine schwache antihistaminerge und parasympholytische Wirkung. Im Gegensatz zu den meisten anderen Lokalanästhetika besitzt Lidocain jedoch keine direkte gefäßerweiternde Wirkung.

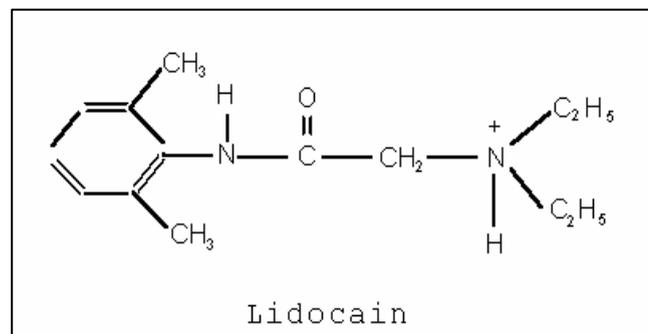
Lidocain wird auch, als derzeit einziges Derivat, außerhalb seines klassischen antinozizeptiven Indikation als Antiarrhythmikum eingesetzt und vermag ungeordnete ventrikuläre Erregungszentren über eine kurzfristige vollständige Blockade der kardialen Natriumkanäle zu synchronisieren (3). Die intravenöse Gabe wirkt darüber hinaus antikonvulsiv und in Kombination mit Barbituraten ist eine Analgesie und gleichzeitige Anaesthesie zu erreichen. Ein hyperreagibles tracheo-bronchiales System bei Patienten mit chronisch obstruktiven Lungenerkrankungen kann im Rahmen einer Allgemeinnarkose durch Lidocain hyposensibilisiert werden.

Der pKa-Wert von Lidocain beträgt 7,9, der pH-Wert der wässrigen Lösung des Hydrochloridsalzes liegt bei 6,5. Im entzündeten Gewebe ist die Wirkung aufgrund des dort vorliegenden sauren pH-Wertes herabgesetzt. Die Proteinbindung im Plasma beträgt 58-75%. Die Ausbreitung der Substanz im Gewebe ist stärker als die der anderen gebräuchlichen Lokalanästhetika. Es verteilt sich rasch in stark durchbluteten Organen (Herz, Leber,Lunge), gefolgt

von einer Umverteilung in die Skelettmuskulatur und das Fettgewebe. Die Wirkdauer beträgt ungefähr 30 min ohne Zusatz eines Vasokonstriktors. Die empfohlene Höchstdosis beträgt ohne Adrenalin 200 mg, mit Adrenalin 500 mg. Der Abbau erfolgt in der Leber. Hier wird es durch Monooxygenasen rasch metabolisiert. Lidocain und seine Metabolite werden über die Niere ausgeschieden. Ungefähr 5-10% werden unverändert ausgeschieden (3).

Im Handel wird es in den unterschiedlichsten Konzentrationen und Darreichungsformen angeboten. Es gibt Konzentrationslösungen zu 0.5%, 1%, 1.5% und 2%. Für eine Spinalanästhesie mit einer Wirkungsdauer von 30 bis 60 Minuten ist eine Mischung aus 5% Lidocain und 7,5% Glucoselösung erhältlich (hyperbare Lösung). Durch Zusatz eines Vasokonstriktors kann die Wirkung deutlich verlängert werden und die Resorptionsrate, mit gleichzeitig verringerter Toxizität, gesenkt werden.

Abb.1: Strukturformel von Lidocain



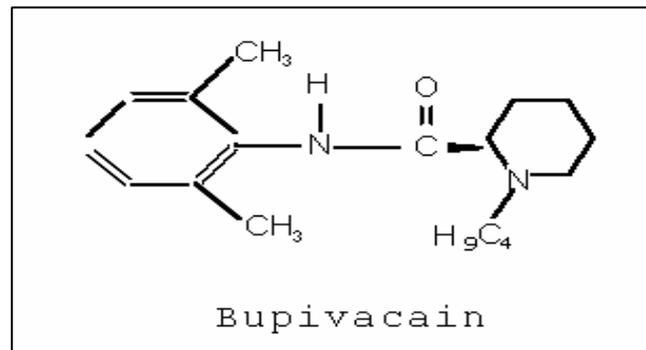
1.3.2 Bupivacain

Obwohl Ekenstam Bupivacain bereits im Jahr 1956 synthetisierte, wurde es in die Klinik jedoch erst 1963 durch Telivuo und Widman eingeführt. Bupivacain hatte einen entscheidenden Einfluss auf die Verbreitung der Regionalanästhesie in der Klinik, da es die gewünschten Anforderungen an ein Lokalanästhetikum durch zügigen Wirkungseintritt, lange Wirkdauer und eine differenzierte Blockade sensorischer und motorischer Nervenfasern sehr gut erfüllte. Konzentrationen von 0,125% bis 0,75% ermöglichen eine vielseitige Anwendung bei unterschiedlichen regionalen Anästhesieverfahren. Die durchschnittliche Wirkdauer beträgt drei bis zehn Stunden. Bei Blockaden des Plexus brachialis sowie im Bereich peripherer Nerven wurde jedoch auch eine verlängerte Wirkdauer von 12 bis 24 Stunden beobachtet. Durch Zusatz eines Vasokonstriktors ist keine wesentliche Wirkungsverlängerung zu erzielen.

Bupivacain ist stark lipophil; der pKa-Wert beträgt 8,01; der pH-Wert der wässrigen Lösung des Hydrochloridsalzes liegt bei 6 (4). Die Proteinbindung im Plasma ist mit 88-96% sehr hoch. Bupivacain ist etwa 4mal stärker anästhetisch und toxisch wirksamer als Lidocain. Seine Höchstdosis beträgt 150 mg. Sein Abbau erfolgt überwiegend in der Leber.

Die Gefahr bei akzidenteller intravenöser Injektion begründet sich in der 4-5mal höheren Toxizität im Vergleich zu Lidocain. Bupivacain kann, wie im Tierversuch (52) gezeigt wurde, bei subkonvulsiven bzw. konvulsiven Dosen zu ventrikulären Herzrhythmusstörungen führen. Bereits eine intravenöse Bolusdosis von 25mg kann bei Gesunden ventrikuläre Rhythmusstörungen, im Extremfall Kammerflimmern auslösen. Es dringt rasch in den Natriumkanal ein und blockiert ihn, gelangt aber nur langsam wieder heraus („fast in – slow out“ Phänomen). In niedrigen Konzentrationen steht die negative Dromotropie im Vordergrund; in höheren Konzentrationen kommt eine ausgeprägte negative Inotropie hinzu.

Abb.2: Strukturformel von Bupivacain



1.3.3 Ropivacain

Das Wissen und die Besorgnis um die toxischen Gefahren von Bupivacain bei akzidenteller intravenöser Injektion und Überdosierung führte zu einer Suche nach einem Lokalanästhetikum mit ähnlichem Wirkprofil, jedoch geringerer Kardio- und Neurotoxizität.

Mit Ropivacain wurde ein Amidlokanästhetikum gefunden, das diesem Idealprofil sehr nahe kommt. Mitte der neunziger Jahre kam es nach umfangreichen Tests in Labor und Klinik auf den Markt. Synthetisiert wurde es jedoch bereits im Jahre 1957 von Ekenstam.

Ropivacain unterscheidet sich von Bupivacain in der zweidimensional dargestellten Strukturformel nur um eine Methylgruppe in einer Seitenkette des hydrophilen Anteils. Der wesentliche Unterschied liegt in der räumlichen Darstellung. Hier stellt es sich als S – Enantiomer, mit einer Reinheit von 99,5 % dar.

Diese Festlegung der optisch aktiven, in eine Richtung drehenden Variante der Molekülstruktur ist ein neues Herstellungs- und Anwendungsprinzip, das die typischen Eigenschaften von Ropivacain definiert.

Ropivacain blockiert reversibel, wie andere Lokalanästhetika, die Entstehung und Fortleitung des Aktionspotentials an allen Nervenfasern. In hohen Dosen ruft es eine chirurgische Anästhesie hervor, während niedrige Dosierungen sensorische Blockaden mit deutlich geringerer und nicht progressiver motorischer Blockade bewirken (5).

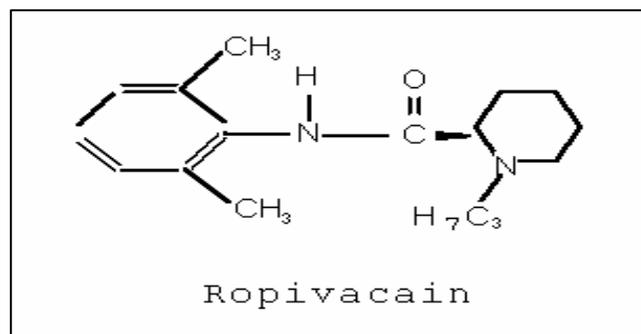
Im Vergleich zu Bupivacain ist es weniger lipophil, was zu einer etwas verlängerten Anschlagzeit und möglicherweise verringerten Wirkdauer führt.

Am Natriumkanal koppelt Ropivacain zügig, diffundiert in der Repolarisationsphase jedoch schneller ab als Bupivacain (12). Diese Tatsache erklärt unter anderem die geringere Toxizität von Ropivacain. Obwohl für Ropivacain im Vergleich zu gleichkonzentrierten Bupivacain höhere Serumwerte gemessen werden (87), verringert sich die kardiale und zentralnervöse Toxizität nachweislich. Die reduzierte Toxizität wird auch durch seine Stereoisomerie erklärt. Nach bisherigen Untersuchungen beeinträchtigt die S(-)-Form über stereoselektive Bindung den schnellen Natriumkanal weniger als die R(+)-Form.

Ropivacain besitzt wie Bupivacain und andere langwirkende Lokalanästhetika eine Proteinbindung von über 90%, weist jedoch einen deutlich geringeren Verteilungskoeffizient auf (Ropivacain = 6,1; Bupivacain = 20,5). Diese schwächere Lipophilie ist eher mit mittellangwirkende Lokalanästhetika vergleichbar und erklärt die geringere ZNS- und Kardiotoxizität. Zusätzlich induziert die geringere Lipophilie eine verringerte Anreicherung im Myelin der Nerven und führt damit in analgetischen Konzentrationen (0.2%) zu einer geringeren motorischen Blockade als äquipotente Dosen anderer langwirksamer Lokalanästhetika. Möglicherweise trägt auch die optische Stereoselektivität zum ausgeprägten differentiellen Block bei. Hier wird eine erhöhte Affinität der S(-)-Isomere zu C-Fasern diskutiert.

Ropivacain wird in der Leber vorwiegend aromatisch hydroxiliert und über die Niere ausgeschieden.

Abb.3: Strukturformel von Ropivacain



1.4 Immunfunktion und Entzündungsreaktion

Mit dem Eintritt von Krankheitserregern in den Körper kommt es zu einer Aktivierung des Immunsystems durch eine Vielzahl verschiedener Mechanismen, die zur Phagozytose dieser Fremdkörper und deren Abtötung beitragen. Auf einige dieser Mechanismen, die relevant für die vorliegende Arbeit sind, soll an dieser Stelle eingegangen werden.

Die natürliche Schutzbarriere gegen Krankheitserreger, die Haut, wird bei einem Trauma, bedingt z.B. durch chirurgische oder anästhesiologische Maßnahmen, verletzt. Dadurch wird den Erregern das Eindringen ins Gewebe oder die Blutbahn erleichtert, wo sie mit dem eigentlichen Abwehrsystem des Körpers in Kontakt kommen. Eine Hauptaufgabe in der Abwehr dieser eingedrungenen Erreger haben die Phagozyten, vor allem die neutrophilen Granulozyten, und die Zellen der Monozyten/Makrophagen-Reihe. Sie leisten den Großteil der Aufnahme und Abtötung von Fremd- und Abfallstoffen. Auch einige andere Zellen z.B. Endothelzellen oder Gliazellen können Fremdstoffe aufnehmen, aber die Aufnahme erfolgt hier nur zu einem geringen Teil und wird auch nicht von Mechanismen wie dem oxidative Burst begleitet.

1.4.1 Zellen des Immunsystems

1.4.1.1 Monozyten / Makrophagen

Aktiviert durch bakterielle Toxine oder Zytokine können Monozyten und Makrophagen Fremdkörper direkt und unspezifisch aufnehmen und abtöten. Nach der Aufnahme von Fremdkörpern präsentieren sie deren Antigene, setzen Zytokine frei und spielen dadurch eine Schlüsselrolle in der Aktivierung des spezifischen Immunsystems. Durch die Freisetzung der Zytokine werden außerdem weitere Zellen des Immunsystems, z.B. Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten, angelockt und aktiviert.

1.4.1.2 Granulozyten

Den zahlenmäßig größten Teil der Abtötung von Krankheitserregern bewältigen jedoch die neutrophilen Granulozyten, im angloamerikanischen Sprachraum als „polymorphonuclear neutrophils“ (PMN) bezeichnet. Angelockt durch chemotaktische Reize immigrieren sie noch vor den Monozyten in entzündetes Gewebe und nehmen dort Mikroorganismen auf. Durch verschiedene Mechanismen sind sie in der Lage die Mikroorganismen abzutöten, gehen

dabei oft selbst zugrunde und können von Zellen des Monozyten-Makrophagen-Systems phagozytiert werden. Mit der Aufnahme von Krankheitserregern setzen auch die Granulozyten verschiedene Mediatoren frei, die wiederum auf andere Zellen chemotaktisch wirken.

Vorraussetzung dafür, dass die Granulozyten an den Ort der Entzündung gelangen, ist eine Extravasion dieser Zellen aus der Blutbahn ins Gewebe. Der erste Schritt ist eine Adhäsion am Endothel der Gefäßwand. Über eine zunächst lockere Bindung mittels der Selektine vermindern die Leukozyten ihre Geschwindigkeit (slow rolling) und haften dann am Endothel (Adhäsion), vermittelt durch eine kovalente Bindung der Integrine (Sticking). Daraufhin bahnen die Leukozyten sich einen Weg zwischen den Endothelzellen hindurch und wandern in Richtung des chemotaktischen Reizes zum Ort der Entzündung hin, um dort die Erreger zu phagozytieren.

1.4.2 Abwehr von Krankheitserregern

1.4.2.1 Opsonierung

Um die Aufnahme von Fremdstoffen durch die Phagozyten zu erleichtern, werden diese durch Substanzen des Serums, die Opsonine gebunden. Die drei Hauptklassen an Opsoninen sind IgG-Antikörper, Komplementfaktoren und kohlenhydratbindende Proteine. Die Opsonine binden mit der einen Seite an bestimmte Oberflächenstrukturen von Fremdstoffmolekülen, z.B. Zellwandbestandteilen von Bakterien wie Lipid A oder LPS von gramnegativen Bakterien, Lipoteichonsäure von grampositiven Bakterien oder Zymosan als Zellwandbaustein von Hefen. Das andere, freie Ende der Opsonine wird von spezifischen Rezeptoren auf der Oberfläche der Phagozyten gebunden. Entsprechend der Opsonine werden diese Rezeptoren auf der Phagozytenoberfläche auch in 3 Klassen unterteilt; die Fc-Rezeptoren, Komplementrezeptoren und Glycoproteinrezeptoren (z.B. Mannose, Fucose, N-Acetylglucosamine), die die jeweiligen Substanzen spezifisch binden. Durch die Bindung von Opsonin an die Fc-Rezeptoren, die den G-Proteinen zugeordnet werden, kommt es zu einer Signaltransduktion in der Zelle, die über die Aktivierung der Phospholipase zu einer Freisetzung intrazellulären Calciums als second messenger führt. Dies führt zu einer Aktivierung verschiedener Reaktionswege, z.B. der Phagozytose und des oxidativen Bursts.

Auch in Abwesenheit von Opsoninen können Phagozyten bestimmte Bakterien, Kohlepartikel, Latexkügelchen oder Zymosanpartikelchen durch direkte Bindung aufnehmen.

1.4.2.2 Phagozytose

Nach der Anheftung des Erregers an den Phagozyten beginnt diese den Fremdkörper zu internalisieren. Sie schiebt pseudopodienartig die Zellmembran um den Partikel, bis dieser ganz umschlungen ist und die Zellmembranpseudopodien an der Spitze aufeinander treffen und verschmelzen. Auf diese Weise ist ein Phagosom entstanden, das sich von der Zellmembran löst und ins Innere der Zelle wandert.

1.4.2.3 oxidative Burst und Killing

Bereits mit der Anheftung des Partikels an die Oberfläche des Phagozyten kommt es zu einer Aktivierung der Zelle. Um in den Körper eingedrungene Krankheitserreger nach der Phagozytose abzutöten, verfügen die Phagozyten über eine Vielzahl verschiedener Mechanismen, die auf einer Änderung des Sauerstoffmetabolismus und des pH-Werts beruhen. Diese Mechanismen lassen sich in einen sauerstoffabhängigen und einen sauerstoffunabhängigen Teil untergliedern.

Die sauerstoffabhängige Abtötung besteht hauptsächlich aus der Bildung reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen, z.B. H_2O_2 , Superoxid und NO , die auf Bakterien und auch phagozytierte Tumorzellen toxisch wirken und zu deren Abtötung führen. Die Radikale werden von der NADPH-Oxidase durch Oxidation von Sauerstoff mit Elektronen aus dem Hexosemonophosphatweg generiert. Einige dieser Radikale z.B. Superoxid und Hydrogen-Peroxid, scheinen selbst toxisch auf Bakterien oder Tumorzellen zu wirken, während anderen, weniger reaktiven Verbindungen eine mikrobizide Kraft eher durch Veränderung des pH-Werts im Phagosom zugesprochen wird. Die Abtötung von Mikroorganismen wird zusätzlich durch das Enzym Myeloperoxidase, das H_2O_2 benutzt um Chlor zu Hypochlorsäure und Chlorid zu oxidieren, verstärkt.

Der sauerstoffunabhängige Teil beruht auf der Abtötung von Mikroorganismen durch Enzyme (Hydrolasen und Proteasen) und kationische Proteine wie z.B.: Lactoferrin, Elastase, Collagenase und Cathepsin G. Diese werden in Granula der Phagozyten gespeichert und in das Phagosom freigesetzt, wo sie die

Zellwand der Bakterien angreifen. Auf diese Weise werden viele Erreger abgetötet, zerkleinert und über Exozytose wieder aus der Zelle heraustransportiert.

1.4.4 Adhäsionsmoleküle

Entscheidende Abwehrschritte, wie die Antigenerkennung und Antigenpräsentation, die Induktion einer humoralen Immunantwort, die Aktivierung zytotoxischer Zellen oder Makrophagen, die Immunzellmigration sowie die verschiedenen zytotoxischen Reaktionen erfordern den direkten Zell-zu-Zell-Kontakt über Adhäsionsrezeptoren. Die Up- und Down-Regulation der Adhäsionsrezeptoren erfolgt überwiegend in Zusammenspiel mit lokal sezernierten, stimulierenden und supprimierenden Zytokinen (z.B. Interleukin oder Tumornekrosefaktor).

Die Adhäsionsmoleküle sind chemisch betrachtet Proteine. Sie werden auf der Basis struktureller Homologien verschiedenen Molekülfamilien zugeordnet. Jeder Zelltyp verfügt über eine charakteristische „Grundausstattung“ spezieller Zelloberflächenmoleküle, die das Anhaften an Zellen oder Gewebe ermöglichen.

Die an der Leukozyten-Migration beteiligten Moleküle gehören zu den Selektinen, den Integrinen und der Immunglobulin-Superfamilie (15).

1.4.4.1 Selektine / L-Selektin

Die Familie der Selektine umfaßt drei Mitglieder, das E-, P-, und L-Selektin. Ihr bindungsrelevanter Bereich ist die Lektin-Domäne. Als Domäne bezeichnet man eine festgelegte Aminosäuresequenz im Eiweißmolekül. Das E- und P-Selektin kommt auf dem Endothel von Blutgefäßen vor, P-Selektin zusätzlich noch auf Thrombozyten. Das L-Selektin wird von Leukozyten exprimiert.

Die Selektine spielen eine große Rolle in der frühen Phase der Leukozyten-Emigration. Sie vermitteln den ersten Kontakt zwischen den Leukozyten und dem Gefäßendothel. Dies führt zu einem Phänomen, das als „Rolling“ bezeichnet wird. Dabei werden die Leukozyten von den Selektinen auf dem aktivierten Gefäßendothel „gefangen“ bzw. geführt und rollen an der Gefäßwand entlang bis sie an der Gefäßwand haften bleiben, und dann ins Gewebe emigrieren können.

1.4.4.2 Integrine / CD11b

Die Integrine sind eine große Familie von Molekülen und werden in den verschiedensten Geweben exprimiert. Chemisch betrachtet besteht ein Integrin aus zwei Untereinheiten (alpha und beta), die miteinander verbunden sind. Entsprechend der β -Untereinheiten ($\beta 1=CD29$, $\beta 2=CD18$, $\beta 3=CD61$ etc.) unterteilt man die Integrine in Subfamilien.

Zu den $\beta 2(CD18)$ -Integrine gehören drei Rezeptoren mit jeweils unterschiedlichen α -Ketten (CD 11 α , β , χ). Als Leukozyten-Integrine nehmen sie eine besondere Stellung ein.

Das Leukozyten-Funktions-Antigen-1 (LFA-1), auch CD11 α /CD18 bezeichnet, ist für eine Reihe wichtiger Lymphozytenfunktionen, einschließlich der zytotoxischen Reaktion, der Antigenerkennung und -präsentation, sowie der Adhäsion zum Endothel notwendig.

Das Integrin MAC-1 α (membran-attach-complex) auch CD11b/CD18 genannt, vermittelt die Adhäsion am Gefäßendothel. Es ist zudem ein Rezeptor für das Komplementprotein iC3 β i. Es wird von Granulozyten und Monozyten exprimiert. Durch die Integrinbindung kommt es nun zu einem festen Kontakt zwischen den Leukozyten und dem Gefäßendothel.

Die wesentlichen korrespondierenden Rezeptoren von CD11 α,β /CD18 auf dem Endothel und anderen Zellen sind die Adhäsionsmoleküle der Immunglobulin-Superfamilie.

1.4.5 Wirkung von Lokalanästhetika auf Immunfunktionen

Die Wirkung von Lokalanästhetika auf verschiedene Immunfunktionen wurde in den letzten Jahrzehnten wiederholt untersucht. Angeregt von der Frage, ob die Blockade verschiedener Ionenkanäle auch hemmende Wirkungen auf Zellen des Immunsystems hervorruft, die zu einer Begünstigung von Wundinfektionen und Abszessbildung führt, standen vor allem Untersuchungen im Vordergrund, die sich unter experimentellen Bedingungen einerseits mit der Fremdkörperabwehr und andererseits mit inflammatorischen Geschehen beschäftigten. Hierbei wurde einerseits experimentell eine Hemmung von Funktionen der Fremdkörperabwehr durch Lokalanästhetika gezeigt, andererseits auch eine potentiell therapeutisch verwendbare Verminderung von

inflammatorischen Funktionen bei Erkrankungen einer übersteigerten Immunantwort.

Die Frage, ob klinisch relevante Nebenwirkungen durch Lokalanästhetika wie z.B. eine Verzögerung der Wundheilung oder die Entstehung von epiduralen Abszessen in Folge von einer Regionalanästhesie zu erwarten sind, konnte bis heute nicht eindeutig geklärt werden. Tierexperimentelle Studien zeigen bislang widersprüchliche Ergebnisse. Da epidurale Abszesse eine sehr seltene, aber schwerwiegende Komplikation einer Regionalanästhesie sind, in denen als Haupterreger *S. aureus* identifiziert wurde, ist eine mögliche Beeinträchtigung der Bakterienabwehr hier von höchster Relevanz. Während für viele Lokalanästhetika eine dosisabhängige Hemmung des Bakterienwachstums nachgewiesen werden konnte, wachsen *S. aureus* auch in der Gegenwart von Lokalanästhetika. Aus dieser Beobachtung und den unten aufgeführten Arbeiten in vitro wurde eine mögliche Begünstigung von Infektionen abgeleitet. Arbeiten in vitro versuchten einzelne Komponenten der Bakterienabwehr im Bezug auf ihre Beeinflussung durch Lokalanästhetika zu untersuchen. Für Lidocain konnte eine dosisabhängige Hemmung der Chemotaxis, des oxidativen Burst (20), der metabolischen Aktivität (31,65) von Leukozyten und der Phagozytose nachgewiesen werden. Die Freisetzung von Lysozym, Myeloperoxidase und die Phagozytose von *E.coli* wurden unter dem Einfluß von Lidocain signifikant gehemmt. Zusätzlich wurde eine verminderte CD11b-Expression für Lidocain und Ropivacain nachgewiesen. Diese Effekte wurden unter der Verwendung verschiedenster experimenteller Stimuli gewonnen, jedoch ist der Effekt der Anästhetika auf die Immunfunktionen bei Verwendung lebender Bakterien bislang unbekannt.

Weitere Untersuchungen schlossen die Produktion von Immunmediatoren wie Leukotrien B4 (LTB4) und Interleukin 1 unter dem Einfluß von Lokalanästhetika ein. Beide Mediatoren haben eine wichtige chemotaktische Steuerungsfunktion für die Aktivität der Leukozyten (56) in der frühen Phase der Entzündungsreaktion und stimulieren die Fremdkörperabwehr.

Lokalanästhetika reduzieren die Freisetzung von Leukotrienen. In vitro Versuche mit humanen PMN und Monozyten zeigten eine deutliche Reduktion der Freisetzung von LTB4 unter verschiedenen Konzentrationen von Lidocain und Bupivacain (79). Für Ropivacain konnte eine Hemmung der

Lipoxygenase, die das proinflammatorische Leukotrien B₄ bildet, gezeigt werden.

Interleukin stimuliert die Leukozyten zur Phagozytose, oxidative Burst, Chemotaxis und Degranulation bei einer Entzündungsreaktion. In vitro Versuche mit Lidocain und Bupivacain (Lidocain 2-20mmol/l, Bupivacain 0,4-4,4mmol/l) zeigten eine dosisabhängige Reduktion der Freisetzung von Interleukin 1 von humanen Leukozyten, die durch Lipopolysaccharide zur Phagozytose stimuliert wurden (79).

Bei Erkrankungen, bei denen eine ausgeprägte inflammatorische Reaktion im Vordergrund steht, wurde den Lokalanästhetika ein potentiell benefizieller Effekt zugeschrieben.

Arlander et al. zeigten, daß Patienten mit Colitis ulcerosa, nach einer Applikation von 200 mg Ropivacain rectal über mehrere Tage, eine Verminderung der Entzündungsreaktion der Mukosa sowie eine deutliche Schmerzreduktion aufwiesen.

Tierexperimentelle Studien zeigten, dass dieser Effekt auf eine Verminderung des oxidativen Bursts und der LTB₄-Produktion zurückzuführen waren.

Ähnliche Effekte wurden auch bei tierexperimentellen Versuchen auf dem Gebiet des akuten Lungenversagens (ARDS) gezeigt. Nach einer künstlich erzeugten Aspiration konnte bei Hasen die Akkumulation von Granulozyten und Produktion von freien Radikalen durch den oxidativen Burst nach einer Gabe von Lidocain signifikant vermindert werden. Es kam dadurch zu einer Reduktion des Endothelschadens und einer Verringerung der Ödembildung (61). Mikawa et al. zeigten mit Lidocaingaben gleicher Konzentration eine signifikante Reduzierung der inflammatorischen Reaktion von Hasenlungen, die durch Endotoxine geschädigt wurden.

Weitere tierexperimentelle Arbeiten konnten auf dem Gebiet von Reperfusion nach künstlich induziertem Myokardinfarkt eine deutliche Reduktion des ischämischen Areales und der Infarktgröße nach Applikation von Lidocain zeigen. Dieser Effekt wurde ebenfalls auf eine Verminderung der Freisetzung reaktiver Sauerstoffmetabolite zurückgeführt.

1.5 Zusammenfassung und Ziel der Untersuchung

Die Lokalanästhetika Lidocain, Bupivacain und Ropivacain sind in der Klinik zur Lokal- und Regionalanästhesie sowie zur postoperativen und chronischen Schmerztherapie zur Zeit die am häufigsten verwendeten Lokalanästhetika. Die Wirkungen dieser drei Substanzen auf das Immunsystem sind jedoch bislang nicht eindeutig geklärt. Während den Lokalanästhetika einerseits potentiell benefizielle Eigenschaften bei Erkrankungen mit einer übersteigerten inflammatorischen Reaktion zugeschrieben werden, sind auf der anderen Seite mögliche negative Effekte durch Hemmung der Abwehr von Infektionen bislang nicht eindeutig geklärt. Vor allem die Bedeutung von Lokalanästhetika im Zusammenhang mit Abszessen, vor allem epiduralen Abszessen nach Regionalanästhesie ist bislang nicht geklärt, trotz der unbestrittenen hohen Relevanz auf dem Gebiet der Anästhesie. Die bislang am besten untersuchte Substanz ist das Lidocain, das eine vielfältige Hemmung unterschiedlichster Immunfunktionen verursacht. Die neueren Anästhetika Bupivacain und Ropivacain sind bezüglich der Hemmung von Immunfunktionen bislang kaum untersucht. Gerade im Hinblick auf die Entstehung von Abszessen fehlen experimentelle Untersuchungen, die den Einfluss von Anästhetika auf die Abwehr bakterieller Infektionen unter der Verwendung von Bakterien als Stimulus belegen.

Ziel der hier vorliegenden Arbeit war daher den Einfluss der drei Lokalanästhetika Lidocain, Bupivacain und Ropivacain auf die Phagozytosefunktion, oxidative Burst und CD11b-Expression humaner Leukozyten zu untersuchen. Dazu sollte ein durchflußzytometrisches Vollblutmodell mit lebenden *S.aureus* als Infektionserreger dienen.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob mit Hilfe dieses Modells eine mit vorliegenden Untersuchungen vergleichbare Hemmung der Immunfunktionen Phagozytose, oxidative Burst und CD11b-Expression zu erreichen ist. Weiterhin sollten die neueren Anästhetika Bupivacain und Ropivacain auf mögliche Einflüsse dieser Immunfunktionen untersucht werden. Falls sich Effekte dieser Anästhetika nachweisen lassen, sollte ein Vergleich der Anästhetika bezüglich der Potenz der hemmenden Eigenschaften gezogen werden.

2. Materialien und Methoden

2.1 Materialien

Tabelle 1: Verwendete Materialien

Reagenz	Best.Nr.	Hersteller
N-Ethylmaleimide	E-3876	Sigma, St. Louis, USA
RPMI- 1640 Medium	R-8005	Sigma, St. Louis, USA
PBS	H 15-002	PAA Laboratories, Linz
Essigsäure	A-8153	Sigma, St. Louis, USA
Dimethylsulfoxid	D-5879	Sigma, St. Louis, USA
Lysing Solution	349202	Becton Dickinson, Heidelberg
Aqua dest., hauseig. Filteranlage	Seral pur	Seral, Ransbach
Vetren 200	V 767	Byk Gulden, Konstanz
Albumin bovine fraction V	A-8412	Sigma, St. Louis, USA
Lidocain	ZE 317	Astra, Wedel
Bupivacain	YJ-735-A01	Astra, Wedel
Ropivacain	YI-87	Astra, Wedel

Tabelle 2: Farbstoffe und Antikörper

Calcein-AM, Special packing	C-3100	Molecular probes, Eugene
Dihydroethidium	D-7008	Sigma, St. Louis, USA
Crystal violet	C-3886	Sigma, St. Louis, USA
Acridineorange	A-6014	Sigma, St. Louis, USA
Mouse Anti Human CD 11 b	MHCD 11b 01	Caltag, Burlingame, USA
Mouse IgG 1 FITC	MG 101	Caltag, Burlingame, USA

Mouse monocl. Antibody to Human CD 14 tri-colour conjugate	MHCD 1406	Caltag, Burlingame, USA
Mouse IgG 2a tri-colour conjugate	MG2a06	Caltag, Burlingame, USA
IgG 1-RPE conjugate	MG 104	Caltag, Burlingame, USA
Myeloid cell, CD 13 RPE	R 0715	DAKO, Denmark
Mouse Anti Human CD 62L	347443	Becton Dickinson, Heidelberg.

Tabelle 3: Material für die Bakterienkultur

<i>S. aureus</i> ATCC 25923	25923	Americ. Cultur Collect., Mannasas, USA
Mannit-Kochsalz-Agar	RPP 027	Oxoid, Wesel
Laked horse blood	SR 48	Oxoid, Wesel
D.S.T.-Agar	RPP 068	Oxoid, Wesel
Tryptone soya broth	CM 129	Oxoid, Wesel

Tabelle 4 : Geräte und Reaktionsgefäße

Falcon Tubes	2052	Becton Dickinson, Heidelberg
Falcon Tubes	2070	Becton Dickinson, Heidelberg
Greiner Tubes, cellstar	163160	Greiner, Frickenhausen
Waage	PK4800 Deltarang	Mettler, Gießen
Eppendorfreaktionsgefäße	3810	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer	5436	Eppendorf, Hamburg
Wasserbad	1003	GFL, Burgwedel
Zentrifuge	TJ-6	Beckmann
Wärmeschrank	T-6060	Heräus
Zählkammer	Improved	Assistent, Karl Hecht, Sontheim, Rhön

pH - Meter	pH – Meter 539	WTW, Weilheim
Gefrierschrank		Liebherr, Biberach
Mikroskop	Leitz DM IRB	Leica, Bensheim
FACS Scan	Facs Sort	Becton Dickinson, Heidelberg
Vortex	Vortex Genie 2	Bender-Hobein, Wien

2.2 Methoden

2.2.1 Herstellung der Lösungen:

- **Kristallviolett-Lösung** (Hayem`sche Lösung) zum Auszählen der Leukozyten : Es wurden 100 ml einer 3% Essigsäure mit 5 mg Kristallviolett hergestellt.
- **NEM-Lösung**: 1,25 g NEM wurden in 100 ml PBS gelöst (100 mM). Diese Lösung wurde in Eppendorfcups zu 1 ml aliquotiert und bei –20° C eingefroren. Zu den Versuchen wurden einige Aliquots aufgetaut und mit PBS auf 1:10 verdünnt (10mM).
- **Calcein-AM-Lösung**: Zur Färbung der Bakterien wurde ein Röhrchen mit Calcein – AM aufgetaut und mit 37 µl DMSO versehen.
- **Dihydroethidium-Lösung** (25 µg/ml): 1,25g Dihydroethidium wurden in 50 ml DMSO gelöst, aliquotiert und bei -20°C eingefroren.
- **Acridine-Orange-Lösung** (0,05 %):In 100 ml PBS wurden 50 mg Acridine-Orange-Lösung gelöst.
- **Azur - A Lösung (10 %)**: In 10 ml PBS wurden 1 g Azur - A gelöst.

2.2.2 Färbung der Staphylokokken

Um Schwankungen in der Fluoreszenzintensität und Variabilität der Bakterien zu minimieren, wurde einmalig eine Charge Bakterien hergestellt, die bis zum jeweiligen Versuch bei –20 ° gelagert wurde.

Aus den in Pferdeblut gelagerten Staphylokokken wurden 10 µl auf Mannit-Kochsalz-Agar-Platten ausgespatelt und 24 h im Wärmeschrank inkubiert.

Nach der Inkubation wurden einige Kolonien in vorbereitete Röhrchen mit 10 ml TSB überimpft und 3 h bei 37° im Wasserbad inkubiert. Die Röhrchen wurden anschließend bei 375 g 5 min zentrifugiert und zweimalig mit PBS gewaschen.

Um Schwankungen in der Bakterienkonzentration auszuschließen, wurden die Bakterienpellets gepoolt und anschließend in neuen Röhrchen verteilt.

In jedes Röhrchen wurden 8 µl der Calcein-AM-Lösung zugegeben und bei 37° für 50 min inkubiert. Anschließend wurde nochmals mit PBS gewaschen und die Bakterienlösung erneut gepoolt. Für die Lagerung wurden daraufhin die Bakterien zu 200 µl in RPMI aliquotiert.

Die Bakterienkonzentration wurde durch Auspateln verschiedener Verdünnungen ermittelt. Es waren in jedem Aliquot circa 2×10^9 Bakt./ml vorhanden.

Um Veränderungen der Variabilität auszuschließen, wurden an jedem Versuchstag aus dem aufgetauten Aliquots Verdünnungen ausgespatelt, um die jeweilige Bakterienkonzentration zu ermitteln.

Als Kontrolle für die Fluoreszenz wurde mit identischen Einstellungen des Durchflußzytometers die Fluoreszenzintensität der gefärbten Staphylokokken bestimmt.

Die ungefärbten Bakterien für den oxid. Burst - / CD 11 b - Assay wurden nach Inkubation im Wasserbad zweimal mit PBS gewaschen, gepoolt und in RPMI aliquotiert. Hier wurde ebenso an jedem Versuchstag die Kontrolle der Bakterienkonzentration durchgeführt.

2.2.3 Phagozytoseassay

Probengewinnung

Von gesunden Probanden wurden 10 ml Vollblut sofort nach Abnahme mit 500 µl Vetren 200 versehen. Weitere 5 ml Blut wurden ohne Zugabe von Vetren zur Gewinnung von Serum 5 min bei 750 g zentrifugiert.

Zellzahlbestimmung

25 µl Vollblut wurden mit 475 µl Hayemsche Lösung versehen. Nach der Lyse der Erythrozyten wurden in der Neubauer-Zählkammer sowohl Granulozyten als auch Monozyten gezählt.

Lokalanästhetika

Die Lokalanästhetika Lidocain, Bupivacain und Ropivacain wurden in drei unterschiedlichen Konzentrationen untersucht:

Tabelle 5: Verwendete Lokalanästhetika in unterschiedlichen Konzentrationen und Konzentrationsangaben

Medikament	Konzentration in µg / ml Blut		
Lidocain	2,5 µg/ml,	25 µg/ml,	500 µg/ml
Bupivacain	2,0 µg/ml,	20 µg/ml,	250 µg/ml
Ropivacain	2,0 µg/ml,	20 µg/ml,	250 µg/ml
Medikament	Konzentration in µmol / ml Blut		
Lidocain	9,2 µmol/l	92,2 µmol/l	1846 µmol/l
Bupivacain	6,1 µmol/l	61,6 µmol/l	770 µmol/l
Ropivacain	6,4 µmol/l	64 µmol/l,	801 µmol/l
Medikament	Konzentration in Prozent / ml Blut		
Lidocain	0,00025 %	0,0025 %	0,05 %
Bupivacain	0,0002 %	0,002 %	0,025 %
Ropivacain	0,0002 %	0,002 %	0,025 %

Die Lokalanästhetika wurden mit isotoner (nicht bakteriostatischer) Natriumchloridlösung auf die jeweiligen Konzentrationen verdünnt und in einem

Endvolumen von 100 µl zu der Vollblutprobe zugegeben. Als Kontrolle wurde zu einer Vollblutprobe 100 µl NaCl 0,9% zugegeben. In den Versuchen wurden alle Konzentrationen eines Lokalanästhetikums untersucht.

Die Blutproben (mit und ohne LA) und die Bakteriensuspension wurden 30 min. bei 37°C im Wasserbad inkubiert.

Bakterien

Die für den jeweiligen Versuch benötigte Bakteriensuspension wurde mit 10 % autologem Serum in RPMI verdünnt, so daß 5 mal so viel Bakterien wie Leukozyten des jeweiligen Probanden pro ml vorhanden waren.

Um ein Präopsonieren der Bakterien zu erreichen und damit eine rasche Phagozytose zu ermöglichen, wurde die Suspension für 30 min. bei 37°C im Wasserbad inkubiert.

Zur Kontrolle wurde die im Ansatz vorhandene Konzentration der Bakterien durch Ausspateln einer Verdünnungsreihe ermittelt.

Nach der Inkubation wurden Bakteriensuspension und Blut 40 min. auf Eiswasser gelagert.

Phagozytose

Die Phagozytose wurde zu den Zeitpunkten 0, 2.5, 5, 10, 30 und 60 min. bestimmt.

Dafür wurden Eppendorfcups für die Phagozytoseproben auf Eis vorbereitet und mit jeweils 100 µl RPMI gefüllt. Die Eppendorfcups der 0 min-Werte wurden zusätzlich mit 400 µl NEM (10 µM) versehen.

Nun wurden die Vollblutproben im Verhältnis 1:1 mit der Bakteriensuspension gemischt, gevortext und zu 200 µl in die Eppendorfcups pipettiert.

Alle 0 min. Werte wurden nach kurzem vortexen auf Eis belassen.

Die anderen Eppendorfcups wurden für die oben beschriebenen Zeiten im 37°C warmen Thermomixer bei 1100 U/min inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 400 µl NEM (10 mM) zupipettiert um die Phagozytose zu stoppen. Die Proben wurden kurz gevortext und auf Eis gelagert.

Um eine getrennte Bestimmung der Phagozytose von Granulozyten und Monozyten zu ermöglichen, wurden die Leukozyten mit monoklonalen Mausantikörpern gegen CD13 und CD14 markiert.

Zu jeder Probe wurden 10 µl CD13 PE zur Markierung der Granulozyten und 7 µl CD14 PE Cy5 zur Markierung der Monozyten zugegeben und mit den Antikörpern 20 min. lang bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert.

Da die Antikörper, außer an spezifische Epitope wie zum Beispiel CD 13 und CD 14 unspezifisch an humane Antigene binden können (z.B. über das Fc-Fragment), wurden in jedem Versuch Kontrollproben fluoreszenzmarkierter unspezifischer IgG-Antikörper der gleichen Subklasse mitgeführt (Isotypkontrolle).

Da sich die Emissionspektren der drei Fluoreszenzfarbstoffe teilweise überlagern, wurden zusätzliche Kontrollproben für die Empfindlichkeitskompensation vorbereitet.

Die Kontrollproben sind im folgendem aufgeführt :

Tabelle 6: Kontrollproben

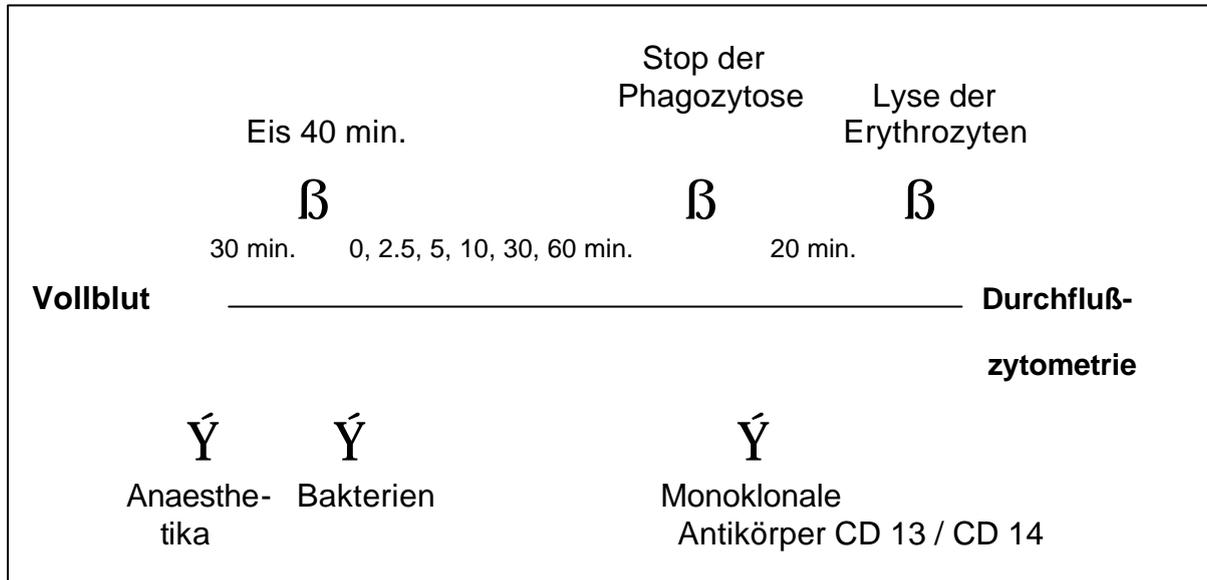
Isotypkontrolle:	Leukozyten + 10µl Mouse IgG1 PE und 7 µl Mouse IgG2a tri
Calcein-AM:	Leukozyten, die gefärbte Bakterien phagozytiert hatten (dieses Röhrchen wurde mit den Phagozytoseproben zusammen 20 min. im Thermomixer inkubiert)
PE :	Leukozyten + 10µl CD13 PE
PE – Cy5 :	Leukozyten + 7 µl CD14 tricolor

Nach Inkubation der Blutproben mit den monoklonalen Antikörpern wurden 2 ml Lyselösung zur Lyse der Erythrozyten zugegeben, die Proben gevortext und 10 min. im Dunkeln bei Zimmertemperatur gelagert.

Danach wurden die Proben 5 min. bei 350 g zentrifugiert und ein weiteres mal mit 1,5 ml Lyselösung lysiert.

Nach Abgießen des Überstandes wurden die Proben mit 300 µl PBS versehen und bis zur durchflußzytometrischen Bestimmung auf Eis gelagert.

Abbildung 4: Ablaufschema der Phagozytose



2.2.4 oxidative Burst - / CD 11b-Assay

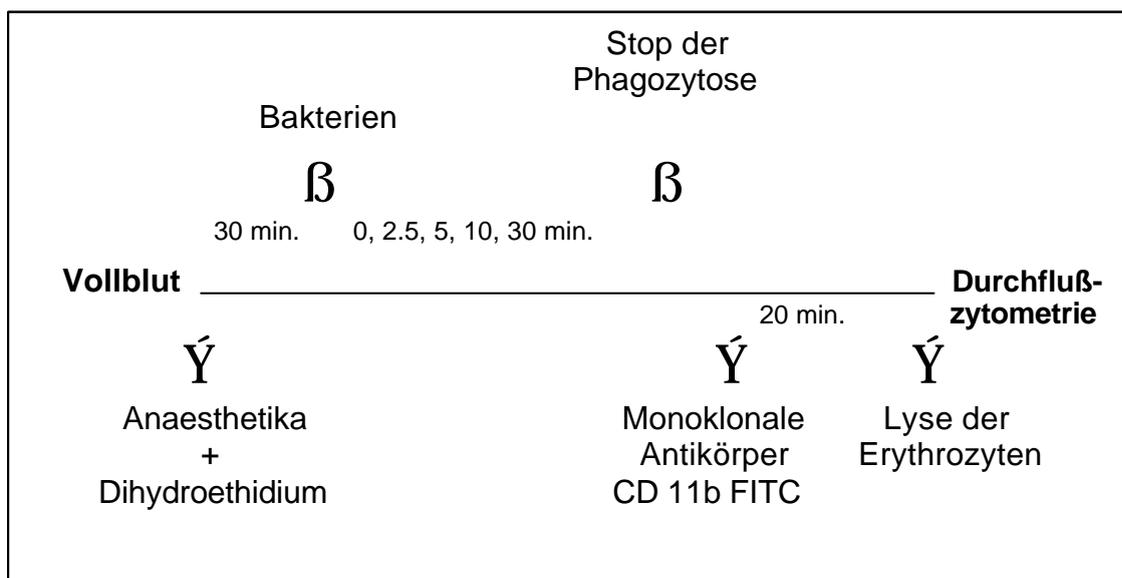
Das Vollblut wurde wie in 2.2.3 beschrieben heparinisiert und die Zellzahl bestimmt. Zu 10 ml heparinisiertem Vollblut wurden 200 µl Dihydroethidium (25 µg/ml) zugegeben. Als Kontrolle für die Kompensation und Fluoreszenzintensität wurden in zwei zusätzlichen Proben zu Vollblut ohne DHE 10 µl IgG1 FITC und 10 µl CD11b FITC zugegeben. In einer dritten Probe wurden als Kontrolle für den oxidative Burst ungefärbte Bakterien mit DHE versehenem Blut inkubiert.

Aufgrund des Lichtemissionsspektrums von DHE wurde bei der gleichzeitigen Bestimmung der CD 11b-Expression und des oxidative Burst auf die Verwendung fluoreszenzmarkierter Bakterien verzichtet. Da das Emissionsspektrum von DHE von 550 bis 720 nm streut, wird die Fluoreszenz gleichzeitig in Kanal 2 und 3 des Durchflußzytometers detektiert und ist nicht durch eine Kompensationseinstellung zu unterdrücken. Da bei einem Bakterien-zu-Leukozyten-Verhältnis von 5 : 1 die Leukozyten gut über ihre Scattereigenschaften (Größe und Granularität) abzugrenzen sind, konnte auf

die Markierung mit monoklonalen Antikörpern gegen CD 13 und CD 14 verzichtet werden

Das weitere Vorgehen war identisch mit dem des Phagozytoseassays. Nach dem Präopsonieren der Bakterien im Wasserbad wurden die Proben 40 min. auf Eis gestellt. Danach wurden die Bakterien wie in 2.2.3 beschrieben zum Vollblut zugegeben und die Proben für die entsprechenden Zeiten inkubiert. Anschließend wurde die Phagozytose mit 400 µl NEM abgestoppt und die Proben mit dem monoklonalen Antikörper gegen CD11b FITC für 30 min. im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Erythrozyten wurden wie oben beschrieben lysiert. Bis zur durchflußzytometrischen Messung verblieben die Proben auf Eis vorbereitet.

Abbildung 5: Ablaufschema oxidative Burst / CD 11b



2.2.5 L-Selektin

In Vorversuchen wurde ermittelt, ob während der Phagozytose eine Abnahme der L-Selektin Expression zu beobachten ist. Es wurden nun in den Phagozytoseansätzen verschiedene Versuchsschritte geändert, um den genauen Zeitpunkt der abnehmenden L-Selektin Expression näher bestimmen zu können. Das Blut wurde wie oben beschrieben heparinisiert, mit Lokalanästhetika bzw. NaCl 0,9% versetzt und 30 min. im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde in den einzelnen Proben, wie unten in der Tabelle aufgeführt, auf die Zugabe von Bakterien oder die Inkubation im Thermomixer verzichtet.

Tabelle 7: Probenbehandlung zur L-Selektin Bestimmung

Versuchsschritte	1	2	3	4	5
30 min. in 37° C Warmwasserbad	∅	J	J	J	J
40 min. Lagerung auf Eis	J	J	J	J	J
Zugabe der Bakterien	∅	J	J	J	J
Thermomixer bei 37°C u. bestimmter Dauer [min]	∅	∅	2.5	5	20
Lagerung auf Eis in Eppendorfcups	J	J	J	J	J
Inkubation mit Antikörpern gegen L-Selektin	J	J	J	J	J

Alle Vollblutproben wurden anschließend lysiert und im Durchflußzytometer gemessen. Als Kontrolle diente eine Probe aus Vollblut, bei der lediglich nach Markierung mit L-Selektin die Lyse der Erythrozyten erfolgte.

2.2.6 Durchflußzytometrie

Das Durchflußzytometer ist ein optisches Meßsystem, mit dem Zellen mit Hilfe von Farbstoffen und Antikörpern nach verschiedenen Parametern ausgewertet werden können.

Die Zellen befinden sich in einer Trägerflüssigkeit, mit der sie in einer laminaren Strömung angesaugt werden (hydrodynamische Fokussierung) und von einem fokussierten Strahl eines Lasers getroffen werden. Bei dem Kontakt einer Zelle mit dem Laser kommt es zu einer Streuung und Brechung des Laserstrahles und die eingebrachte Farbstoffe geben, in unterschiedlichen Emissionsspektren, Licht ab.

Die Elektronik und das optische Detektionssystem des Durchflußzytometers quantifizieren die Fluoreszenz und das Streulicht jeder einzelnen Zelle. Die Analyse des Durchflußzytometers besteht aus einer Vielzahl von Einzelzellmessungen.

Der Laser des Durchflußzytometers, welcher bei dieser Arbeit zur Anwendung kam, ist ein Argonionenlaser mit einem Emmissionsspektrum von 488 nm.

Unter Fluoreszenz versteht man eine rasch abklingende Lichtemission eines Moleküles, die unter Absorbition energiereicher Strahlung entstanden ist. Durch die Laserenergie werden die Schalelektronen der fluoreszierenden Verbindungen auf ein höheres Energieniveau gehoben. Beim Rücksprung der Elektronen zum Ausgangsniveau emittiert das Molekül Energie in Form von Wärme und Licht. Das Licht wird von Photodektoren des Durchflußzytometers registriert und in elektrische Pulse umgewandelt.

Neben der Fluoreszenz erfasst das Durchflußzytometer das entstehende Streulicht. Durch die Zelloberfläche und den Zellorganellen kann aufgrund unterschiedlicher Brechungswinkel auf die Größe und Granularität der Zelle geschlossen werden.

Das dabei entstehende Vorwärtsstreulicht ist sensitiv für die Querschnittsfläche der Zelle und sagt etwas über die Zellgröße aus (Forwardscatter). Das Seitwärtsstreulicht (Sidescatter) ist sensitiv für den Refraktionsindex und gibt Informationen über die Zellgranularität.

Fluoreszenzmarkierte monoklonale Antikörper binden an den spezifischen und auch an den unspezifischen Epitopen der Zelloberfläche. Um einen Messfehler durch Zählung unspezifischer Fluoreszenzaktivitäten zu vermeiden, wurde vor jedem Versuch mit Hilfe von Isotypkontrollen die unspezifische Fluoreszenzaktivität ermittelt und das Durchflußzytometer so justiert, dass die unspezifischen Bindungen nicht fluoreszenzpositiv erschienen.

Auswertung der Proben

Die Erfassung von Granulozyten und Monozyten wurde mit Hilfe von Regionen und definierten Gates durchgeführt.

Mit den Regionen wurde auf dem Bildschirm des Durchflußzytometerrechners eine zu analysierende Population von Zellen eingegrenzt.

Mit dem Setzen von Gates (= Auswertefenster) wurde festgelegt, welche Regionen bzw. deren Zellen in die rechnerische Erfassung aufgenommen wurden. Mit den Regionen und Gates ist eine selektive Erfassung und Verrechnung von Zellen möglich.

Die Regionen (R) und Gates (G) wurden dann wie folgend miteinander verknüpft.

Phagozytose

Tabelle 8: Verknüpfungen und Definitionen der Gates und Regionen für die Phagozytose

G 1	R 1	Phagozytierende Zellen mit gefärbten (gef.) Staphylokokken
G 2	R 2 u. nicht R 3	CD 13 exprimierende Granulozyten
G 3	R 3	CD 14 exprimierende Monozyten
G 4	R 1 und G 2	CD 13 expr. Granulozyten und gef. Staphylokokken
G 5	R 1 und R 3	CD 14 expr. Monozyten und gef. Staphylokokken
G 9	R 4 und G 4	CD 13 expr. Granulozyten und phagozytierte gef. Staphylokokken in Region 4
G 10	R 4 und G 5	CD 14 expr. Monozyten und phagozytierte gef. Staphylokokken in Region 4
G 11	R 4 und G 2	CD 13 expr. Granulozyten in Region 4
G 12	R 4 und G 3	CD 14 expr. Monozyten in Region 4

Auswertung der Phagozytose der Granulozyten : G 9 / G 11

Phagozytose der Monozyten : G 10 / G 12

oxidative Burst / CD 11b

Tabelle 9: Verknüpfungen und Definitionen der Gates und Regionen für oxidative Burst und CD 11b

G 1	R 1	CD11b positive Granulozyten und Monozyten
G 2	R 2	DHE – positive Zellen
G 3	R 1 und R 2	CD11b exprim. u. DHE pos. Granulozyten u. Monozyten
G 4	R 3	Monozyten
G 5	R 4	Granulozyten
G 6	R 1 o. R 2 u. R 4	CD11b oder DHE positive Granulozyten
G 7	R 1 o. R 2 u. R 3	CD11b oder DHE positive Monozyten

Auswertung des oxidative Burst:

Granulozyten : G 6 / R 4

Monozyten : G 7 / R 4

Auswertung der CD 11b Expression:

Granulozyten : G 6 / R 4

Monozyten : G 7 / R 3

Da bei der Bestimmung von CD 11b und oxidative Burst auf eine Detektion der Granulozyten und Monozyten mit monoklonalen Antikörpern verzichtet wurde, konnten die Zellen nicht über ihre Fluoreszenzintensität detektiert werden. Stattdessen wurden sie hier über ihre Scattereigenschaften, d.h. Größe (FSC) und Granularität (SSC) identifiziert. Hierzu wurden die Granulozyten und Monozyten in Regionen erfasst (R3 und R4). Die Fluoreszenzintensität von DHE und CD 11b wurde entsprechend der Regionen für Granulozyten und Monozyten (G6 und G7) und in Histogrammen für die jeweiligen Fluoreszenzen dargestellt.

2.2.7 Statistische Auswertung

In jeder Probe wurde bei 8000 Leukozyten der Anteil der phagozytierenden Granulozyten und Monozyten sowie die Fluoreszenzintensität gemessen und der Mittelwert der jeweiligen Parameter bestimmt. Die Auswertung erfolgte getrennt für Granulozyten und Monozyten. Die Daten wurden auf elektronische Speichermedien übertragen und mit Hilfe des Computerprogramms JMP (JMP, SAS Institute Inc., Cary, USA) statistisch ausgewertet.

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe einer Varianzanalyse (ANOVA). Die Zielgröße wurde als Anteil der phagozytierenden Granulozyten und Monozyten bzw. Fluoreszenzintensität definiert. Als Einflußgrößen gingen die verschiedenen Konzentrationen der Lokalanästhetika, die Probanden, die Meßzeitpunkte sowie die Interaktionen der Lokalanästhetika ein. Signifikante Unterschiede in Phagozytosefunktion und Fluoreszenzintensität bei verschiedenen Konzentrationen zu den jeweiligen Meßzeitpunkten wurden mit Students t -Tests ermittelt. Wo erforderlich, wurde eine Alpha-Adjustierung nach Bon-Feroni-Holm durchgeführt.

Das Signifikanzniveau wurde für alle Ergebnisse bei $p < 0,05$ festgelegt.

Für die graphische Darstellung im Ergebnisteil wurden der Mittelwert und die Standardabweichung verwendet.

3. Ergebnisse

3.1 L - Selektin

In verschiedenen Ansätzen sollte nachgewiesen werden, in wie weit Versuchsaufbau und Phagozytose die L–Selektin Expression beeinträchtigen. Bereits nach 2,5 min Phagozytosedauer war kein L-Selektin mehr auf der Leukozytenoberfläche nachzuweisen. Daher sollte ausgeschlossen werden, daß dieser Effekt durch den Versuchsaufbau bedingt war. Die Proben wurden daher zum einen nicht mit Bakterien inkubiert oder bei Zugabe der Bakterien nicht erwärmt. Die Expression von L–Selektin zeigte bis zum Beginn der Phagozytose (einschließlich Probe 2) keine Unterschiede zu der Kontrolle aus lysierten mit L-Selektin markierten Vollblut. Daher ließ sich eine Aktivierung der Leukozyten durch den Versuchsaufbau ausschließen. Das Abscheren von L-Selektin erfolgte erst durch die Aktivierung der Zellen während der Phagozytose.

Tabelle 10 : Ergebnis der Probenbehandlung zur L-Selektin Bestimmung

Versuchsschritte	1	2	3	4	5
30 min. in 37° C Warmwasserbad	N	J	J	J	J
40 min. Lagerung auf Eis	J	J	J	J	J
Zugabe der Bakterien	N	J	J	J	J
Thermomixer bei 37°C u. bestimmter Dauer [min]	N	N	2.5	5	20
Lagerung auf Eis in Eppendorfcups	J	J	J	J	J
Inkubation mit Antikörpern gegen L-Selektin	J	J	J	J	J
L-Selektin nachweisbar	Ja	Ja	Nein	Nein	Nein

3.2 Lokalanästhetika

3.2.1 Lidocain

In den Konzentrationen von 2,5 µg/ml und 25 µg/ml beeinflusste Lidocain zu keinem Zeitpunkt Phagozytose, oxidative Burst und CD 11b Expression der Granulozyten oder Monozyten.

In der höchsten Konzentration von 500 µg/ml trat eine signifikante Hemmung der Phagozytose der Granulozyten nach 30 und 60 min auf. Der oxidative Burst und die CD 11b-Expression wurden ebenfalls signifikant vermindert.

Die Monozyten waren zu keinem Zeitpunkt von dieser Hemmung betroffen.

Abb.6 : Mittelwerte und Standardabweichungen der Phagozytose der Granulozyten nach Zugabe von Lidocain in verschiedenen Konzentrationen. Signifikante Hemmung ($p < 0,002$) bei 500 µg/ml Lidocain nach 30 und 60 min Inkubationszeit.

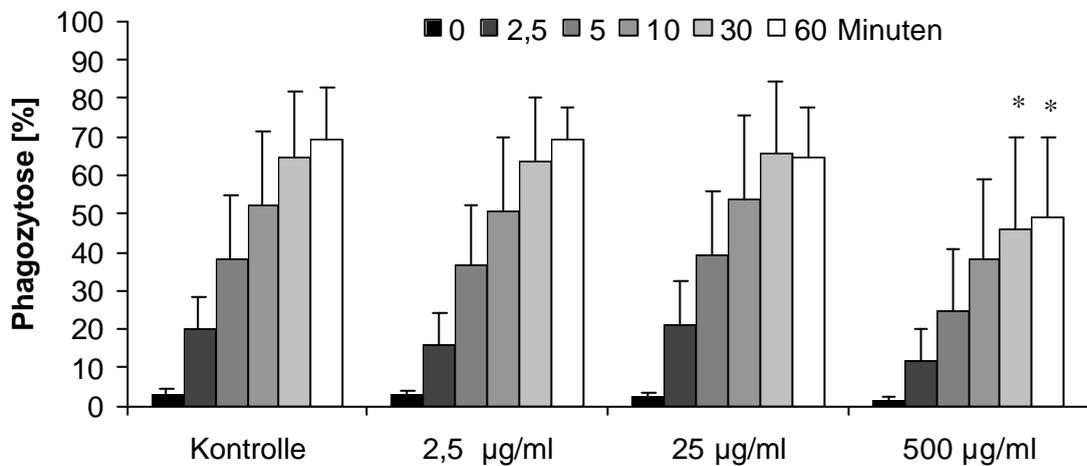


Abb.7 : Mittelwerte und Standardabweichungen der Phagozytose der Monozyten nach Zugabe von Lidocain in verschiedenen Konzentrationen.
Eine signifikante Hemmung konnte nicht nachgewiesen werden.

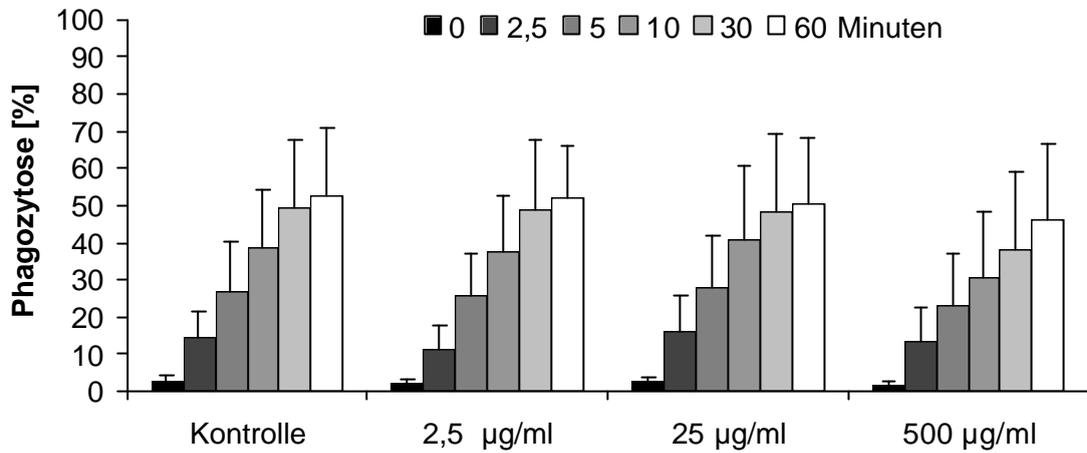


Abb. 8 : Mittelwerte und Standardabweichungen des oxidative Burst der Granulozyten nach Zugabe von Lidocain in verschiedenen Konzentrationen.
Signifikante Hemmung * ($p < 0,0001$) nach 30 Minuten bei 500 µg/ml Lidocain.

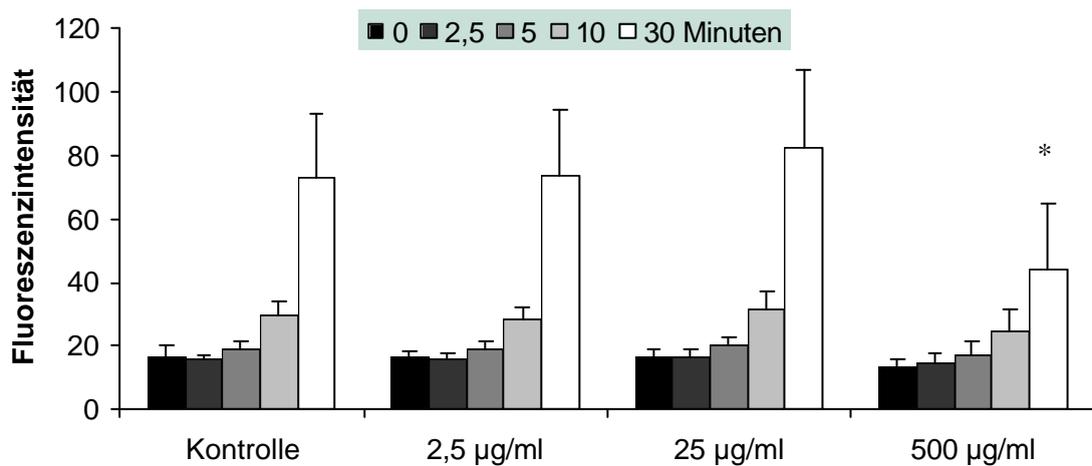


Abb.9 : Mittelwerte und Standardabweichungen des oxidative Burst der Monozyten nach Zugabe von Lidocain in verschiedenen Konzentrationen. Eine signifikante Hemmung konnte nicht nachgewiesen werden.

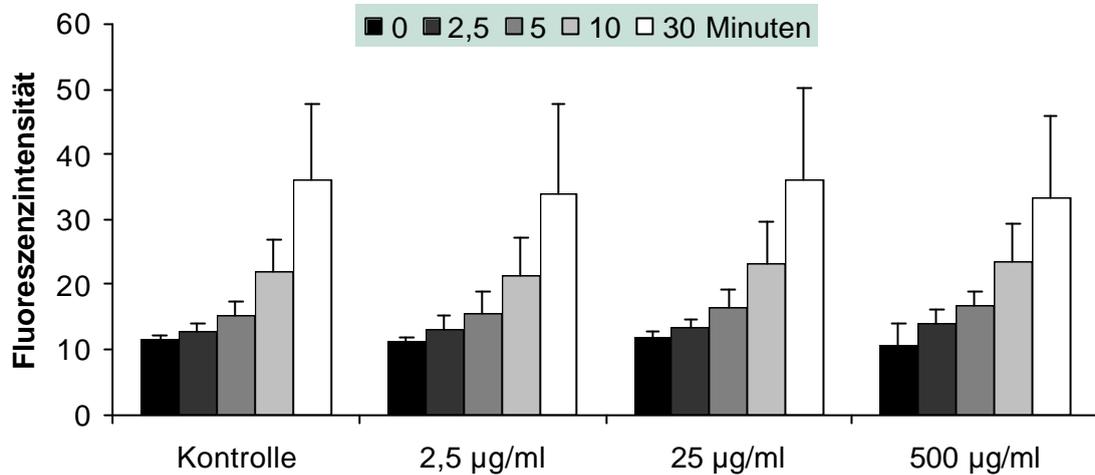


Abb.10 : Mittelwerte und Standardabweichungen der CD11b Expression der Granulozyten nach Zugabe von Lidocain in verschiedenen Konzentrationen. Signifikante Hemmung * ($p < 0,006$) bei 500 µg/ml Lidocain nach 10 und 30 Minuten Inkubationszeit.

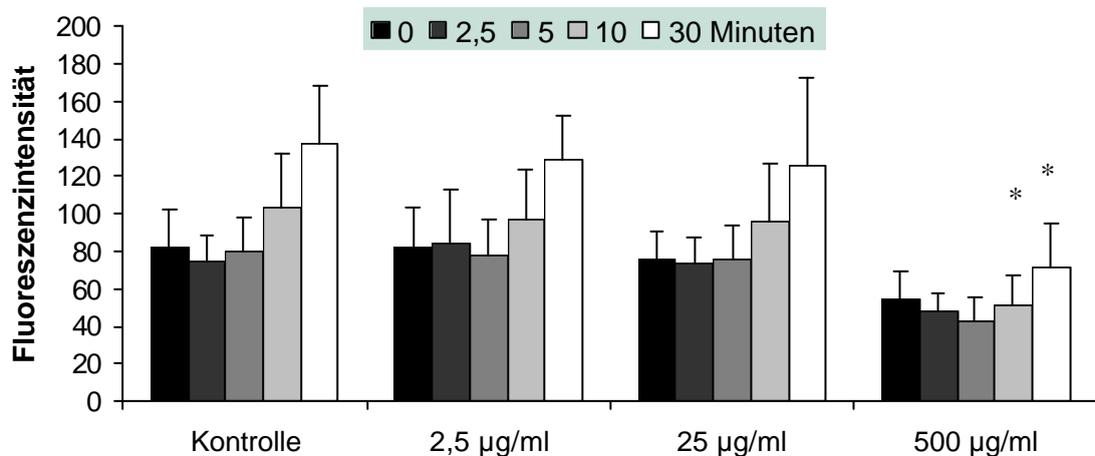
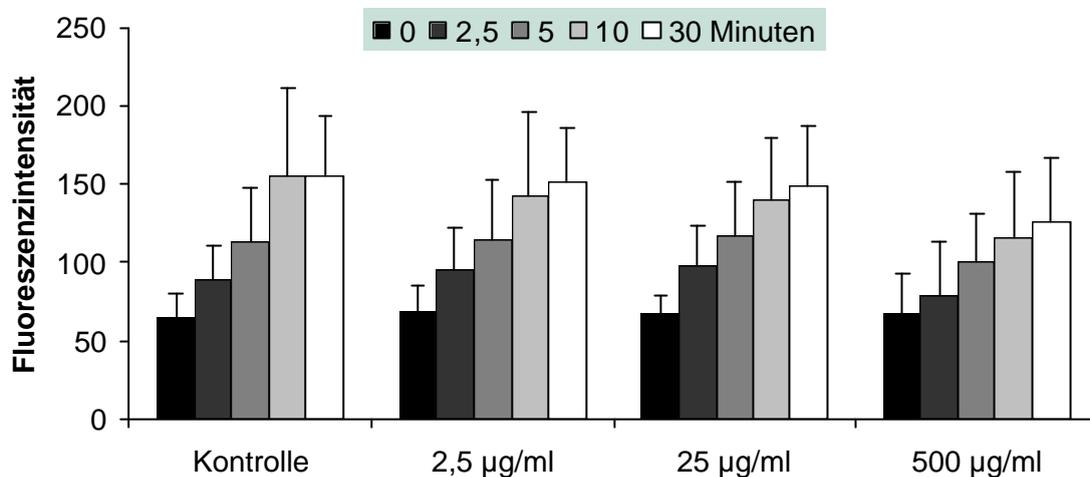


Abb.11 : Mittelwerte und Standardabweichungen der CD11b Expression der Monozyten nach Zugabe von Lidocain in verschiedenen Konzentrationen. Eine signifikante Hemmung konnte nicht nachgewiesen werden.



3.2.2 Bupivacain

Bei den Bupivacainkonzentrationen von 2 µg/ml und 20 µg/ml wurden bei der Phagozytose, Burst und CD 11b Expression der Granulozyten und Monozyten keine signifikanten Hemmungen nachgewiesen.

In der höchsten Konzentration von 250 µg/ml trat bei den Granulozyten eine signifikante Hemmung der Phagozytose nach 10 und 30 min Inkubationszeit, bei dem oxidative Burst nach 30 min Inkubationszeit und bei der CD 11b Expression nach 10 und 30 min Inkubationszeit auf.

Abb.12 : Mittelwerte und Standardabweichungen der Phagozytose der Granulozyten nach Zugabe von Bupivacain in verschiedenen Konzentrationen.
 Signifikante Hemmung * ($p < 0,002$) bei 250 $\mu\text{g/ml}$ nach 10 und 30 Minuten

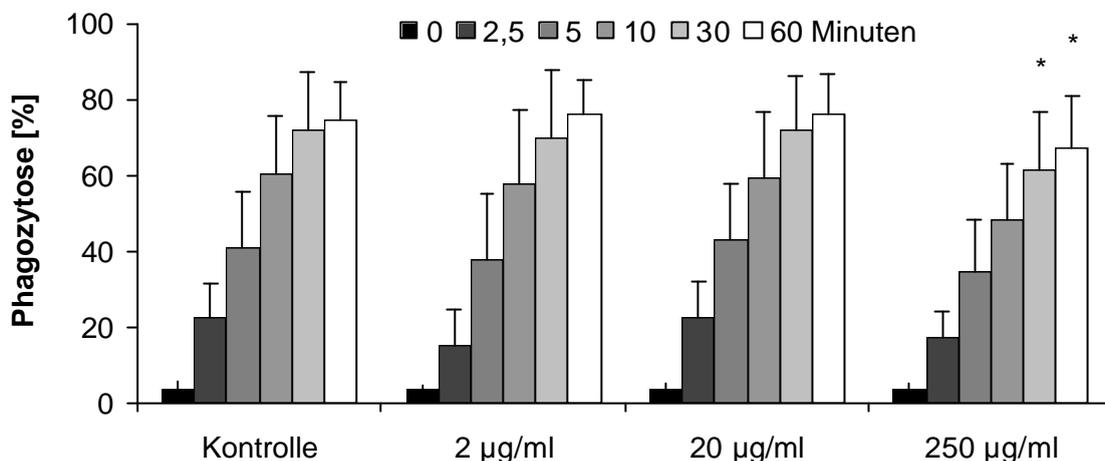


Abb.13 : Mittelwerte und Standardabweichungen der Phagozytose der Monozyten nach Zugabe von Bupivacain in verschiedenen Konzentrationen
 Eine signifikante Hemmung konnte nicht nachgewiesen werden.

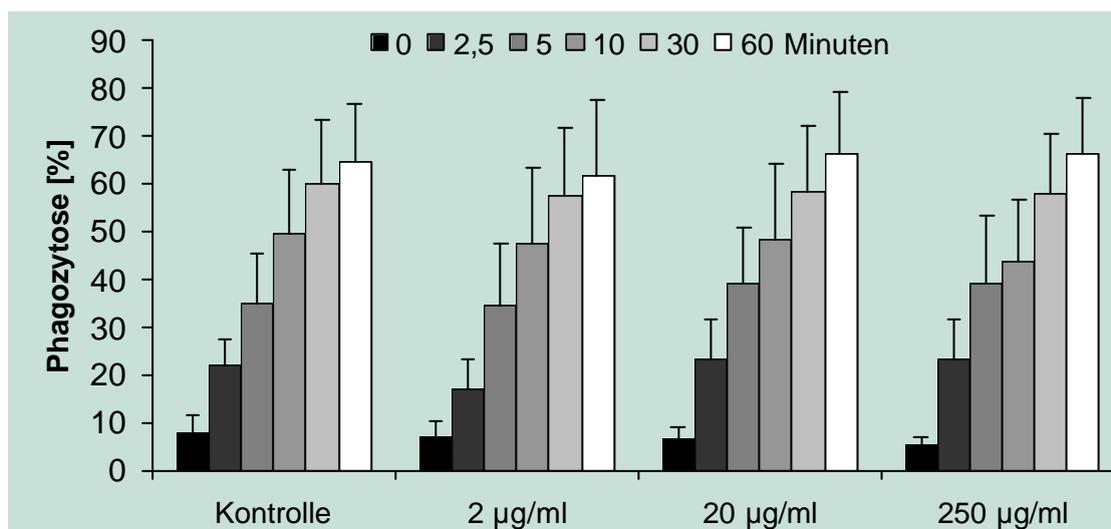


Abb. 14: Mittelwerte und Standardabweichungen des oxidative Burst der Granulozyten nach Zugabe von Bupivacain in verschiedenen Konzentrationen. Signifikante Hemmung * ($p < 0,0001$) nach 30 Minuten bei 250 $\mu\text{g/ml}$ Bupivacain.

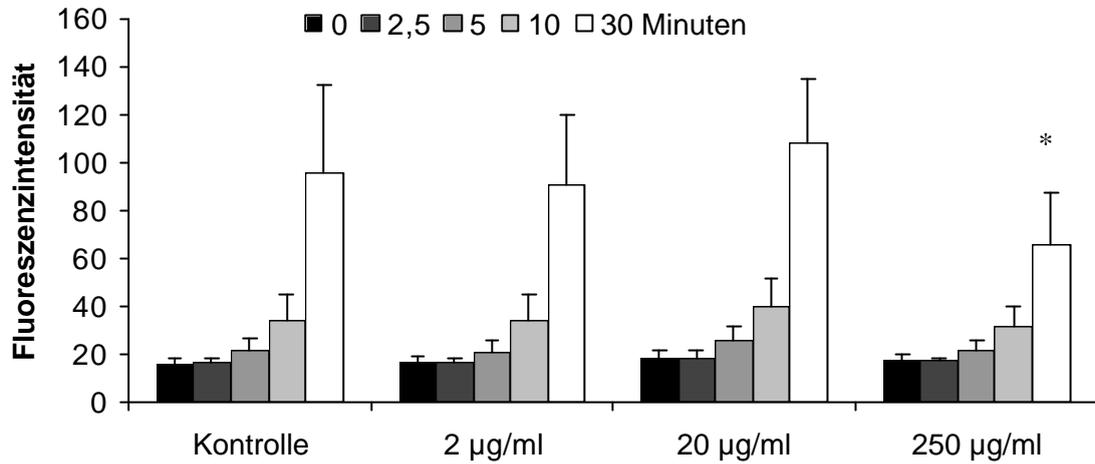


Abb. 15: Mittelwerte und Standardabweichungen des oxidative Burst der Monozyten nach Zugabe von Bupivacain in verschiedenen Konzentrationen. Eine signifikante Hemmung konnte nicht nachgewiesen werden.

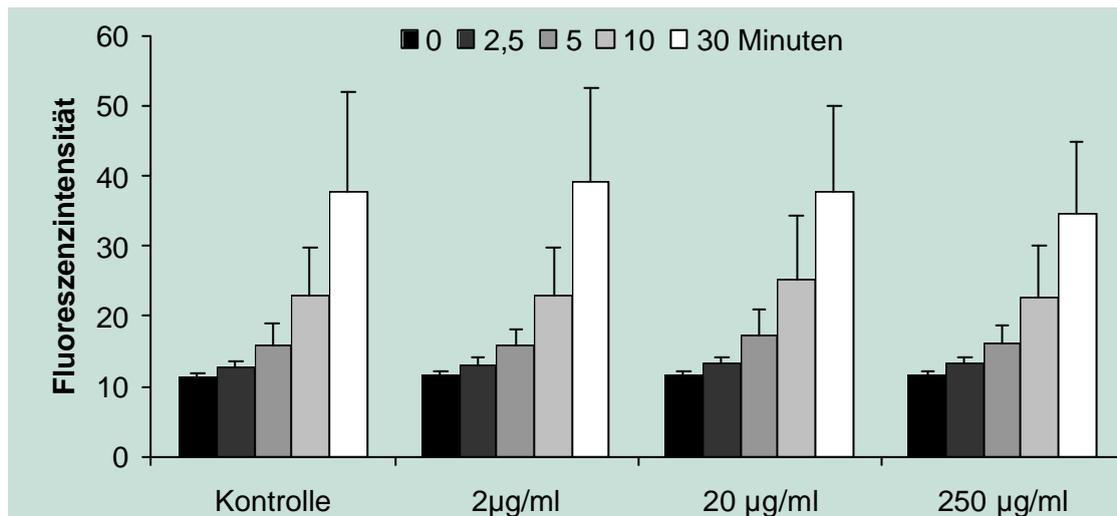


Abb. 16: Mittelwerte und Standardabweichungen der CD 11b Expression der Granulozyten nach Zugabe von Bupivacain in verschiedenen Konzentrationen.
 Signifikante Hemmung * ($p < 0,006$) bei 250 $\mu\text{g/ml}$ Bupivacain nach 10 und 30 Minuten.

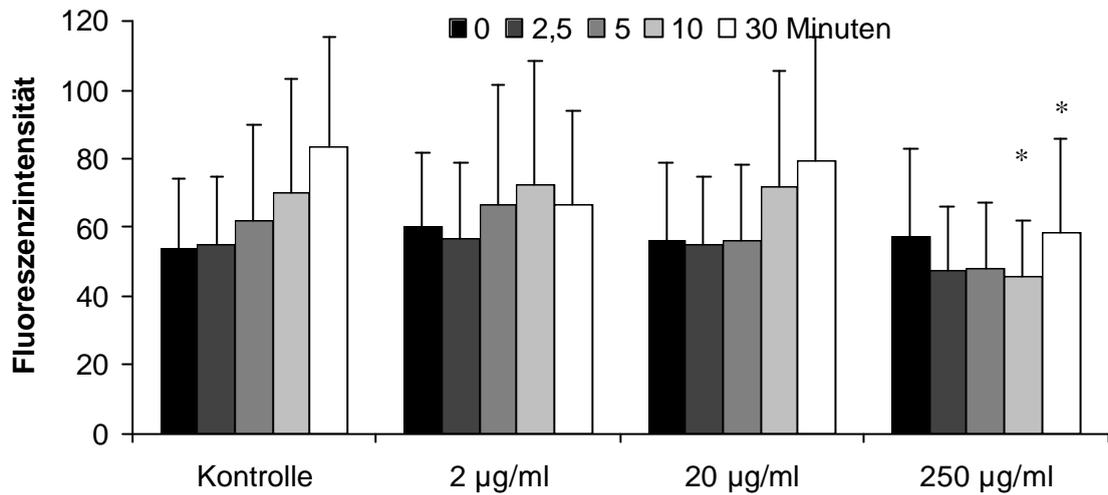
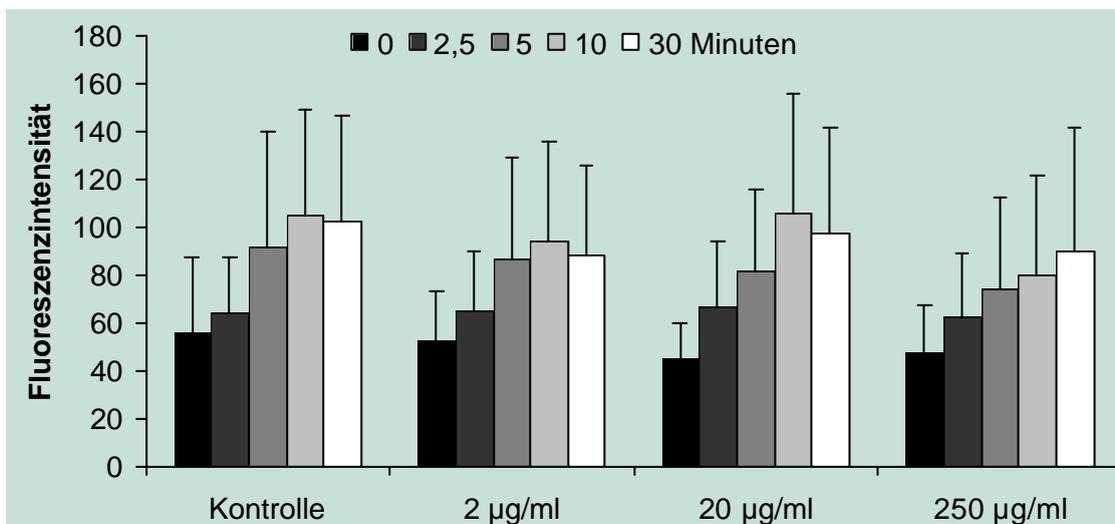


Abb. 17: Mittelwerte und Standardabweichungen der CD 11b Expression der Monozyten nach Zugabe von Bupivacain in verschiedenen Konzentrationen.
 Eine signifikante Hemmung konnte nicht nachgewiesen werden.



3.2.3 Ropivacain

In allen Konzentrationen von Ropivacain (2 µg/ml, 20 µg/ml und 250 µg/ml) konnten keine Effekte auf Phagozytose, oxidative Burst und CD 11b Expression der Granulozyten und Monozyten gezeigt werden.

Abb.18 : Mittelwerte und Standardabweichungen der Phagozytose der Granulozyten nach Zugabe von Ropivacain in verschiedenen Konzentrationen. Eine signifikante Hemmung konnte nicht nachgewiesen werden.

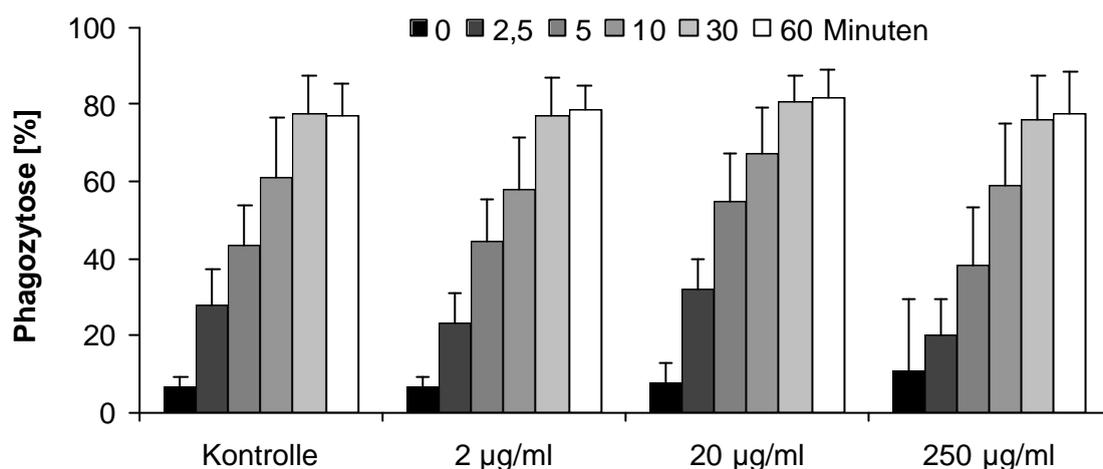


Abb.19 : Mittelwerte und Standardabweichungen der Phagozytose der Monozyten nach Zugabe von Ropivacain in verschiedenen Konzentrationen. Eine signifikante Hemmung konnte nicht nachgewiesen werden.

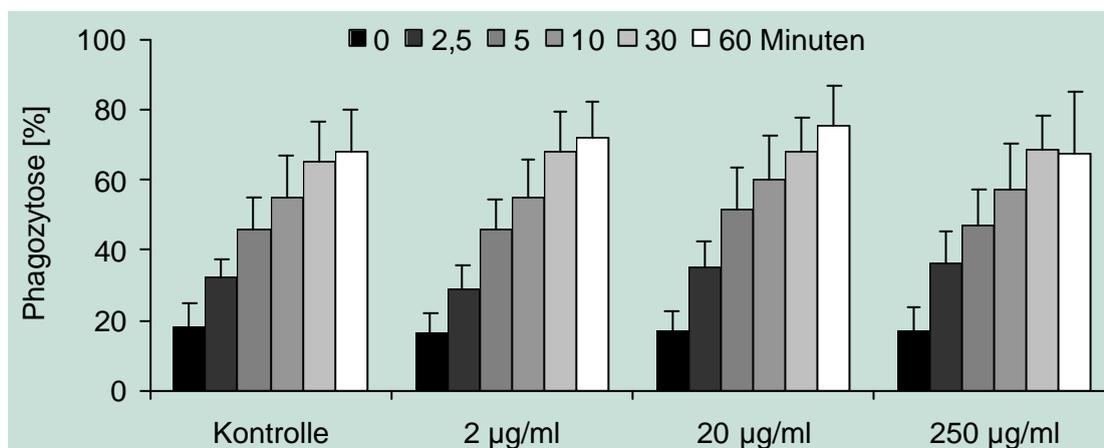


Abb. 20: Mittelwerte und Standardabweichungen des oxidative Burst der Granulozyten nach Zugabe von Ropivacain in verschiedenen Konzentrationen. Eine signifikante Hemmung konnte nicht nachgewiesen werden.

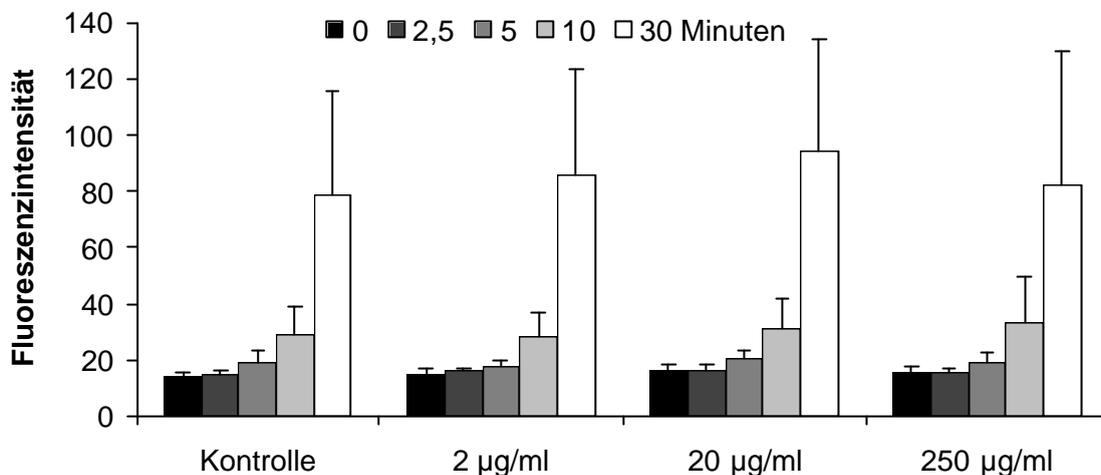


Abb. 21: Mittelwerte und Standardabweichungen des oxidative Burst der Monozyten nach Zugabe von Ropivacain in verschiedenen Konzentrationen. Eine signifikante Hemmung konnte nicht nachgewiesen werden.

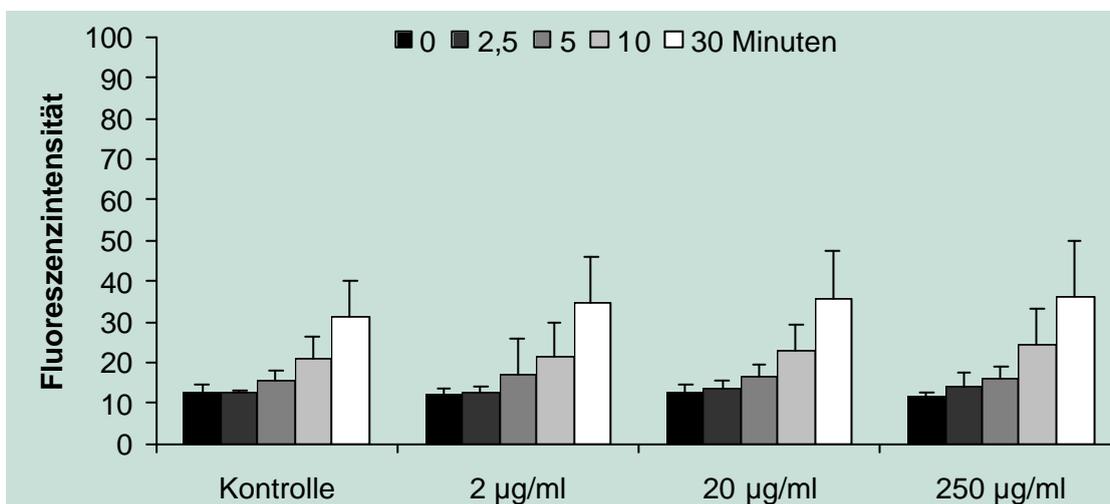


Abb. 22: Mittelwerte und Standardabweichungen der CD 11b Expression der Granulozyten nach Zugabe von Ropivacain in verschiedenen Konzentrationen.

Eine signifikante Hemmung konnte nicht nachgewiesen werden.

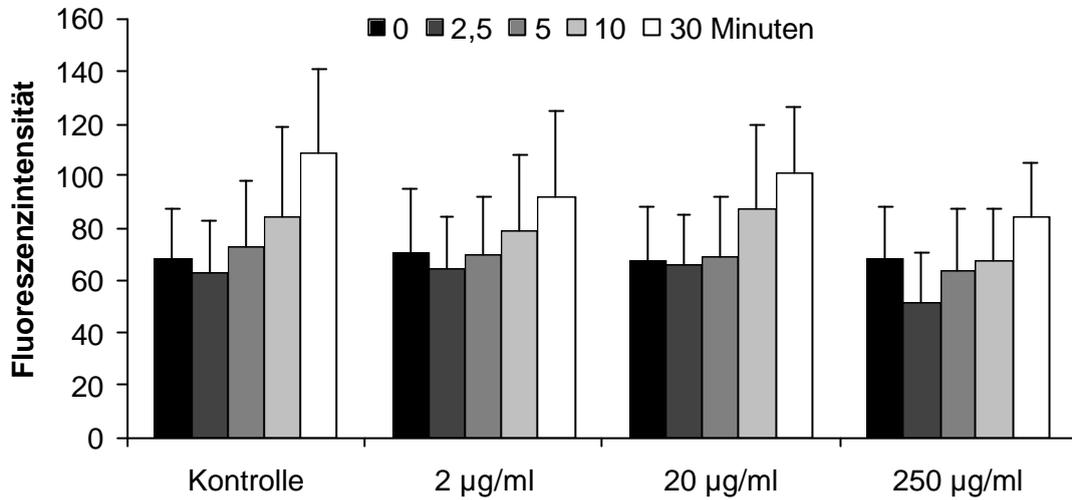
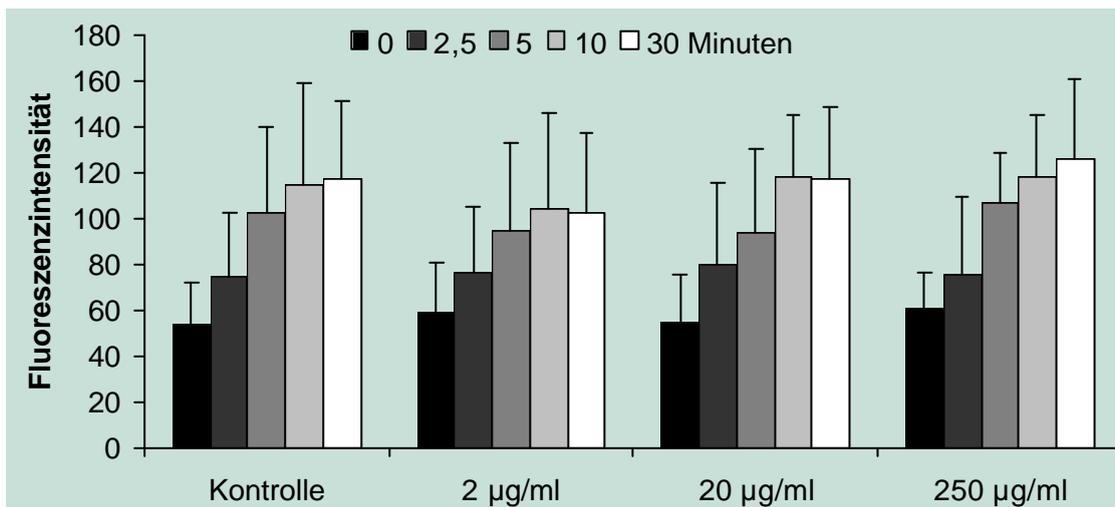


Abb. 23: Mittelwerte und Standardabweichungen der CD 11b Expression der Monozyten nach Zugabe von Ropivacain in verschiedenen Konzentrationen.

Eine signifikante Hemmung konnte nicht nachgewiesen werden.



4. Diskussion

Die Untersuchung der Phagozytose unter dem Einfluss von Anaesthetika begann vor mehr als hundert Jahren und hat damit bereits historische Bedeutung. Seit den ersten Arbeiten, die sich überwiegend auf klinische Beobachtungen stützten, wurde eine Vielzahl neuer immunologischer Methoden entwickelt, die eine Untersuchung einzelner Zellpopulationen in vitro ermöglichten.

4.1 Methodik

4.1.1 Verwendung von *S. aureus*

In dieser Untersuchung in vitro wurde als Erreger zur Leukozytenstimulation und Phagozytose *Staphylokokkus aureus* verwendet. *S.aureus* ist ein fakultativer Anaerobier, der zahlreiche Substanzen (Koagulase, Alphahämolyse, Leucocidin etc.) sezerniert, die es dem Erreger erleichtern in das Gewebe einzudringen. Das primäre Habitat von *S.aureus* stellen Haut und Schleimhäute dar. Die Häufigkeit von *S. aureus* bei Sepsis beträgt 20-40% und bei Wundinfektionen 30-90%.

S. aureus wird häufig als Erreger in Furunkeln, Karbunkeln, Wundinfekten, Sinusitiden und Mastitis puerperalis, wie auch bei Otitis/Osteomyelitis und der ulcerösen Endokarditis isoliert. Bei immungeschwächten Patienten kann er eine Pneumonie oder Sepsis hervorrufen.

Fremdkörper, wie zum Beispiel Katheter, Prothesen oder Shunt-Ventile können durch *S.aureus* kolonisiert werden. Die Besiedelung beginnt mit einer spezifischen Bindung der Erreger an wirtseigene Matrixproteine, wie Fibrinogen, Fibronectin oder Laminin, die rasch die Oberflächen von implantierten Fremdkörpern überziehen. In der Folge bildet sich ein Biofilm aus, von dem aus die Erreger gestreut werden können.

Da *S.aureus*, wie oben dargestellt, von besonders hoher klinischer Relevanz ist, wurde dieser gezielt für die vorliegende Arbeit ausgewählt. Gerade in der Regionalanästhesie, besonders der Langzeitanalgesie über Katheterverfahren, konnte bislang eine Begünstigung von Infektionen durch spezifische Wirkungen von Lokalanästhetika nicht ausgeschlossen werden. Die Entstehung eines

epiduralen Abszesses ist eine der gefürchtetsten Komplikationen rückenmarknaher Regionalanästhesien. Der am häufigsten isolierte Keim aus diesen Abszessen ist *S.aureus* (47). Im Gegensatz zu vielen anderen Keimen, wird *S.aureus* durch Lokalanästhetika in seinem Wachstum nicht gehemmt. Untersuchungen von Feldman et al., Parr et al., Sakuragi et al. zeigen einen dosisabhängigen antimikrobiellen Effekt auf verschiedenste Keime durch Lokalanästhetika. *P. aeruginosa*, *E. faecalis* und *E. coli* sind durch Zugabe von Lokalanästhetika in ihrem Wachstum zu hemmen. *S.aureus* wächst jedoch sogar im Beisein niedriger Lokalanästhetikakonzentrationen unvermindert weiter. In Verbindung mit einer möglichen Beeinträchtigung von Immunfunktionen wird das nahezu ungehemmte Wachstum von *S.aureus* als möglicher begünstigender Faktor für das Entstehen der epiduralen Abszesse diskutiert.

In bereits vorliegenden Untersuchungen wurden verschiedene Substanzen zur Stimulation von Phagozytose und oxidative Burst verwendet. Zur Phagozytose dienten v.a. Immunkomplexe, SOZ (serum-opsonized zymosan), Latexpartikel, hitzeinaktivierte Bakterien oder Hefen verwendet. Der oxidative Burst wurde häufig mit FMLP (formyl-methionin-leucyl-phenylalanine), PMA (phorbol myristate acetat), TNF- α (55) oder Arachidonsäure (56) provoziert.

Die Wahl der Stimuli und Phagozytosepartikel in einem Versuchsaufbau ist jedoch von entscheidender Bedeutung, da unterschiedliche Stimuli und Erreger zu einer Aktivierung unterschiedlicher Signaltransduktionswege in Leukozyten und damit zu verschiedenen Immunantworten führen können. Für opsonierte *S.aureus* ist beispielsweise CD11b der Hauptrezeptor über den sie von Leukozyten erkannt, gebunden und somit phagozytiert werden.

In dieser Studie wurde durch die Verwendung von lebenden, opsonierten *S.aureus* versucht, einer physiologischen Situation, soweit dies in einer Untersuchung in vitro möglich ist, Rechnung zu tragen.

4.1.2 Versuchsaufbau

In dieser Arbeit wurden Staphylokokken mit Calcein-AM gefärbt. Die Bakterien waren über den Untersuchungszeitraum konstant in Viabilität und Fluoreszenzintensität.

Die Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffs Calcein-AM bot in dieser Arbeit folgende Vorteile:

Die Fluoreszenz von Calcein-AM ist im Gegensatz zu FITC bei pH-Werten zwischen 5.5 und 10 stabil (42). Dadurch wird die Fluoreszenz der phagozytierten Bakterien nicht von den pH-Veränderungen, die durch die Phagozytose und Aufnahme in die Lysosomen entstehen, verändert (74).

Ein weiterer Vorteil von Calcein-AM ist, dass dieser Farbstoff nicht wie das FITC-Molekül an der Oberfläche der Zelle gebunden wird und dadurch nicht als Fremdmolekül von Leukozyten erkannt werden kann.

Die Verwendung lebender Bakterien bot den Vorteil, dass die Zahl der im Versuch eingesetzten Bakterien täglich durch Ausspateln ermittelt werden konnte. Durch ein gleichzeitiges Bestimmen der Leukozytenzahl und Verdünnen der Bakteriensuspension auf ein Endverhältnis von 1:5 konnte die Bakterienzahl in jedem Versuch angepasst und bestätigt werden.

Da die Leukozytenzahl interindividuellen und intraindividuellen Schwankungen unterliegt (14,58), kann eine fixe Bakterienkonzentration zu einer Ungenauigkeit der Messergebnisse und einer Fehlerquelle bei der Bestimmung der Phagozytose werden. In anderen Arbeiten wurde diesem Aspekt nur wenig Bedeutung zugemessen und eine konstante Menge an Bakterien oder Latex-Beads zugegeben (80). Bassoe stellte 1984 sogar eine Unabhängigkeit der Phagozytoseleistung der Granulozyten bei verschiedenen Bakterienkonzentrationen fest (7). Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen gegen diese Annahme, da in Vorversuchen zur Phagozytose mit unterschiedlichen Verhältnissen von Bakterien zu Leukozyten eine eindeutige Abhängigkeit des Anteils der phagozytierenden Leukozyten von der Bakterienkonzentration gezeigt werden konnte. Eine höhere Bakterienkonzentration führt zu einem höheren Anteil phagozytierender Leukozyten, bei dem auch die interindividuellen Schwankungen gemindert werden. Daher wurde ein Verhältnis von 5 Bakterien zu 1 Leukozyten in dieser Arbeit berücksichtigt und möglichst konstant gehalten.

4.1.2.1 Phagozytose

Die in dieser Arbeit verwendete Methode stellt eine einfache und schnelle Möglichkeit zur Differenzierung der Phagozytose von Granulozyten und

Monozyten dar. In mehreren Veröffentlichungen wurde bereits eine gute Korrelation der durchflusszytometrischen Bestimmung der Phagozytose mit der Fluoreszenzmikroskopie gezeigt (6,24,63). Weitere Arbeiten zeigten eine gut reproduzierbare Bestimmung der Phagozytose mit Hefen (9,62,88). Nachteil der bisherigen Bestimmungen war, dass eine Isolation der Leukozyten notwendig war (6,7,9,10,24,41,62,63,88). Diese Methode konnte oftmals eine Aktivierung der Leukozyten nicht verhindern, die sich in einem Anstieg der CD11b-Rezeptoren sowie einem Abscheren des L-Selektins auf der Oberfläche der Leukozyten zeigte (54).

In der vorliegenden Arbeit konnte die Phagozytose in einem Vollblutassay bestimmt werden. Dies ist im Gegensatz zur Leukozytenisolation ein schonendes und einfaches Verfahren. Bis zur Inkubation des Vollbluts mit den Bakterien und somit dem Beginn der Phagozytose kam es weder zu einer Zunahme der CD11b-Expression noch zu einer Abscherung von L-Selektin von der Leukozytenmembran.

Die Phagozytose der fluoreszenzmarkierten *S.aureus* wurde zu 6 verschiedenen Zeitpunkten über 60 Minuten bestimmt. Während bisher die Phagozytose häufig nur zu einem oder zwei Zeitpunkten bestimmt wurde (33), ermöglichte diese Methode eine genauere Bestimmung, in der eine Kinetik der Erregeraufnahme deutlich wurde. Fehlbestimmungen der Phagozytose ließen sich durch mehrere Messzeitpunkte besser ausschließen.

4.1.2.2 L-Selektin

Um nachzuweisen, dass es bedingt durch den Versuchsaufbau nicht zu einer Aktivierung der Granulozyten kommt, wurde einerseits die Expression von CD11b und andererseits die Expression von L-Selektin bis zu Beginn der Phagozytose untersucht. Während durch eine Aktivierung der Leukozyten eine vermehrte CD11b-Expression stattfindet, wird das L-Selektin abgeschert. In den Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Expression von CD11b bis zu Beginn der Phagozytose stabil bleibt und L-Selektin nicht abgeschert wird. Der Nachweis von L-Selektin auf den Leukozyten war jedoch nicht mehr möglich, sobald Bakterien zu den Leukozyten zugegebenen wurden und die Phagozytose begann.

4.1.2.3 oxidative Burst

Sobald Leukozyten in Kontakt mit Antigenen, z.B. Bakterien kommen und sie phagozytieren, werden sie aktiviert und beginnen reaktive Sauerstoffmetabolite freizusetzen, die zu einer Abtötung der phagozytierten Erreger beitragen (43). Neben diesem oxidativen Weg der Erregerabtötung verfügen sie außerdem noch über ein enzymatisches System, wie z.B. die Myeloperoxidase und lysosomale Enzyme (43,71,72).

Die Bestimmung der reaktiven Sauerstoffmetabolite kann mit unterschiedlichen Methoden durchgeführt werden. Bis jetzt wurden Assays verwendet, in denen Sauerstoffmetabolite über eine Redoxreaktion die Extinktion verschiedener Farbstoffe verändern (Nitroblautetrazolium) (29,49,50,51,60,84,85,86) oder eine Chemilumineszenzentwicklung (77) bewirken. Für die durchflußzytometrische Bestimmung wurde vor allem DCFH-DA zur Quantifizierung von Wasserstoffperoxid und Peroxidase verwendet (22,37). Ein sensitiverer Farbstoff als DCFH-DA war Dihydrorhodamin 123 (28,32,33). Dieser Farbstoff führte nicht zu einem Anstieg der Fluoreszenz der Lymphozyten und zeigte eine größere Fluoreszenzintensität, die eine genauere Messung des oxidative Burst ermöglichte (73). Ein neuerer Farbstoff, der bereits von Rothe und Peticarari (66,75) verwendet wurde, ist Dihydroethidiumbromid (auch als Hydroethidine oder Dihydroethidium bezeichnet). Nach der Diffusion in lebende Leukozyten wird dieser Farbstoff durch freigesetzte Sauerstoffradikale in fluoreszierendes Hydroethidium und Ethidiumbromid gespalten. Er wird nicht über die dismutaseabhängigen Sauerstoffprodukte, sondern direkt durch O_2^- oxidiert.

Daher wurde auch in dieser Arbeit der oxidative Burst mit Dihydroethidium bestimmt. Da das Emissionsspektrum von Hydroethidium von 550 bis 720 nm streut, wird die Fluoreszenz gleichzeitig in Kanal 2 und 3 des Durchflußzytometers detektiert. Somit steht für die Leukozytendifferenzierung mittels PE- oder PE Cy5- markierter Antikörper kein Kanal mehr zur Verfügung. Unter der Verwendung eines geringen Verhältnisses von 5 Bakterien zu 1 Leukozyten ist die Differenzierung der Leukozytenpopulationen über die Scattereigenschaften möglich, da durch die Phagozytose einer geringeren Bakterienzahl Größe und Granularität nur wenig verändert werden.

4.2 Untersuchte Anästhetika

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der Lokalanästhetika Lidocain, Bupivacain und Ropivacain auf die Immunfunktionen Phagozytose, oxidative Burst und CD11b-Expression untersucht. Die Phagozytose wurde im Hinblick auf den Anteil der aktiv phagozytierenden Granulozyten und Monozyten, sowie die semiquantitative Aufnahme der fluoreszierenden Bakterien ausgewertet.

4.2.1 Phagozytose

In der vorliegenden Untersuchung wurde die Phagozytose lebender *S. aureus* signifikant von Lidocain und Bupivacain gehemmt. Bupivacain hemmte den Anteil der phagozytierenden Granulozyten signifikant nach 10 und 30 Minuten Phagozytosedauer. Lidocain verursachte hingegen eine Hemmung des Anteils der phagozytierenden Granulozyten bei 30 und 60 Minuten. Die intrazelluläre Fluoreszenzintensität als semiquantitatives Maß für die Menge der intrazellulären Bakterien wurde lediglich durch Lidocain beeinträchtigt. Ropivacain zeigte keinen Einfluss auf den Anteil der phagozytierenden Granulozyten und die intrazelluläre Fluoreszenzintensität der Granulozyten. Bei den Monozyten wurde unabhängig vom Lokalanästhetikum keine signifikante Hemmung gefunden.

Für Lidocain konnte bereits in der Literatur eine Hemmung der Phagozytose von radioaktiv markierten *S.aureus*, hitzeimmobilisierten *E.coli* und Latexpartikeln gezeigt werden (2,16,20,31,56,79,83). Während die bisherigen Arbeiten diese Hemmung der Phagozytose lediglich in Modellen mit isolierten Leukozyten zeigen konnten, wurden die Ergebnisse in der vorliegenden Untersuchung in einem Vollblutmodell bestätigt. Zusätzlich konnte in dieser Untersuchung eine etwas schwächere Hemmung der Phagozytose für Bupivacain gezeigt werden. Im Gegensatz zur bislang vorliegenden Literatur konnte durch Auswertung der Phagozytose als Anteil der phagozytierenden Granulozyten und Monozyten und der intrazellulären Fluoreszenzintensität gezeigt werden, dass die Zahl der phagozytierenden Granulozyten sensibler auf eine Hemmung durch Lokalanästhetika reagiert als die quantitative Aufnahmefunktion. Dies könnte durch eine Hemmung der Aktivierung von Leukozyten bedingt sein. Während einige Leukozyten durch Lokalanästhetika in ihrer Aktivierung gehemmt werden, scheint für andere Leukozyten die starke

Stimulation durch die Bakterien auszureichen um eine Phagozytose anzuregen.

4.2.2 oxidative Burst

Wie auch für die Phagozytose konnte für den oxidative Burst eine Hemmung in der höchsten Konzentration von Lidocain und Bupivacain gezeigt werden. Nach 30 min. Inkubationszeit kam es bei beiden Substanzen zu einer signifikanten Verminderung des oxidative Burst. Ropivacain zeigte auch hier keinen Effekt in der höchsten Konzentration. Signifikanzen konnten nur bei Granulozyten gefunden werden.

Für Lidocain konnte eine Hemmung des oxidative Burst in anderen Studien belegt werden (20,31,38). Für Bupivacain und Ropivacain findet man in der Literatur unterschiedliche Ergebnisse. Im Gegensatz zu Sinclair findet Mikawa keine Einschränkung des oxidativen Burst durch Bupivacain. Für Ropivacain zeigt Cederholm keinen signifikanten Einfluss auf den oxidativen Burst, während Fischer eine Verminderung der Chemotaxis und Burstfunktion zeigen konnten.

Die Heterogenität dieser Ergebnisse ist weitgehend durch unterschiedliche Versuchsaufbauten bedingt. Hinzu kommen unterschiedliche Verfahren der Leukozytenstimulation und die Verwendung isolierter Leukozyten.

In Tierversuchen und ersten therapeutischen Anwendungen bei Patienten mit Colitis ulcerosa konnte mit Ropivacain bereits erste Erfolge erreicht werden. Durch mehrere rektale Applikationen von Ropivacain kam es zu einer Abnahme der Schleimhautentzündung und einer deutlichen Schmerzreduktion. Bei dieser Erkrankung handelt es sich um ein sterile Inflammationsgeschehen, bei der eine übersteigerte Reaktion der Leukozyten diskutiert wird. Die benefiziellen Effekte werden einer Reduktion der LTB₄-Freisetzung und einer Verminderung des oxidativen Burst zugeschrieben.

4.2.3 CD 11b-Expression

CD 11b ist der Hauptrezeptor auf der Oberfläche von Leukozyten, über den opsonierte *S. aureus* erkannt und gebunden werden. Mit der Aktivierung der Leukozyten durch die Bindung der Bakterien, kommt es zu einem steilen Anstieg der CD 11b Expression (30). In der Folge werden die gebundenen Bakterien inokuliert und dann enzymatisch durch den oxidativen Burst abgetötet.

In der vorliegenden Arbeit konnte der stärkste hemmende Effekt durch die Lokalanästhetika für die CD11b-Expression gezeigt werden. Lidocain und Bupivacain verursachten eine signifikante Verminderung der CD11b-Expression in der höchsten Konzentration. Für Ropivacain konnte dieser Effekt ebenfalls beobachtet werden, dieser Effekt war jedoch nicht signifikant. Monozyten zeigten erneut keine Signifikanzen.

Martinsson et al. fanden 1997 bei einer Lidocainkonzentration von 300 µmol/l eine signifikante Hemmung der CD11b-Expression. Ropivacain verursachte bei einer Konzentration von 100 µmol/l eine signifikante Hemmung. Dieser Effekt konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Dieser Unterschied ist am wahrscheinlichsten durch eine unterschiedliche Leukozytenstimulation bedingt. Martinsson aktivierte isolierte Leukozyten durch Zugabe von TNF alpha, während in der vorliegenden Arbeit zu Vollblut lebende Bakterien zugegeben wurden.

Der Mechanismus der verschiedenen Hemmungen von Immunfunktionen durch Lokalanästhetika zugrunde liegt, ist bislang weitgehend unklar. Verschiedene Erklärungsansätze sollen jedoch im Folgenden aufgeführt werden.

Als ein Ansatz für die Hemmung wird eine Blockade der transmembranen Ionenkanäle diskutiert, die erst bei hohen Lokalanästhetikakonzentrationen erreicht wird. Hierbei wird vor allem der Beteiligung von Kalium-, Wasserstoff- und Kalziumkanälen eine Bedeutung zugemessen (11,23,36).

Kalziumkanäle sind für viele intrazelluläre Funktionen von Bedeutung. Gleichzeitig ist Kalzium auch ein wichtiger intrazellulärer second messenger, der an einer G-Protein abhängigen Signaltransduktion elementar beteiligt ist. Da auch die Phagozytose von *S. aureus* über den CD11b-Rezeptor einer G-Protein abhängigen Regulation unterliegt, ist eine mögliche Veränderung dieser Ionenkanäle durch Lokalanästhetika denkbar. Wilsson et al. 1996 zeigten, dass es unter verringerten Kalziumkonzentrationen zu einer deutlichen Verminderung der Phagozytose kommt, die unter anderem durch eine mangelnde Degranulierung verursacht wird. Die Verschmelzung zwischen den Granulas und der Phagosomenmembran (39) ist stark von der intrazellulären Kalziumkonzentration abhängig. Außerdem konnte er zeigen, dass ausreichend Kalzium vorhanden sein muss, damit es zu einer Abtötung der phagozytierten

Erreger kommen kann (89).

In der letzten Zeit konnte außerdem gezeigt werden, dass Lokalanästhetika selbst auf verschiedenen Ebenen in intrazelluläre Signaltransduktionswege eingreifen. Eine verminderte Phosphorylierung der Proteinkinase C durch Lidocain konnte bestätigt werden (40,81).

Ein weiterer möglicher Ansatz der Hemmung wird in einer Veränderung der Zytokinausschüttung gesehen. Zytokine dienen der Kommunikation zwischen Zellen, regulieren verschiedenste Mechanismen der Inflammation, z.B. Diapedese von Leukozyten, Degranulation und oxidativer Burst. Sinclair et al. 1992 untersuchten den Einfluss von Lidocain und Bupivacain auf die Produktion der beiden Zytokine Leukotrien B4 und Interleukin 1. Sie stellten fest, daß 0,05% Lidocain und 0,125% Bupivacain eine beinahe komplette Hemmung der Bildung von Leukotrien B4 bewirken. Die Bildung von Interleukin 1 wurde ebenfalls durch die Lokalanästhetika vermindert, jedoch in Konzentrationen, die weit über der klinischen Anwendung.

Auch für Ropivacain wurde eine Hemmung der Bildung von Leukotrien B4 in hohen Konzentrationen, weit über der klinischen Dosierung gefunden (56).

Zusammenfassend lässt sich sagen, daß Lidocain und Bupivacain die untersuchten Immunfunktionen Phagozytose, oxidativen Burst und Expression von CD11b in der höchsten Konzentration hemmen. Ropivacain zeigt selbst in der höchsten Konzentration keine signifikanten Effekte auf die untersuchten Immunfunktionen. Die Unterschiede der Konzentrationen bei denen in anderen Arbeiten eine Hemmung der Immunfunktionen beobachtet wurden, sind vor allem auf unterschiedliche Stimulationsbedingungen und die vielfache Verwendung isolierter Leukozyten zurückzuführen. Für die zugrundeliegenden Mechanismen ist bislang noch keine eindeutige Ursache gefunden worden; es existieren lediglich verschiedene Erklärungsansätze.

4.3 Konzentrationen der Lokalanästhetika

Bei Betrachtung der zum Vergleich herangezogenen Studien und auch unserer Studie, spielt die Konzentration der Lokalanästhetika eine entscheidende Rolle. Die niedrigste Konzentration der drei Lokalanästhetika, die in dieser Arbeit verwendet wurden, richtete sich nach Lokalanästhetikaspiegeln, die im

Blutplasma nach erfolgreicher Regionalanästhesie gefunden wurden (13,17, 67). Darauf aufbauend wurde die 10-fache Dosierung dieser Spiegel als mittlere Lokalanästhetikakonzentration gewählt. Die höchste Konzentration wurde anhand der 100-fachen Konzentration von sehr hohen Plasmaspiegeln gewählt. Je nach therapeutischer Anwendung variierten die Plasmaspiegel von Lidocain zwischen 2 und 5 µg/ml. Nach der intravenösen Applikation von Lidocain zur Behandlung von Herzrhythmusstörungen liegt die Plasmakonzentration bei 3-5 µg/ml (78). Nach Periduralanästhesie mit 10 ml 2 % Lidocain wurden niedrigere Spiegel von 3-4 µg/ml gefunden. Die höchsten Plasmakonzentrationen von 5,1 µg/ml traten nach Blockade des Nervus obturatorius auf (38).

Nach epiduraler Infusion von Bupivacain 0,25% und Ropivacain 0,3% wurden Plasmaspiegel von 0,9 µg/ml für Bupivacain und 1,7 µg/ml für Ropivacain gefunden (25). Nach Blockade des Plexus brachialis in die Axilla traten bei Bupivacain maximale Plasmakonzentrationen von 1,75 µl/ml und bei Ropivacain 1,49 µl/ml auf (82). Zur Sectio caesarea wurden Bupivacainspiegel von 1,2 µg/ml und Ropivacainspiegel von 1,3 µg/ml gemessen (21). Bei der Interkostalblockade werden mit die höchsten Plasmaspiegel der applizierten Lokalanästhetika erreicht. Hier wurde bei sensorischer und motorischer Blockade der Interkostalregion für Bupivacain ein Plasmaspiegel von 1,1 µg/ml und für Ropivacain 1,5 µg/ml gemessen (48).

Die Konzentrationen der Lokalanästhetika, die zu einer Hemmung untersuchten Immunfunktionen Phagozytose, oxidativem Burst und CD 11b Expression führen, liegen etwa 100-fach über den Plasmakonzentrationen, die nach erfolgreicher Regionalanästhesie gefunden wurden. Allerdings sind in der Literatur kaum Daten über Gewebekonzentrationen von Lokalanästhetika zu finden. Nach der Applikation von 225 mg Bupivacain oder Ropivacain traten Plasmaspiegel von etwa 1,5 bis 1,8 µg/ml auf. Es muss daher angenommen werden, dass die Konzentrationen von Lokalanästhetika, die ins Gewebe appliziert werden, um ein vielfaches höher sind als die subsequent beobachteten Plasmaspiegel.

Außerdem werden Lokalanästhetika zur postoperativen Analgesie und chronischen Schmerztherapie mittels Katheterverfahren über Tage bis Wochen appliziert. Ergebnisse aus Studien in vitro deuten auf eine Empfindlichkeitssteigerung von Leukozyten mit steigender Inkubationsdauer an.

Es kann daher spekuliert werden, dass auch niedrigere Konzentrationen von Lokalanästhetika nach längerer Applikation zu einer Hemmung von Immunfunktionen führen können.

5. Zusammenfassung

Der Nachweis, dass Lokalanästhetika unterschiedlichste Immunfunktionen beeinflussen, ist in Studien in vitro mehrfach dokumentiert. In klinischen Studien konnte eine Veränderung von Immunfunktionen jedoch nicht eindeutig auf ein einzelnes Anästhetikum zurückgeführt werden. Eine Verzögerung der Wundheilung durch Lokalanästhetika und ein möglicher Beitrag von Lokalanästhetika zur Bildung epiduraler Abszesse wird zwar diskutiert, konnte jedoch klinisch bislang nicht eindeutig belegt werden.

Problematisch an klinischen Studien ist einerseits, dass sie aufgrund von vielen Cofaktoren, die das Immunsystem ebenfalls beeinflussen, z.B. ein operatives Trauma oder eine Beeinflussung durch die zugrundeliegende Erkrankung, nur schwer durchzuführen sind. Einige Ergebnisse zur Infektionsrate bei Patienten mit Periduralkathetern zur chronischen Schmerztherapie zeigten jedoch, dass die Infektionsrate bei immungeschwächten Patienten, Patienten mit Diabetes mellitus, Tumorerkrankungen oder antiinflammatorischer medikamentöser Therapie ein 10-fach erhöhtes Infektionsrisiko im Vergleich zur Kontrollgruppe aufwies. Gerade bei diesen Patienten könnte eine potentielle weitere Beeinträchtigung des Immunsystems durch Lokalanästhetika zu einer Begünstigung von Infektionen beitragen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen eine Beeinträchtigung wesentlicher Mechanismen der Immunabwehr von *S.aureus*. Die Hemmung von Phagozytose, oxidativem Burst und CD11b-Expression durch Lidocain und Bupivacain zeigte sich jedoch erst in Konzentrationen weit über klinisch gefundenen Plasmaspiegeln. Die Phagozytose wurde durch die höchste Lidocainkonzentration (500 µg/ml) und Bupivacainkonzentration (250 µg/ml), nicht aber durch Ropivacain (250 µg/ml) signifikant gehemmt. Der deutlichste Effekt war für Lidocain zu beobachten. Der oxidative Burst wurde durch die höchste Lidocain- und Bupivacainkonzentration vermindert. Im Vergleich zur Kontrolle war die CD11b-Expression ebenso durch Lidocain und Bupivacain in ihrer höchsten Konzentration signifikant verringert. Ropivacain zeigte den geringsten Einfluss auf die untersuchten Immunfunktionen. Da bislang jedoch keine Daten zu Konzentrationen von Lokalanästhetika im Gewebe vorliegen, ist

ein Vergleich hemmender Effekte nur schwer zu ziehen und eine definitive Beeinflussung der Leukozytenfunktion kann nur vermutet werden.

Weitere Untersuchungen müssen die Mechanismen klären, durch die es zu einer Beeinträchtigung der Immunfunktionen durch Lokalanästhetika kommt. Zudem müssen weitere tierexperimentelle und klinische Studien Gewebekonzentrationen von Lokalanästhetika nach erfolgreichen regionalen Blockaden klären und infektiöse Komplikationen nach Regionalanästhesie genauer untersuchen.

6. Anhang

6.1 Tabellarische Zusammenstellung der Daten

6.1.1 Lidocain

6.1.1.1 Lidocain - Phagozytose

Granulozyten

Tab.11 : Mittelwerte und Standardabweichungen [%] der Phagozytose der Granulozyten nach Zugabe von Lidocain in verschiedenen Konzentrationen. Signifikante Hemmung * ($p < 0,002$) bei 500 µg/ml Lidocain nach 30 und 60 Minuten.

Zeitdauer [min.]	Mittelwerte ± SD [%] bei 0 µg	Mittelwerte ± SD [%] bei 2,5 µg	Mittelwerte ± SD [%] bei 25 µg	Mittelwerte ± SD [%] bei 500 µg
0	2,64 ± 1,75	2,66 ± 1,45	2,33 ± 1,24	1,35 ± 1,00
2,5	20,01 ± 8,43	16,15 ± 7,89	20,95 ± 11,57	11,69 ± 8,58
5	38,32 ± 16,36	36,62 ± 15,43	39,16 ± 16,50	24,98 ± 16,00
10	52,29 ± 18,84	50,77 ± 18,92	53,93 ± 21,54	38,23 ± 21,03
30	64,95 ± 16,95	63,72 ± 16,26	65,50 ± 19,00	<u>46,15 ± 23,68</u> *
60	69,31 ± 13,38	69,23 ± 8,27	64,52 ± 12,95	<u>49,14 ± 20,56</u> *

Monozyten

Tab.12 : Mittelwerte und Standardabweichungen [%] der Phagozytose der Monozyten nach Zugabe von Lidocain in verschiedenen Konzentrationen. Signifikante Hemmungen konnten nicht nachgewiesen werden.

Zeitdauer [min.]	Mittelwerte ± SD [%] bei 0 µg	Mittelwerte ± SD [%] bei 2,5 µg	Mittelwerte ± SD [%] bei 25 µg	Mittelwerte ± SD [%] bei 500 µg
0	2,53 ± 1,45	2,0 ± 1,09	2,39 ± 1,19	1,61 ± 0,94
2,5	14,51 ± 6,75	11,02 ± 6,3	15,88 ± 9,52	13,08 ± 9,45
5	27,01 ± 13,38	25,50 ± 11,44	27,8 ± 14,23	22,9 ± 13,98
10	38,59 ± 15,39	37,71 ± 15,02	41,0 ± 19,58	30,65 ± 17,73
30	49,26 ± 18,15	48,76 ± 18,91	48,16 ± 21,35	37,91 ± 21,03
60	52,85 ± 17,95	51,88 ± 14,09	50,21 ± 18,14	46,18 ± 20,51

6.1.1.2 Lidocain - oxidative Burst

Granulozyten

Tab.13 : Mittelwerte und Standardabweichungen des oxidative Burst der Granulozyten nach Zugabe von Lidocain in verschiedenen Konzentrationen.
Signifikante Hemmung * ($p < 0,0001$) bei 500 µg/ml Lidocain nach 30 Minuten.

Zeitdauer [min.]	Mittelwerte ± SD [Fluo.int.] bei 0 µg	Mittelwerte ± SD [Fluo.int.] bei 2,5 µg	Mittelwerte ± SD [Fluo.int.] bei 25 µg	Mittelwerte ± SD [Fluo.int.] bei 500 µg
0	16,42 ± 3,88	16,52 ± 2,15	16,71 ± 2,41	13,58 ± 2,22
2,5	15,94 ± 1,61	16,05 ± 1,95	16,71 ± 2,09	14,92 ± 3,17
5	19,04 ± 2,49	19,18 ± 2,78	20,37 ± 2,62	17,55 ± 3,81
10	29,66 ± 4,6	28,25 ± 3,81	31,88 ± 5,54	24,66 ± 6,73
30	72,93 ± 20,32	73,92 ± 20,74	82,76 ± 24,25	<u>44,14 ± 20,63</u> *

Monozyten

Tab.14 : Mittelwerte und Standardabweichungen des oxidative Burst der Monozyten nach Zugabe von Lidocain in verschiedenen Konzentrationen.

Zeitdauer [min.]	Mittelwerte ± SD [Fluo.int.] bei 0 µg	Mittelwerte ± SD [Fluo.int.] bei 2,5 µg	Mittelwerte ± SD [Fluo.int.] bei 25 µg	Mittelwerte ± SD [Fluo.int.] bei 500 µg
0	11,56 ± 0,7	11,27 ± 0,7	11,9 ± 0,95	10,7 ± 3,13
2,5	12,77 ± 1,38	13,15 ± 1,38	13,4 ± 1,34	13,9 ± 2,2
5	15,34 ± 2,16	15,48 ± 2,16	16,45 ± 2,77	16,68 ± 2,11
10	22,13 ± 4,87	21,48 ± 4,87	23,31 ± 6,3	23,49 ± 5,96
30	35,93 ± 11,81	33,99 ± 11,81	35,99 ± 14,06	33,34 ± 12,53

6.1.1.3 Lidocain - CD 11b Expression

Granulozyten

Tab. 15: Mittelwerte und Standardabweichungen der CD 11b Expression der Granulozyten nach Zugabe von Lidocain in verschiedenen Konzentrationen. Signifikante Hemmung * ($p < 0,006$) bei 500 µg/ml Lidocain nach 10 und 30 Minuten.

Zeitdauer [min.]	Mittelwerte ± SD [Fluo.int.] bei 0 µg	Mittelwerte ± SD [Fluo.int.] bei 2,5 µg	Mittelwerte ± SD [Fluo.int.] bei 25 µg	Mittelwerte ± SD [Fluo.int.] bei 500 µg
0	82,32 ± 20,53	82,29 ± 20,95	75,59 ± 15,57	54,25 ± 14,82
2,5	74,41 ± 14,85	84,3 ± 28,28	73,77 ± 14,04	48,21 ± 10,06
5	80,17 ± 18,16	77,77 ± 19,65	75,86 ± 18,25	42,87 ± 12,66
10	103,36 ± 28,92	96,5 ± 27,39	96,09 ± 30,51	<u>51,47 ± 15,89 *</u>
30	137,12 ± 30,9	129,16 ± 22,91	126,16 ± 46,27	<u>70,98 ± 24,07 *</u>

Monozyten

Tab. 16: Mittelwerte und Standardabweichungen der CD 11b Expression der Monozyten nach Zugabe von Lidocain in verschiedenen Konzentrationen. Signifikante Hemmungen konnten nicht nachgewiesen werden.

Zeitdauer [min.]	Mittelwerte ± SD [Fluo.int.] bei 0 µg	Mittelwerte ± SD [Fluo.int.] bei 2,5 µg	Mittelwerte ± SD [Fluo.int.] bei 25 µg	Mittelwerte ± SD [Fluo.int.] bei 500 µg
0	64,7 ± 15,54	67,85 ± 17,0	67,45 ± 12,04	66,77 ± 26,19
2,5	88,53 ± 22,18	95,48 ± 27,14	97,82 ± 25,61	77,98 ± 35,5
5	113,85 ± 33,34	114,88 ± 38,32	116,92 ± 34,34	100,71 ± 30,07
10	154,94 ± 56,54	142,63 ± 53,26	140,0 ± 39,21	115,53 ± 42,42
30	155,69 ± 37,83	151,14 ± 35,29	149,61 ± 38,43	126,62 ± 39,93

6.1.2 Bupivacain

6.1.2.1 Bupivacain - Phagozytose

Granulozyten

Tab.17: Mittelwerte und Standardabweichungen [%] der Phagozytose der Granulozyten nach Zugabe von Bupivacain in verschiedenen Konzentrationen.

Signifikante Hemmung * ($p < 0,002$) bei 250 µg/ml nach 10 und 30 Minuten.

Zeitdauer [min.]	Mittelwerte ± SD [%] bei 0 µg	Mittelwerte ± SD [%] bei 2 µg	Mittelwerte ± SD [%] bei 20 µg	Mittelwerte ± SD [%] bei 250 µg
0	3,59 ± 1,91	3,36 ± 1,36	3,49 ± 1,54	3,53 ± 1,65
2,5	22,74 ± 8,88	15,26 ± 9,33	22,32 ± 9,57	17,15 ± 7,14
5	41,28 ± 14,5	38,07 ± 17,24	43,06 ± 14,88	34,53 ± 13,96
10	60,17 ± 15,8	57,74 ± 19,58	59,58 ± 17,22	<u>48,09 ± 15,22</u> *
30	72,29 ± 15,06	70,17 ± 17,53	72,12 ± 14,12	<u>61,23 ± 15,47</u> *
60	74,81 ± 9,99	76,03 ± 9,19	76,16 ± 10,53	67,41 ± 13,57

Monozyten

Tab.18: Mittelwerte und Standardabweichungen [%] der Phagozytose der Monozyten nach Zugabe von Bupivacain in verschiedenen Konzentrationen.

Signifikante Hemmungen konnten nicht nachgewiesen werden.

Zeitdauer [min.]	Mittelwerte ± SD [%] bei 0 µg	Mittelwerte ± SD [%] bei 2 µg	Mittelwerte ± SD [%] bei 20 µg	Mittelwerte ± SD [%] bei 250 µg
0	7,65 ± 3,97	6,88 ± 3,47	6,52 ± 2,61	5,12 ± 1,76
2,5	21,93 ± 5,67	16,84 ± 6,59	22,99 ± 8,55	23,23 ± 8,16
5	34,78 ± 10,68	34,59 ± 12,88	39,02 ± 11,59	39,0 ± 14,26
10	49,57 ± 13,14	47,26 ± 16,11	48,26 ± 15,78	43,76 ± 12,825
30	59,95 ± 13,39	57,46 ± 14,16	58,22 ± 13,88	57,72 ± 12,69
60	64,73 ± 11,75	61,64 ± 15,67	66,34 ± 12,67	66,24 ± 11,74

6.1.2.2 Bupivacain - oxidative Burst

Granulozyten

Tab.19 : Mittelwerte und Standardabweichungen des oxidative Burst der Granulozyten nach Zugabe von Bupivacain in verschiedenen Konzentrationen.
Signifikante Hemmung * ($p < 0,0001$) bei 250 µg/ml Bupivacain nach 30 Minuten.

Zeitdauer [min.]	Mittelwerte ± SD [Fluo.int.] bei 0 µg	Mittelwerte ± SD [Fluo.int.] bei 2 µg	Mittelwerte ± SD [Fluo.int.] bei 20 µg	Mittelwerte ± SD [Fluo.int.] bei 250 µg
0	15,57 ± 2,44	16,35 ± 2,49	18,28 ± 3,22	16,99 ± 2,48
2,5	16,12 ± 1,42	16,12 ± 1,59	18,34 ± 2,8	16,77 ± 1,54
5	21,27 ± 5,35	20,89 ± 4,34	25,39 ± 5,67	21,51 ± 3,72
10	33,66 ± 11,11	33,64 ± 10,69	40,09 ± 11,04	31,27 ± 8,7
30	95,6 ± 37,12	90,33 ± 29,71	108,01 ± 27,21	<u>65,86 ± 21,78 *</u>

Monozyten

Tab.20 : Mittelwerte und Standardabweichungen des oxidative Burst der Monozyten nach Zugabe von Bupivacain in verschiedenen Konzentrationen.
 Signifikante Hemmungen konnten nicht nachgewiesen werden.

Zeitdauer [min.]	Mittelwerte ± SD [Fluo.int.] bei 0 µg	Mittelwerte ± SD [Fluo.int.] bei 2 µg	Mittelwerte ± SD [Fluo.int.] bei 20 µg	Mittelwerte ± SD [Fluo.int.] bei 250 µg
0	11,34 ± 0,55	11,56 ± 0,6	11,56 ± 0,62	11,58 ± 0,6
2,5	12,69 ± 0,96	12,93 ± 1,17	13,29 ± 0,85	13,25 ± 0,9
5	15,69 ± 3,25	15,76 ± 2,39	17,37 ± 3,57	16,21 ± 2,49
10	23,03 ± 6,69	22,92 ± 6,99	25,3 ± 9,18	22,66 ± 7,43
30	37,85 ± 14,07	39,13 ± 13,43	37,79 ± 12,08	34,55 ± 10,31

6.1.2.3 Bupivacain - CD 11b

Granulozyten

Tab. 21: Mittelwerte und Standardabweichungen der CD 11b Expression der Granulozyten nach Zugabe von Bupivacain in verschiedenen Konzentrationen.

Signifikante Hemmung * ($p < 0.006$) bei 250 μg Bupivacain nach 10 und 30 Minuten.

Zeitdauer [min.]	Mittelwerte \pm SD [Fluo.int.] bei 0 μg	Mittelwerte \pm SD [Fluo.int.] bei 2 μg	Mittelwerte \pm SD [Fluo.int.] bei 20 μg	Mittelwerte \pm SD [Fluo.int.] bei 250 μg
0	53,61 \pm 20,52	60,43 \pm 21,13	55,94 \pm 23,07	57,43 \pm 25,57
2,5	54,76 \pm 20,11	56,89 \pm 21,77	54,8 \pm 20,12	47,51 \pm 18,49
5	61,75 \pm 28,08	66,43 \pm 35,14	56,32 \pm 21,63	47,85 \pm 19,37
10	70,14 \pm 32,71	72,48 \pm 35,84	71,57 \pm 33,8	<u>45,7 \pm 16,43</u> *
30	83,27 \pm 32,32	66,49 \pm 27,42	79,59 \pm 35,95	<u>58,66 \pm 26,89</u> *

Monozyten

Tab. 22: Mittelwerte und Standardabweichungen der CD 11b Expression der Monozyten nach Zugabe von Bupivacain in verschiedenen Konzentrationen. Signifikante Hemmungen konnten nicht nachgewiesen werden.

Zeitdauer [min.]	Mittelwerte \pm SD [Fluo.int.] bei 0 μg	Mittelwerte \pm SD [Fluo.int.] bei 2 μg	Mittelwerte \pm SD [Fluo.int.] bei 20 μg	Mittelwerte \pm SD [Fluo.int.] bei 250 μg
0	55,85 \pm 31,74	51,82 \pm 21,82	44,27 \pm 15,62	47,48 \pm 20,1
2,5	64,02 \pm 23,36	66,45 \pm 25,39	66,87 \pm 26,74	62,14 \pm 26,69
5	91,86 \pm 47,73	86,25 \pm 42,48	81,18 \pm 34,99	74,26 \pm 38,21
10	104,99 \pm 44,41	93,55 \pm 42,38	105,37 \pm 50,57	79,92 \pm 41,57
30	102,52 \pm 44,42	88,57 \pm 37,3	97,11 \pm 44,12	90,05 \pm 51,12

6.1.3 Ropivacain

6.1.3.1 Ropivacain - Phagozytose

Granulozyten

Tab.23: Mittelwerte und Standardabweichungen [%] der Phagozytose der Granulozyten nach Zugabe von Ropivacain in verschiedenen Konzentrationen.

Signifikante Hemmungen konnten nicht nachgewiesen werden.

Zeitdauer [min.]	Mittelwerte ± SD [%] bei 0 µg	Mittelwerte ± SD [%] bei 2 µg	Mittelwerte ± SD [%] bei 20 µg	Mittelwerte ± SD [%] bei 250 µg
0	6,49 ± 2,59	6,39 ± 2,92	7,52 ± 5,29	10,83 ± 8,47
2,5	27,71 ± 9,48	22,9 ± 8,29	31,97 ± 7,69	19,95 ± 9,59
5	43,63 ± 10,02	44,28 ± 11,31	54,53 ± 12,47	38,22 ± 15,21
10	61,16 ± 15,29	57,85 ± 13,28	66,98 ± 12,41	58,68 ± 16,29
30	77,54 ± 10,16	77,19 ± 9,89	81,09 ± 6,63	75,81 ± 11,68
60	77,03 ± 8,73	78,76 ± 6,21	81,77 ± 7,16	77,81 ± 10,51

Monozyten

Tab.24: Mittelwerte und Standardabweichungen [%] der Phagozytose der Monozyten nach Zugabe von Ropivacain in verschiedenen Konzentrationen.

Signifikante Hemmungen konnten nicht nachgewiesen werden.

Zeitdauer [min.]	Mittelwerte ± SD [%] bei 0 µg	Mittelwerte ± SD [%] bei 2 µg	Mittelwerte ± SD [%] bei 20 µg	Mittelwerte ± SD [%] bei 250 µg
0	17,81 ± 7,09	16,42 ± 5,42	16,94 ± 5,68	17,11 ± 6,32
2,5	32,09 ± 5,0	28,71 ± 6,79	35,23 ± 7,41	36,15 ± 8,96
5	45,96 ± 9,37	45,97 ± 8,13	51,5 ± 12,27	46,98 ± 10,3
10	55,1 ± 12,03	54,99 ± 11,08	59,95 ± 12,53	57,07 ± 13,41
30	65,23 ± 11,35	67,84 ± 11,66	68,43 ± 9,46	68,74 ± 9,8
60	68,03 ± 12,17	71,95 ± 10,34	75,48 ± 11,69	67,47 ± 17,78

6.1.3.2 Ropivacain - oxidative Burst

Granulozyten

Tab.25 : Mittelwerte und Standardabweichungen des oxidative Burst der Granulozyten nach Zugabe von Ropivacain in verschiedenen Konzentrationen.
Signifikante Hemmungen konnten nicht nachgewiesen werden.

Zeitdauer [min.]	Mittelwerte \pm SD [Fluo.int.] bei 0 μ g	Mittelwerte \pm SD [Fluo.int.] bei 2 μ g	Mittelwerte \pm SD [Fluo.int.] bei 20 μ g	Mittelwerte \pm SD [Fluo.int.] bei 250 μ g
0	14,13 \pm 1,6	14,9 \pm 2,21	15,82 \pm 2,2	15,29 \pm 2,15
2,5	15,04 \pm 0,79	15,8 \pm 1,25	16,01 \pm 1,91	15,55 \pm 1,31
5	19,4 \pm 3,71	17,63 \pm 2,05	20,19 \pm 3,52	18,92 \pm 3,39
10	29,15 \pm 9,88	27,85 \pm 8,82	31,47 \pm 10,25	33,31 \pm 15,92
30	79,1 \pm 36,7	86,06 \pm 37,4	94,51 \pm 39,48	82,81 \pm 47,76

Monozyten

Tab.26 :Mittelwerte und Standardabweichungen des oxidative Burst der Monozyten nach Zugabe von Ropivacain in verschiedenen Konzentrationen.
Signifikante Hemmungen konnten nicht nachgewiesen werden.

Zeitdauer [min.]	Mittelwerte \pm SD [Fluo.int.] bei 0 μ g	Mittelwerte \pm SD [Fluo.int.] bei 2 μ g	Mittelwerte \pm SD [Fluo.int.] bei 20 μ g	Mittelwerte \pm SD [Fluo.int.] bei 250 μ g
0	12,83 \pm 1,62	12,4 \pm 1,23	12,56 \pm 2,01	11,72 \pm 1,03
2,5	12,51 \pm 0,81	12,86 \pm 1,32	13,43 \pm 1,93	14,06 \pm 3,71
5	15,64 \pm 2,39	16,99 \pm 8,94	16,68 \pm 2,94	16,04 \pm 2,77
10	20,85 \pm 5,6	21,64 \pm 8,16	23,06 \pm 6,16	24,24 \pm 9,05
30	31,27 \pm 8,78	34,8 \pm 10,92	35,94 \pm 11,64	26,16 \pm 13,64

6.1.3.3 Ropivacain - CD 11b

Granulozyten

Tab. 27: Mittelwerte und Standardabweichungen der CD 11b Expression der Granulozyten nach Zugabe von Ropivacain in verschiedenen Konzentrationen.

Signifikante Hemmungen konnten nicht nachgewiesen werden.

Zeitdauer [min.]	Mittelwerte \pm SD [Fluo.int.] bei 0 μ g	Mittelwerte \pm SD [Fluo.int.] bei 2 μ g	Mittelwerte \pm SD [Fluo.int.] bei 20 μ g	Mittelwerte \pm SD [Fluo.int.] bei 250 μ g
0	68,65 \pm 19,05	71,02 \pm 24,13	67,37 \pm 21,26	68,38 \pm 20,03
2,5	63,08 \pm 19,93	64,77 \pm 19,73	66,29 \pm 18,86	51,7 \pm 18,79
5	73,21 \pm 25,18	69,79 \pm 22,38	69,01 \pm 22,93	63,87 \pm 23,63
10	84,75 \pm 33,93	78,79 \pm 29,58	87,92 \pm 31,32	67,25 \pm 19,89
30	108,82 \pm 32,16	91,92 \pm 32,69	100,96 \pm 25,84	84,49 \pm 20,74

Monozyten

Tab. 28: Mittelwerte und Standardabweichungen der CD 11b Expression der Monozyten nach Zugabe von Ropivacain in verschiedenen Konzentrationen. Signifikante Hemmungen konnten nicht nachgewiesen werden.

Zeitdauer [min.]	Mittelwerte \pm SD [Fluo.int.] bei 0 μ g	Mittelwerte \pm SD [Fluo.int.] bei 2 μ g	Mittelwerte \pm SD [Fluo.int.] bei 20 μ g	Mittelwerte \pm SD [Fluo.int.] bei 250 μ g
0	53,69 \pm 18,58	59,09 \pm 21,72	54,5 \pm 20,73	60,5 \pm 15,91
2,5	74,73 \pm 28,04	75,94 \pm 28,94	79,94 \pm 35,83	75,27 \pm 34,48
5	102,64 \pm 36,99	94,6 \pm 38,36	93,31 \pm 36,78	106,48 \pm 22,22
10	115,21 \pm 44,29	103,98 \pm 41,9	118,47 \pm 26,68	117,93 \pm 27,65
30	117,31 \pm 33,91	102,7 \pm 34,39	117,63 \pm 30,68	126,18 \pm 34,77

6.2 Literaturverzeichnis

1. Arlander E., Ost A., Stahlberg D., Lofberg R., (1996), Ropivacaine gel in active distal ulcerative colitis and proctitis
Aliment Pharmacol Ther,10:73-81
2. Azuma Y., Shinohara M., Wang P., Suese Y., Yasuda H., Ohura K., (2000), Comparison of local anesthetics on immune functions of neutrophils
Int J Immunopharmacol, 22: 789-796
3. AstraZeneca (2000), Gebrauchsinformation und Fachinformation „Xylocain 1%“, Fachinfo-Service der pharmazeutischen Industrie, Postfach 1255, 88322 Aulendorf
4. AstraZeneca (2001), Gebrauchsinformation und Fachinformation „Carbostesin 0,5%“, Fachinfo-Service der pharmazeutischen Industrie, Postfach 1255, 88322 Aulendorf
5. AstraZeneca (2002), Gebrauchsinformation und Fachinformation „Naropin“, Fachinfo-Service der pharmazeutischen Industrie, Postfach 1255, 88322 Aulendorf
6. Basso, C.F., Bjerknes, R. (1985) Phagocytosis by human leukocytes, phagosomal pH and degradation of seven species of bacteria measured by flow cytometry
J Med Microbiol 19: 115-125
7. Basso, C.F., Solberg, C.O. (1984), Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by human leukocytes: quantitation by a flow cytometric and a microbiological method
Acta Path Microbiol Immunol Scand Sect. 92: 43-50
8. Bazil V., Strominger J.L., (1991), Shedding as a mechanism of down-modulation of CD 14 of stimulated human monocytes
The Journal of Immunology, 147, 5: 1567-1574
9. Bjerknes, R. (1984) Flow cytometric assay for combined measurement of phagocytosis and intracellular killing of *Candida albicans*
Journal of Immunological Methods 72: 229-241
10. Bjerknes, R., Basso, C.F. (1983)
Human leukocyte phagocytosis of zymosan particles measured by flow cytometry
Acta Pathol Microbiol Immunol Scand 91:341-348
11. Bevilacqua M., Nelson R., Mannori G., Cecconi O., (1994), Endothelial-leukocyte adhesion molecules in human disease

Ann Rev Med, 45: 361-378

12. Biscopig J., Bachmann-Mennenga B., (1996), Ropivacain, 60-65
In: Alon E.: Anästhesie und Schmerzlinderung in der Geburtshilfe
1.Aufl., Huber, Bern
13. Burm A., Stienstra R., Brouwer R., Emanuelsson B., van Kleef J., (2000),
Epidural infusion of ropivacain for postoperative analgesia after major
orthopedic surgery *Anesthesiology*, 93: 395-403
14. Cantinieaux, B., Hariga, C., Courtoy, P., Hupin, J., Fondu, P. (1989)
Staphylococcus aureus phagocytosis; A new cytofluorometric method using
FITC and paraformaldehyde
Journal of Immunological Methods 121: 203-208
15. Carlos M.T., Harlan J.M., (1994), Leukocyte-endothelial adhesion molecules
Blood, 84, 7: 2068-2101
16. Cederholm I., Briheim G., Rutberg H., Dahlgren C., (1994), Effects of five
amino-amide local anaesthetic agents on human polymorphnuclear leukocytes
measured by chemiluminescence
Acta Anaesthesiol Scand, 38: 704-710
17. Chan V., Weisbrod M., Kazas Z., Dragomir C., (1999), Comparison of
ropivacain and lidocain for intravenous regional anesthesia in volunteers
Anesthesiology, 90: 1602-08
18. Chernoff DM, Strichartz GM. (1990) Kinetics of local anesthetic inhibition of
neuronal sodium channels: pH- and hydrophobicity-dependence
Biophys J, 58:69-81
19. Courtney KR. (1975) Mechanism of frequency-dependent inhibition of
sodium currents in frog myelinated nerve by the lidocaine derivative GEA
J Pharmacol Exp Ther Nov;195:225-36
20. Cullen B.F., Haschke R.H., (1974), Local anesthetic inhibition of
phagocytosis and metabolism of human leukocytes
Anesthesiology V40, No.2: 142-146
21. Datta S., Camman W., Bader A., VanderBurgh L., (1995), Clinical effects
and maternal fetal plasma concentrations of epidural ropivacaine versus
bupivacaine for cesarean section
Anaesthesiology 82(6): 1346-52
22. Davidson, J. A. H., Boom, S. J., Pearsall, F. J., Zhang, P., Ramsay, G.
(1995) Comparison of the effects of four i.v. anaesthetic agents on
polymorphonuclear leukocyte function
Br J of Anaesth 74: 315-318

-
23. Demaurex N., Lew D.P., Krause K.H., (1992), Cyclopiazonic acid depletes intracellular Calcium stores and activates an influx pathway for divalent cations in HL-60 cells
J. Biol. Chem., 267: 2318-2324
24. Dunn P.A., Tyrer H.W. (1981), Quantitation of neutrophil phagocytosis, using fluorescent latex beads Correlation of microscopy and flow cytometry
J. Lab. Clin. Med. 98: 374-381
25. Emanuelson B.M., Zaric D., Nydahl P.A., Axelsson K.H., (1995) Pharmacokinetics of ropivacaine and bupivacaine during 21 hours of continuous epidural infusion in healthy male volunteers
Anaesth-Analg., 81(6): 1163-8
26. Feldman J., Chapi-Robertson K., Turner J., (1994), Do agents used for epidural analgesia have antimicrobial properties?
Regional Anesthesia, 19: 43-47
27. Fischer L., Bremer M., Coleman E., Conrad B., Krumm B., Gross A., Hollman M., Mandell G., Durieux M., (2001), Local anesthetics attenuate lysophosphatidic acid-induced priming of human neutrophils
Anesth Analg, 92: 1041-47
28. Fröhlich, D., Rothe, G., Schwall, B., Schmitz, G., Hobbhahn, J., Taeger, K. (1996)
Thiopentone and Propofol, not methohexitone nor midazolam, inhibit neutrophil oxidative response to bacterial peptide FMLP
Eur J Anaesthesiol 13: 582-588
29. Goldfarb, G., Belghiti, J., Gautero, H., Boivin, P. (1984)
In vitro effect of benzodiazepines on polymorphonuclear leukocyte oxidative activity
Anesthesiology 60: 57-60
30. Gordon D., Rice J., Mc Donald P., (1989), Regulation of human neutrophil type 3 complement receptor (iC3b receptor) expression during phagocytosis of Staphylococcus aureus and Escherichia coli
Immunology, 67: 460-465
31. Hammer R., Dahlgren C., Stendahl O., (1985), Inhibition of human leukocyte metabolism and random mobility by local anaesthesia
Acta Anaesthesiol Scand, 29: 520-523
32. Heine, M., Leuwer, M., Scheinichen, D., Arseniev, L., Jaeger, K., Piepenbrock, S. (1996) Flow cytometry evaluation of the *in vitro* influence of four i.v. anaesthetics on respiratory burst of neutrophils
British journal of anaesthesia 77: 387-392
33. Heller, A., Heller, S., Blecken, S., Urbaschek, R., Koch, T. (1998)

Effect of intravenous anaesthetics on bacterial elimination in human blood in vitro

Acta Anaesthesiol Scand 42: 518-526

34. Hille B., (1966), The common mode of action of three agents that decrease the transient change in sodium permeability in nerves, *Nature* 210:1220-22

35. Hille B., (1977) Local anesthetics: Hydrophilic or hydrophobic pathways for the drug receptor reaction. *J Gen Physiol*, 69: 497

36. Hirota K., Browne T. Appadu B.L., Lambert D.G., (1997), Do local anaesthetics interact with dihydropyridine binding sites on neuronal L-type calcium channels, *British Journal of Anaesthesia*, 78: 185-188

37. Hirota, K., Lambert, D.G. (1996)

I.v. anaesthetic agents inhibit dihydropyridine binding to L-type voltage-sensitive Ca^{2+} channels in rat cerebrocortical membranes

Br J Anaesth 77 (2): 248-253

38. Hyvönen M., Kowolik M., (1998), Dose dependent suppression of the neutrophil respiratory burst by lidocaine, *Acta Anaesthesiol Scand*, 42: 565-69

39. Jaconi M.E.E., Lew D.P., Carpentier J.-L., Magnusson K.-E., Sjögren W., Stendahl O., (1990), Cytosolic free calcium elevation mediates the phagosomelysosome fusion during phagocytosis in human neutrophils, *J. Cell Biol.*, 100: 1555-1564

40. Kai T., Nishimura J., Kobayashi S., Takahashi S., Yoshitake J., Kanaide H., (1993), Effects of lidocaine on intracellular calcium and tension in airway smooth muscle, *Anesthesiology*, 78: 954-965

41. Kalmar, J.R. (1994) Measurement of opsonic phagocytosis by human polymorphonuclear neutrophils, *Methods in Enzymology* 236: 108-118

42. Kaneshiro, E.S., Wyder, M.A., Wu, Y.-P., Cushion, M.T. (1993)

Reliability of calcein acetate methyl ester and ethidium homodimer or propidium iodide for viability assessment of microbes

Journal of microbiological methods 17: 1-16

43. Kapp, J.F. (1978)

Phagozytose – ein zentraler Mechanismus der Entzündungsreaktion

Klin. Wochenschr. 56: 1039-1047

44. Karow T., Lang R., (2000), *Pharmakologie und Toxikologie*, 8. Aufl., Eigenverlag, Pulheim

45. Kayser FH, Bienz KA, Eckert J, Lindenmann J, (1989), *Medizinische Mikrobiologie*, 8. Aufl., Thieme-Verlag, Stuttgart New York

-
46. Killian H., (1973), Lokalanästhesie und Lokalanästhetika, 2. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart
47. Kindler CH, Seeberger MD, Staender SE, (1998), Epidural abscess complicating epidural anesthesia and analgesia. An analysis of the literature. *Acta Anaesthesiol Scand*, 42(6): 614-20
48. Kopacz D., Emanuelsson B., Thompson G., Carpenter R., Stephenson C., (1994), Pharmacokinetics of ropivacaine and bupivacaine for bilateral intercostal blockade in healthy male volunteers, *Anaesthesiology* 81 (5): 1139-48
49. Krumholz,W., Demel,C., Jung,S., Meuthen,G., Knecht,J., Hempelmann,G. (1995)
The effects of thiopentone, etomidate ketamine and midazolam on several bactericidal functions of polymorphonuclear leucocytes *in vitro*
Eur J Anaesthesiol 12: 141-146
50. Krumholz,W., Endrass,J., Hempelmann,G. (1995)
Inhibition of phagocytosis and killing of bacteria by anaesthetic agents *in vitro*
Br J Anaesth 75: 66-70
51. Krumholz,W., Endrass,J., Hempelmann,G. (1994)
Propofol inhibits phagocytosis and killing of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* by polymorphonuclear leucocytes *in vitro*
Can J Anaesth 41(5): 446-449
52. Larsen R., (1999), Anästhesie, 6. Aufl., Urban und Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore
53. LeeSon S, Wang GK, Concus A, Crill E, Strischartz GR., (1992), Stereoselective inhibition of neuronal sodium channels by local anesthetics: Evidence for two sites of action? *Anesthesiology* 77:324-35
54. Macey,MG., McCarthy,DA., Vordermeier,S.,Newland,AC.,Brown,KA. (1995)
Effects of cell purification methods on CD11b and L-selectin expression as well as the adherence and activation of leucocytes
J Immunol Methods 26;181(2): 211-9
55. Martinsson T., Oda T., Fernvik E., Roempke K. Dalsgaard C.-J., Svensjö E., (1997), Ropivacain inhibits leukocyte rolling, adhesion and CD 11b/CD 18, *The journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 283: 59-65
56. Martinsson T., Haegerstrand A., Dalsgaard C.-J., (1997), Effects of ropivacaine on eicosanoid release from human granulocytes and endothelial cells *in vitro*, *Inflamm. res.*, 46: 398-403
57. Martinsson T., Ljung T., Rubio C., Hellstrom P., (1999), Beneficial effects of the colonic milieu on neutrophil oxidative burst: a possible pathogenic mechanism of ulcerative colitis, *J Lab Clin Med*, 130: 216-25

-
58. Melchart,D., Martin,P., Hallek,M., Holzmann,M., Jurcic,X., Wagner,H. (1992) Circadian variation of the phagocytic activity of polymorphnuclear leucocytes and of various other parameters in 13 healthy male adults, *Chronobiology International* 9(1): 35-45
59. Mikawa K., Akamatsu H., Nishina K., Shiga M., Maekawa M., Obara H., Niwa Y., (1996), Inhibitory effect of local anaesthetics on reactive oxygen species production by human neutrophils, *Acta. Anaesthesiol. Scand.*, 41: 524-528
60. Nakagawara,M., Takeshige,K., Takamatsu,J., Takahashi,S., Yoshitake,J., Minakami,S. (1986)
Inhibition of superoxide production and Ca^{2+} mobilisation in human neutrophils by halothane, enflurane and isoflurane
Anesthesiology 64: 4-12
61. Nishina K, Mikawa K, Takao Y, Shiga M, Naekawa N, Obara H, (1998), Intravenous lidocaine attenuates acute lung injury induced by hydrochloric acid aspiration in rabbits, *Anesthesiology*, 88: 1300-9
62. Oda,T., Maeda,H. (1986)
A new simple fluorometric assay for phagocytosis
Journal of Immunological Methods 88: 175-183
63. Ogle,J.D., Noel,J.G., Sramkoski,R.M., Ogle,C.K., Alexander,J.W. (1988)
Phagocytosis of opsonized fluorescent microspheres by human neutrophils A two-color flow cytometric methodfor the determination of attachment and ingestion
Journal of Immunological Methods 115: 17-29
64. Parr A., Zoutman D., Davidson J., (1999), Antimicrobial activity of lidocaine against bacteria associated with nosocomial wound infection, *Ann Plast Surg* 43: 239-245
65. Peck SL,, Johnston RB, Horwitz LD, (1985), Reduced neutrophil superoxide anion release after prolonged infusions of lidocaine, *J Pharmacol Exp Ther*, 235: 418-22
66. Perticarari,S., Presani,G., Mangiarotti,M.A., Banfi,E. (1991)
Simultaneous flow cytometric method to measure phagocytosis and oxidative products by neutrophils
Cytometry 12: 687-693
67. Quitmann J., Kern A., Wulf H., (2000), Pharmacokinetics of Ropivacaine during extradural anesthesia for total hip replacement, *J Clin Anesth*, 12(1): 36-39
68. Ragsdale DS, McPhee JC, Scheuer T, Catterall WA. (1994) Molecular determinants of state-dependent block of Na^+ channels by local anesthetics. *Science*. Sep 16;265(5179):1724-8

-
69. Ritchie J.M., Ritchie B, Greengard P. (1965), The effects of the nerve sheath on the action of Local anesthetics, *J Pharmacol Exp Ther* 150:160-66
70. Ritchie JM, Ritchie BR. 1968, Local anaesthetics: effects of pH on activity. *Science* 162:1394.
71. Roitt,J., Brostoff,J., Male,D (1998)
Immunology
Mosby London, Philadelphia, St. Louis, Sydney, Tokyo
72. Root,R.K., Cohen,M.S. (1981)
The microbicidal mechanisms of human neutrophils and eosinophils
Reviews of infectious diseases 3(3):565-597
73. Rothe,G., Emmendorfer,A., Oser, A., Roesler,J., Valet,G. (1991)
Flow cytometric measurement of the respiratory burst activity of phagocytes using dihydrorhodamine 123
Journal of Immunological Methods 138: 133-135
74. Rothe,G., Valet,G., (1988), Phagocytosis, Intracellular pH, and cell volume in the multifunctional analysis of granulocytes by flow cytometry, *Cytometry* 9: 316-324
75. Rothe,G., Valet,G. (1990)
Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 2'7'-Dichlorofluorescein
J Leucocyte Biol 47: 440-448
76. Sakuragi T., Ishino H., Dan K., (1998), Bactericidal activity of preservative free bupivacaine on microorganisms in the human skin flora, *Acta Anaesthesiol Scand*, 42: 1096-99
77. Salo,M., Pertillä,J,. (1989)
Effects of thiopental on granulocyte oxidative microbicidal capacity
Acta Anaesthesiol Scand. 33: 339-342
78. Schmidt W., Schmidt H., Bauer H., Gebhard M.M., Martin E., (1997), Influence of lidocaine on endotoxin-induced leukocyte – endothelial cell adhesion and macromolecular leakage in vivo, *Anesthesiology*, 87: 617-624
79. Sinclair R., Eriksson A.S., Gretzer C., Cassuto J., Thomsen P., (1993), Inhibitory effects of amide local anaesthetics on stimulus-induced human leukocyte metabolic activation, LTB 4 release and IL-1 secretion in vitro, *Acta. Anaesthesiol. Scand.*, 37: 159-165
80. Smits,E., Burvenich,C., Heynemann,R. (1997) Simultaneous flow cytometric measurement of phagocytotic and oxidative burst activity of polymorphonuclear leukocytes in whole bovine blood, *Veterinary immunology and immunopathology* 56: 259-269

-
81. Tomada M.K., Tsuchiya M., Ueda W., Hirakawa M., Utsumi K., (1990), Lidocain inhibits stimulation-coupled responses of neutrophils and protein kinase c, *Physiol. Chem. Phys. Med. NMR*, 22: 199-210
82. Vainionpaa V., Haavisto E., Huha T., Korpi K., Nuutinen L., Hollmen A., Jozwiak H., Magnusson A., (1995), A clinical and pharmacokinetic comparison of ropivacaine and bupivacaine in axillary plexus block, *Anesth Analg*, 81 (3): 534-538
83. Vandenbrouke-Gauls C., Thijssen R., Marcelis J., Sharma S., Verhoef J., (1984), Effects of lysosomotropic amines on human polymorphonuclear leukocyte function, *Immunology*, 51: 319-326
84. Weiss, M., Birkhahn, A., Krone, M., Schneider, E.M. (1996) Do etomidate and propofol influence oxygen radical production of neutrophils? *Immunopharmacol Immunotoxicol* 18: 291-307
85. Weiss, M., Buhl, R., Mirow, N., Birkhahn, A., Schneider, M., Wernet, P. (1994) Do barbiturates impair zymosan-induced granulocyte function? *J Crit Care* 9(2): 83-89
86. Weiss, M., Mirow, N., Birkhahn, A., Schneider, M., Wernet, P. (1993) Benzodiazepines and their solvents influence neutrophil granulocyte function *British Journal of Anaesthesia* 70: 317-321
87. Wicks T.C., (1995), Ropivacain: An introduction to a new local anesthetic, *The clinical Forum for Nurse Anesthetists*, Vol 6, No 3: 129-134
88. Wilson, R.M., Galvin, A.M., Robins, R.A., Reeves, W.G. (1985) A flow cytometric method for the measurement of phagocytosis by polymorphonuclear leucocytes *Journal of Immunological Methods* 76: 247-253
89. Wilsson A., Lundquist H., Gustafsson M., Stendahl O., (1996), Killing of phagocytosed *Staphylococcus aureus* by human neutrophils requires intracellular free calcium, *Journal of Leukocyte Biology*, 59: 902-907

6.3 Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei

Professor Dr. Klaus Unertl,
für die Überlassung des Themas der vorliegenden Arbeit.

Dr. Hans-Jürgen Dieterich,
für seine persönliche Unterstützung bei Planung und Durchführung der Versuche und seine konstruktive Kritik und Anregungen beim Verfassen der Dissertation

Dr. Ralph-Thomas Kiefer,
meinem Betreuer, möchte ich ausdrücklich für seine Spontantität und Ehrlichkeit danken, mir zu einem geeigneten Dissertationsthema zu verhelfen. Ich danke Ihm auch für seine Erfahrung und wichtige Unterstützung, die mir während dieser Arbeit zuteil wurde und auf die ich jederzeit zurückergreifen konnte.

Dr. Annette Ploppa,
möchte ich ganz besonders danken für Ihre unermüdliche Hilfe und Unterstützung, Ihren methodischen Ideenreichtum, Ihre Geduld und Ausdauer bei der Einarbeitung in die Methodik, Datenauswertung, Interpretation und Erstellung des Manuskriptes, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Allen Mitarbeitern des Anästhesiologischen Labors, ZMF-Derendingen,
die mir jederzeit Rat und Tat im Labor zur Seite standen und damit sowohl direkt als auch indirekt meine Arbeit unterstützten und letztendlich erst möglich gemacht haben.

Oup, Mam und bei Berna fürs Holz