

Aus der
Universitätsklinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin
Universitätsklinikum Tübingen

**Einsatz des Anästhetikums Sevofluran zur Inhibition
systemischer Inflammation**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Schad,
Jessica Yvonne

2018

Dekan:	Professor Dr. I. B. Autenrieth
1. Berichterstatter:	Professor Dr. P. Rosenberger
2. Berichterstatter:	Dr. V. Steger
Tag der Disputation:	19.07.2018

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis.....	7
Tabellenverzeichnis.....	13
Grafiken und Diagramme	14
1 Einleitung	17
1.1 Das systemische Inflammationssyndrom	17
1.1.1 Definition und Ätiologie.....	17
1.1.2 Pathophysiologie der systemischen Inflammation.....	18
1.1.3 Thrombozyten und systemische Inflammation	20
1.2 Inhalative Anästhetika und systemische Inflammation.....	23
1.3 Adenosin und Adenosinrezeptoren	25
1.3.1 Das Signalmolekül Adenosin	25
1.3.2 Adenosinrezeptoren.....	26
1.4 Extrakorporale Zirkulation	28
1.4.1 Einsatz und Aufbau extrakorporaler Zirkulation.....	28
1.4.2 Komplikationen während extrakorporaler Zirkulation.....	28
1.5 Ischämie Reperfusionsschaden der Leber.....	29
1.5.1 Pathogenese.....	30
1.6 Fragestellung dieser Arbeit	31
2 Material und Methoden	34
2.1 Modell der Thrombozyten-Granulozyten Komplexbildung in vitro.....	34
2.1.1 Blutabnahme für in vitro Versuche.....	34
2.1.2 Stimulation von Humanblut mittels ADP	34
2.1.3 Durchflusszytometrische Analysen.....	35
2.1.4 Darstellung von TGK durch Immunfluoreszenz	41
2.2 Modell der extrakorporalen Zirkulation (Chandler Loop).....	42
2.2.1 Aufbau des Modells	42
2.2.2 Berechnung der Flussgeschwindigkeit	43
2.2.3 Füllung und Lauf des Chandler Loops.....	44

Inhaltsverzeichnis

2.2.4	Durchflusszytometrische Analyse	45
2.3	In vivo Ischämie Reperfusionsmodell der Leber in der Maus.....	47
2.3.1	Leber Ischämie und Reperfusionsmodell	48
2.3.2	Inhalation von Sevofluran	49
2.3.3	Blut- und Organentnahme	50
2.3.4	Durchflusszytometrische Analyse.....	50
2.3.5	Bestimmung von plasmatischen Zytokinen	52
2.3.6	Enzymatische Analyse der Lebertransaminase ALT	56
2.3.7	Anfertigung von Organschnitten	57
2.3.8	IHC Färbung	57
2.3.9	Transkriptionsanalyse (rtPCR).....	60
2.3.10	Immunfluoreszenzfärbung	62
2.4	Statistik.....	63
2.5	Verbrauchsmaterialien und Reagenzien	64
2.6	Laboraausstattung.....	65
3	Ergebnisse	67
3.1	Effekt des Anästhetikums Sevofluran auf die Aktivierung und Interaktion von Thrombozyten und Leukozyten in Humanblut.....	68
3.1.1	Analyse des Einflusses von Sevofluran auf die ADP-induzierte proinflammatorische TGK-Bildung	68
3.1.2	Analyse des Einflusses von Sevofluran auf die ADP-induzierte proinflammatorische Aktivierung von Thrombozyten	69
3.1.3	Analyse des Einflusses von Sevofluran auf die ADP-induzierte proinflammatorische Aktivierung von Granulozyten	71
3.1.4	Analyse der Morphologie ADP-induzierter TGK mittels Immunfluoreszenz.....	72
3.2	Effekt des Anästhetikums Sevofluran auf Thrombozyten-Leukozyten Aktivierung in Humanblut während extrakorporaler Zirkulation	73
3.2.1	Identifizierung und Quantifizierung von TGK in Humanblut im Modell Chandler Loop.....	74
3.2.2	Analyse des Effektes von Sevofluran auf die mittels P-Selektin dargestellte Thrombozytenaktivierung	75

Inhaltsverzeichnis

3.2.3 Analyse des Effektes von Sevofluran auf die GP IIb/IIIa Aktivierung.....	76
3.2.4 Analyse des Effektes von Sevofluran auf die Mac-1 Aktivierung von Granulozyten	78
3.2.5 Identifizierung und Aktivierung von Thrombozyten-/ Monozyten Komplexen in Humanblut im Modell Chandler Loop	79
3.3 Effekt des Anästhetikums Sevofluran auf proinflammatorische Thrombozyten-/ Leukozyten Interaktion in murinem Blut während Ischämie und Reperfusion der Leber	79
3.3.1 Identifizierung und Quantifizierung von TGK in einem murinen Modell der Leber IR.....	79
3.3.2 Analyse des Effektes von Sevofluran auf die thrombozytäre P-Selektin Expression.....	80
3.3.3 Analyse des Effektes von Sevofluran auf die thrombozytäre GP IIb/IIIa Aktivierung.....	81
3.3.4 Analyse des Effektes von Sevofluran auf die Granulozytenaktivierung anhand des Integrins Mac-1	83
3.3.5 Identifizierung und Aktivierung von Thrombozyten-/ Monozyten Komplexen im murinen Modell der Leber IR.....	83
3.3.6 Systemische Wirkung von Sevofluran auf Zytokinkonzentrationen in murinem Blut während Leber IR.....	84
3.3.7 Re-Analyse des protektiven Effektes von Sevofluran während Leber IR in Adora2a ^{-/-} Tieren	85
3.4 Effekt von Sevofluran auf murines Leberparenchym während Leber IR	87
3.4.1 Analyse des Effektes von Sevofluran auf Lebertransaminasen als Marker für Gewebsnekrose	87
3.4.2 Analyse des Effektes von Sevofluran auf die TGK-Sequestrierung im Leberparenchym.....	88
3.5 Untersuchung der Sevofluran-vermittelten Effekte auf die Expression von Adora2b in murinem Leberparenchym.....	90

Inhaltsverzeichnis

3.5.1	Analyse des Einflusses von Sevofluran auf das mögliche Target Gen Adora2b in murinem Lebergewebe	90
3.5.2	Darstellung der Adora2b Expression als mögliches Target Gen von Sevofluran in murinem Lebergewebe mittels Immunfluoreszenz	91
4	Diskussion.....	92
5	Zusammenfassung	102
6	Literaturverzeichnis.....	106
7	Erklärung zum Eigenanteil	113
8	Veröffentlichungen	114
8.1	Publikationen.....	114
8.2	Poster und Vorträge	114
9	Danksagung.....	115

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
-/-	Knockout eines spezifischen Gens
°C	Grad Celsius
A.	Arteria
A. dest.	Aqua destillata
Adora2a	Adenosinrezeptor 2a
Adora2b	Adenosinrezeptor 2b
ADP	Adenosindiphosphat
ALT	Alanin-Aminotransferase
AMP	Adenosinmonophosphat
ANOVA	Analysis of variance (= Varianzanalyse)
APC	Allophycocyanin
AST	Aspartat-Aminotransferase
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
BV421	Brillant violett 421
CD	Cluster of differentiation
cDNS	Komplementäre DNS

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
cm	Zentimeter
DAB	3,3'Diaminobenzidine
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ECLS	Extracorporeal life support
ECMO	Extrakorporale Membranoxygenierung
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EKZ	Extrakorporale Zirkulation
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FACS	Fluorescent activated cell scan (= Durchflusszytometrie)
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FSC	Forwardscatter
FSGO	Fish skin gelatin oil
g	Erdbeschleunigung ($\approx 9,81 \text{ m/s}^2$)
g	Gramm
G-Protein	Guanosintriphosphat-bindendes Protein
GP	Glykoprotein
h	Stunde
H ₂ O	Wasser

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Chlorwasserstoff
HRP	Horseradish peroxidase (= Meerrettichperoxidase)
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenös
ICU	Intensive care unit (= Intensivstation)
IE	Internationale Einheiten
IFN- γ	Interferon- γ
IgG	Immunglobulin G
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-6
IQR	Interquartalabstand
IR	Ischämie und Reperfusion
Jhd.	Jahrhundert
KC	Keratinocyte chemoattractant
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
L	Liter
Lig.	Ligamentum

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
M	Molar
MAP	Mittlerer arterieller Blutdruck
Max.	Maximum
mg	Milligramm
min	Minute
Min.	Minimum
ml	Milliliter
mM	Millimolar (= Millimol pro Liter)
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
mRNS	Messenger RNS
mV	Millivolt
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	R-Phycoerythrin
PE-Cy7	PE Cyanin-gekoppelt

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
PerCp	Peridinin Chlorophyll Protein
PGE ₁	Prostaglandin E ₁
PMN	Polymorphkernige neutrophile Granulozyten
PMT	Photo multiplier tube
PVC	Polyvinylchlorid
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	Rounds per minute
RT	Raumtemperatur
rtPCR	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
sek	Sekunde
SEM	Standard error of the mean (= Standardfehler)
SOFA	Sepsis related organ failure assessment score
SSC	Sidewardscatter
TGF- β	Transforming growth factor- β
TGK	Thrombozyten-Granulozyten Komplex
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor α
U	Umdrehungen
U/ L	Units pro Liter

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
V.	Vena
Vol.-%	Volumenprozent
vWF	von Willebrand Faktor
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
z.B.	Zum Beispiel
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar (= Mikromol pro Liter)
μm	Mikrometer

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Kriterien zur Definition eines SIRS [9]	18
Tabelle 2: Übersicht der Laserausstattung des FACS Canto II sowie die entsprechenden Fluorochrome mit ihrer maximalen Emission.....	37
Tabelle 3: Verschiedene Parameter zur Einstellung des Durchflusszytometers an die zu untersuchende Probe und die verwendeten Fluorochrome.....	38
Tabelle 4: Konzentrationen der Standardreihe der jeweiligen Zytokine zur Anfertigung einer Kalibrierungskurve.	55
Tabelle 5: Volumen des ALT Substrates bzw. des ALT Kalibrators und dazugehörige Konzentrationen der Kalibrierungskurve für die Messung von ALT.....	56

Grafiken und Diagramme

Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Thrombozyten-Granulozyten Komplexes.....	22
Abbildung 2: Exemplarische Darstellung durchflusszytometrischer Messungen von Leukozyten.	39
Abbildung 3: Übersicht der Gating-Strategie zur Identifizierung und Charakterisierung von TGK in vitro.	41
Abbildung 4: Modell der extra-korporalen Zirkulation (Chandler Loop).	43
Abbildung 5: Gating-Strategie zur Identifizierung und zur Charakterisierung von TGK im Modell der extrakorporalen Zirkulation.	47
Abbildung 6: Präparation der murinen Leber.....	48
Abbildung 7: Zeitplan des Leber IR Modells der Maus.....	49
Abbildung 8: Gating-Strategie zur Identifizierung und zur Charakterisierung von TGK im murinen Modell der Leber IR.....	52
Abbildung 9: Schema der Quantifizierung von Zytokinen mittels Cytometric Bead Array.....	53
Abbildung 10: Darstellung der Messpositionen der einzelnen Partikel zur Identifikation und spezifischen Konzentrationsbestimmung verschiedener Zytokine mittels Durchflusszytometrie.	53
Abbildung 11: Verdünnungsreihe für die Standardkurve zur Bestimmung der Zytokinkonzentrationen.	54
Abbildung 12: Anordnung der verschiedenen Ansätze für die immunhistochemische Darstellung von TGK im Lebergewebe.	58
Abbildung 13: Effekt von Sevofluran und PGE ₁ auf die TGK-Bildung.	69
Abbildung 14: Effekt von Sevofluran und PGE ₁ auf die Thrombozytenaktivierung.	70
Abbildung 15: Effekt von Sevofluran und PGE ₁ auf die Granulozytenaktivierung.	71
Abbildung 16: Darstellung von ADP-induzierten TGK in humanen Blutproben durch Immun-fluoreszenz.....	73

Grafiken und Diagramme

Abbildung 17: Effekt von Sevofluran mit und ohne Adora2b Antagonist auf die TGK-Bildung.....	75
Abbildung 18: Effekt von Sevofluran mit und ohne Adora2b Rezeptorantagonist auf die P-Selektin Expression von humanen Blutproben während extrakorporaler Zirkulation.....	76
Abbildung 19: Effekt von Sevofluran mit und ohne Adora2b Antagonist auf die Aktivierung des thrombozytären Fibrinogenrezeptors GP IIb/IIIa in Humanblut während extrakorporaler Zirkulation.....	77
Abbildung 20: Effekt von Sevofluran mit und ohne Adora2b Antagonist auf das leukozytäre Integrin Mac-1 während extrakorporaler Zirkulation.....	78
Abbildung 21: Effekt von Sevofluran in Wildtypen und Adora2b ^{-/-} Mäusen auf die TGK-Bildung.....	80
Abbildung 22: Effekt von Sevofluran auf die P-Selektin Expression in murinen Blutproben von C57BL/6 Wildtyp und Adora2b ^{-/-} Mäusen nach Leber IR.	81
Abbildung 23: Effekt von Sevofluran auf die GP IIb/IIIa Expression in murinen Blutproben von C57BL/6 Wildtypen und Adora2b ^{-/-} Mäusen nach Leber IR.	82
Abbildung 24: Effekt von Sevofluran auf die CD11b Expression in murinen Blutproben von C57BL/6 Wildtyp und Adora2b ^{-/-} Mäusen nach Leber IR.....	83
Abbildung 25: Effekt von Sevofluran auf Zytokinkonzentrationen im murinem Plasma nach Leber IR.....	85
Abbildung 26: Effekt von Sevofluran in Wildtypen und Adora2a ^{-/-} Mäusen auf die TGK-Bildung.....	86
Abbildung 27: Effekt von Sevofluran auf Plasmakonzentrationen von IL-6 und KC nach Leber IR.....	87
Abbildung 28: Analyse des Einflusses von Sevofluran auf die Schädigung des murinen Leberparenchyms durch Leber IR.....	88
Abbildung 29: Analyse des Einflusses von Sevofluran auf die Quantität morphologisch dargestellter TGK in der Leber.....	89
Abbildung 30: Analyse der Adora2b Expression in murinem Lebergewebe mittels rtPCR.....	90

Grafiken und Diagramme

Abbildung 31: Expression von Adora2b in murinem Lebergewebe von C57BL/6 Wildtypen mit oder ohne Inhalation von Sevofluran dargestellt durch Immunfluoreszenz.91

1 Einleitung

1.1 Das systemische Inflammationssyndrom

1.1.1 Definition und Ätiologie

Das systemische Inflammationssyndrom (SIRS) und eine durch Mikroorganismen ausgelöste Sepsis stellt sowohl medizinisch als auch ökonomisch eine große Herausforderung in der Intensivmedizin dar [1, 2]. Unter intensivmedizinischen Patienten, welche von einem SIRS bzw. einer Sepsis betroffen sind, ist eine hohe Morbidität sowie Mortalität zu verzeichnen [1, 3-5]. Insbesondere mit diesem Krankheitsbild assoziierte Komplikationen, wie z.B. Lungen-, Nieren- und Leberfunktionsstörungen sind entscheidend für die Prognose des Patienten [1, 3].

Bereits im antiken Griechenland beschrieb Hippocrates ein auf Verletzungen folgendes Syndrom welches durch Fieber verursachende Toxine, freigesetzt aus faulender Materie, gekennzeichnet war. Vor allem durch die Entdeckung der Mikroorganismen von Pasteur und Koch Ende des 19. Jhd. wurde der Begriff Sepsis als eine systemische Reaktion auf pathogene Keime und deren freigesetzte Toxine definiert [6, 7]. Im Laufe des 20. Jhd. wurde im Rahmen von Studien beobachtet, dass nicht nur pathogene Keime sondern auch nicht-infektiöse Ursachen wie Parenchymschäden durch kardiale und zerebrale Infarkte oder Ischämie-Reperfusionsschäden in Organen, verursacht durch Transplantationen oder Resektionen, zu systemischer Inflammation führen können. Auf Grund dieser Erkenntnisse sollten neue Kriterien für die Definition der Sepsis gefunden werden. Daraufhin wurde 1991 in einer Konsensuskonferenz der amerikanischen Thoracic Society und der Society of Critical Care Medicine der Begriff SIRS (= systemic inflammatory response syndrome) und dessen verbindliche Kriterien eingeführt [8, 9].

Einleitung

Körpertemperatur	Hyperthermie (>38°C)/ Hypothermie (<36°C)
Herzfrequenz	Tachykardie (HF> 90/min)
Atemarbeit	Tachypnoe (AF> 20/min)/ Hyperventilation (paCO ₂ <32 mmHg)
Labor	Leukozytose (>12000/μl)/ Leukopenie (<4000/μl)/ >10% unreife Neutrophile

Tabelle 1: Kriterien zur Definition eines SIRS [9]

Um die Diagnose eines SIRS zu stellen, müssen mindestens zwei dieser klinischen Kriterien erfüllt sein. Bei zusätzlichem Nachweis pathogener Mikroorganismen spricht man von Sepsis. Eine schwere Sepsis ist definiert als Sepsis mit zusätzlicher Dysfunktion bzw. Hypoperfusion eines oder mehrerer Organe. Als weitere Komplikation kann daraufhin ein septischer Schock eintreten, welcher als Sepsis mit zusätzlicher Hypotension und einem systolischen Druck <90mmHg bzw. einem MAP <60mmHg definiert ist [9].

Um die Spezifität der Diagnose Sepsis zu verbessern, wurde 2016 eine neue Definition und überarbeitete Diagnosekriterien von einem Expertenteam für dieses Krankheitsbild publiziert. Diese definiert den Begriff Sepsis als eine lebensbedrohliche Organdysfunktion, welche durch eine dysregulierte Reaktion des Körpers auf z.B. eine Infektion entsteht. Hierbei werden die sogenannten SOFA Kriterien für die Beurteilung der Organdysfunktion herangezogen. Diese Kriterien beurteilen die Funktion relevanter Systeme wie Lunge, Herz, Leber, Niere, ZNS und das Gerinnungssystem. Für Patienten ohne intensivmedizinische Überwachung kann der quick SOFA Score angewendet werden. Hierbei werden die Atemfrequenz, der systolische Blutdruck und Bewusstseinsveränderungen beurteilt. Ab einem SOFA Score von zwei Punkten wird eine lebensbedrohliche Organdysfunktion auf Grund von Sepsis angenommen [10].

1.1.2 Pathophysiologie der systemischen Inflammation

Im Rahmen systemischer Inflammation kommt es zu einer Störung der Homöostase von pro- und antiinflammatorischen Vorgängen [11]. Hierbei

Einleitung

lassen sich verschiedene Stadien einteilen [12, 13]. Nach einer Gewebeschädigung durch Toxine oder nicht-infektiöse Ursachen entsteht vorerst eine durch das angeborene Immunsystem ausgelöste Lokalreaktion. Pathogene Toxine von Mikroorganismen oder nekrotischem Gewebe werden durch bestimmte Rezeptoren auf Immunzellen detektiert. Hierbei sind vor allem spezifische Toll-like Rezeptoren (TLR) auf Leukozyten aber auch auf Thrombozyten von großer Bedeutung. TLR gehören zu der Gruppe der immunogenen Rezeptoren, welche bestimmte Muster auf pathogenen Strukturen erkennen können. Oberflächenmoleküle von Mikroben, wie z.B. das bakterielle Lipopolysaccharid (= LPS) als Bestandteil der Bakterienzellwand, können solche Muster darstellen (PAMPS= Pathogen associated molecular patterns). Es werden aber auch Strukturen von geschädigtem körpereigenem Material (DAMPS= Danger associated molecular patterns) von diesen Rezeptoren erkannt [11, 14]. Durch die Aktivierung der TLR kommt es zur Migration von Granulo- und Monozyten in das beschädigte Gewebe und zu einer massiven Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen, wie z.B. IL-6 und TNF α , sowie von reaktiven Sauerstoffspezies [3, 11, 12, 15]. Zytokine und Chemokine sind Proteine, welche weitere inflammatorische Reaktionen, wie die Rekrutierung von Granulozyten aus dem blutbildenden Knochenmark, sowie eine verstärkte Migration dieser Immunzellen in das Gewebe fördern [15]. Insbesondere IL-6 spielt eine zentrale Rolle während der Entstehung von Inflammation. Durch die gesteigerte Produktion von IL-6 wird die zelluläre Immunantwort und die Sekretion akuter Phase Proteine in der Leber potenziert [16, 17]. Das Chemokin IL-8 hingegen rekrutiert vor allem neutrophile Granulozyten zum Ort der Inflammation [18].

Durch diese erste Reaktion sollen Infektionserreger und nekrotisches Gewebe eliminiert werden, mit dem Ziel potenzielle Organschäden zu minimieren und den Heilungsprozess zu fördern [13]. Anschließend kommt es zu einer kompensatorischen antiinflammatorischen Phase. Hierbei werden vermehrt antiinflammatorische Zytokine, wie z.B. IL-10 produziert. Zusätzlich ist eine gesteigerte Inaktivierung und Apoptose von Immunzellen zu beobachten. Das Ziel dieser Phase besteht darin, die immunologische Homöostase wieder

herzustellen [11, 13]. Falls dennoch die proinflammatorische Komponente dominiert, verursachen freigesetzte Mediatoren u.a. eine endotheliale Dysfunktion, welche durch erhöhte Gefäßpermeabilität und eine zunehmende Koagulopathie gekennzeichnet ist. Falls es im Verlauf nicht gelingt die inflammatorischen Vorgänge zu kompensieren kommt es zu einer dominierenden Immunsuppression und damit zu einer gesteigerten Gefahr einer Superinfektion durch Mikroben. Dies kann schlussendlich zu einem Multiorganversagen und damit eventuell zum Tode des Patienten führen [12, 13].

1.1.3 Thrombozyten und systemische Inflammation

Obwohl Thrombozyten bereits im 19. Jhd. entdeckt wurden, konnte ihre Funktion als zelluläre Mediatoren der Blutgerinnung erst einige Jahre später erklärt werden. Jedoch wurde bereits in dieser Epoche postuliert, dass Thrombozyten über eine gezielte Interaktion mit Leukozyten eine Rolle während immunologischer Vorgänge einnehmen [19]. In weiteren Studien wurde diese These bestätigt: Während systemischer Inflammation sind nicht nur klassische Immunzellen wie Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten beteiligt, sondern auch Thrombozyten. Thrombozyten agieren neben ihren Funktionen in der Blutgerinnung auch immunmodulatorisch, indem sie durch diverse Interaktionen mit Immunzellen z.B. die Rekrutierung von Leukozyten an den Ort der Entzündung fördern und dort deren Adhäsion an das beteiligte Endothel, sowie die Transmigration in das umliegende Gewebe potenzieren [20, 21].

Zudem wird durch die Interaktion von Thrombozyten und Leukozyten die immunologische Funktion beider Zelltypen gestärkt. Hierbei wird u.a. die Ausbildung sogenannter NET's (= neutrophil extracellular traps) aus neutrophilen Granulozyten zur Elimination von Pathogenen gefördert. NET's bestehen aus einem Netz extrazellulärer DNS mit Histonen, welche durch zusätzlich integrierte bakterizide Substanzen der Granula von neutrophilen Granulozyten zirkulierende Pathogene eliminieren können. Des Weiteren wird über intrazelluläre Signalkaskaden die Produktion von antimikrobiellen Molekülen und reaktiven Sauerstoffspezies gesteigert [14, 20]. Diese Bildung

Einleitung

von Thrombozyten-Granulozyten Komplexen (=TGK) wird über verschiedene Oberflächenmoleküle von Thrombozyten vermittelt. Während der Aktivierung ruhender Thrombozyten durch proinflammatorische Vorgänge, kommt es zu einer Freisetzung des intrazellulär gespeicherten Moleküls P-Selektin an die Oberflächenmembran. Über die Interaktion spezifischer Liganden mit P-Selektin auf endothelgebundenen Thrombozyten wird z.B. das Rollen und die Adhäsion von Granulozyten an das Endothel vermittelt. Durch die Bindung von thrombozytärem P-Selektin an das leukozytäre Glykoprotein PSGL-1 (= P-Selektin Glykoprotein Ligand-1) wird zudem eine lockere Verbindung von Thrombozyten zu neutrophilen Granulozyten und Monozyten hergestellt [21-23]. Zusätzlich induziert diese Interaktion eine Signalkaskade innerhalb neutrophiler Granulozyten, welche zu einer gesteigerten Aktivierung und Expression bestimmter Oberflächenintegrine wie z.B. Mac-1 (=CD11b/CD18) auf der Membran von Granulozyten führt. In aktivierten Thrombozyten wird die Präsentation eines weiteren wichtigen Glykoproteins GP IIb/IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_{III}$) im Rahmen der Interaktion von Thrombozyten und Granulozyten gesteigert. Hierbei kommt es nach Aktivierung zirkulierender Thrombozyten durch proinflammatorische Liganden, wie z.B. ADP oder Thrombin, zu einer Konformationsänderung von GP IIb/IIIa von einer ruhenden in eine aktive Konformation [21, 24, 25]. Die aktive Konformation von GP IIb/IIIa spielt eine Schlüsselrolle in der Hämostase, indem sie Fibrinogen aus dem Plasma bindet und durch die Bildung von Fibrinogenbrücken zwischen einzelnen Thrombozyten das Wachstum eines Thrombus ermöglicht [21]. Im Inflammationsgeschehen vermittelt GP IIb/IIIa über die Bindung von Fibrinogen an das leukozytäre Integrin Mac-1 eine stabile Bildung von TGK und ermöglicht somit die weitere Aktivierung und Potenzierung der inflammatorischen Antwort beider Zelltypen [14, 21, 22, 26, 27].

Falls weitere Liganden wie z.B. CD40L vorhanden sind, kann in Niedrigstromgebieten eine Bindung ohne die Beteiligung von P-Selektin zwischen Granulozyten und Thrombozyten über GP IIb/IIIa-Mac-1 erfolgen [27]. Neuere Erkenntnisse zeigen außerdem, dass an das Endothel adhärente

Einleitung

Granulozyten über die Exposition von PSGL-1 in das Gefäßlumen, aktiv nach P-Selektin aktivierter Thrombozyten suchen, um mit diesen zu interagieren [28].

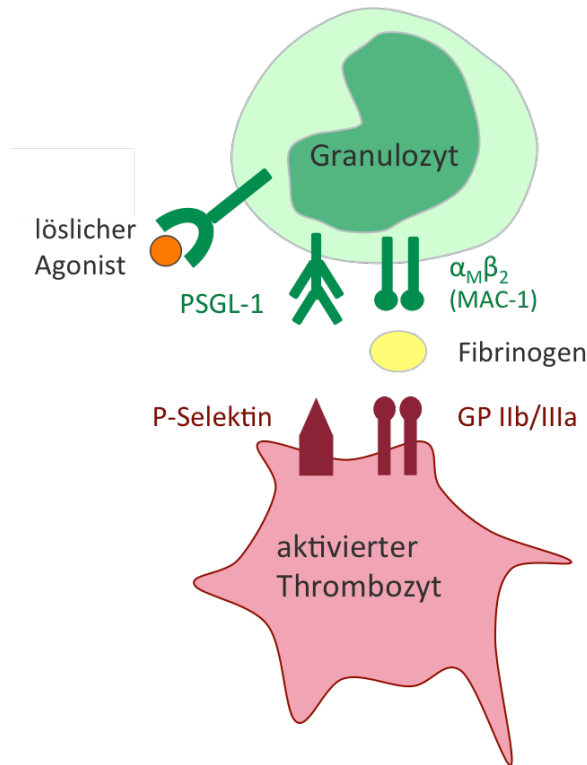


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Thrombozyten-Granulozyten Komplexes.

Schema der beteiligten Rezeptoren und der Adhäsionsmoleküle, welche hauptsächlich zu einer Komplexbildung von Thrombozyten und Granulozyten führen. Die erste lockere Bindung wird über P-Selektin aktivierter Thrombozyten und PSGL-1 auf Granulozyten vermittelt. Diese Interaktion führt über intrazelluläre Signalkaskaden zur Exposition weiterer Integrine. Der thrombozytäre Rezeptor GP IIb/IIIa geht in eine aktive Konformation über und kann somit über Fibrinogen an das granulozytäre Integrin Mac-1, welches im Rahmen systemischer Inflammation ebenfalls vermehrt exprimiert wird, binden. Hiermit wird eine feste Verknüpfung der Thrombozyten-Granulozyten Komplexe gebildet und die pro-inflammatorische Aktivierung weiter gesteigert.

Thrombozyten selbst können zudem über direkte Detektion und Elimination von Pathogenen als Immunzellen wirken. F_c - Rezeptoren auf der Thrombozytenmembran können dabei Immunglobuline sowie Immunkomplexe direkt binden und somit zu einer schnellen Detektion dieser durch die angeborene Immunabwehr beitragen [14]. Auch der Rezeptor TLR4, welcher

u.a. in der Lage ist LPS als bakterielles Oberflächenmolekül zu detektieren, wird auf Thrombozyten exprimiert [20]. Bindet hierbei zirkulierendes LPS an TLR4 auf Thrombozyten werden interne Signalkaskaden aktiviert, was u.a. eine vermehrte Expression von P-Selektin bewirkt. Über diese Kaskaden kommt es zu einer proinflammatorischen Thrombozyten-Leukozyten Interaktion und gesteigerter Bildung von NET's. Zusätzlich sind Veränderungen im Zytoskelett und damit eine vermehrte Aggregation und Adhäsion von Thrombozyten festzustellen [14].

Nach Bindung unterschiedlicher spezifischer Aktivatoren wie z.B. ADP, Kollagen oder Thrombin sezernieren Thrombozyten ihre intrazellulären Speicher. Besonders von Bedeutung sind hierbei die α -Granula und die dichten Granula aktivierter Thrombozyten, deren Freisetzung zu verstärkter Hämostase und Inflammation sowie zu erhöhter Endothelpermeabilität führt [14, 21]. Die α -Granula enthalten vor allem P-Selektin, Chemokine und Wachstumsfaktoren, welche zu vermehrter Adhäsion einzelner Thrombozyten und anderen Zelltypen führen. In den dichten Granula sind dahingegen kleine Signalmoleküle wie z.B. ADP und Serotonin gespeichert. Diese Moleküle amplifizieren die Bildung von Thromben durch gesteigerte Thrombozytenaggregation und die Aktivierung von Endothelzellen und Leukozyten im Rahmen einer inflammatorischen Antwort [21].

Ein weiterer Bestandteil systemischer Inflammation ist eine zunehmende Endotheldysfunktion. Thrombozyten sind hierbei über die Interaktion mit Endothelzellen ebenfalls beteiligt. Rezeptoren auf der Oberflächenmembran von Thrombozyten vermitteln die Adhäsion aktivierter Thrombozyten an Endothelzellen [21]. Die an das Endothel gebundenen Thrombozyten fördern anschließend aktiv die Bildung von TGK, durch die Rekrutierung zirkulierender Granulozyten in den adhärenenten Thrombus [21].

1.2 Inhalative Anästhetika und systemische Inflammation

Bereits in den 30er Jahren wurden die narkotisierenden Eigenschaften von gasförmigen Halogenen und Fluranen von Wissenschaftlern beschrieben. Nach

Einleitung

der Entwicklung von Halothan, einem gasförmigem Narkotikum dieser Klasse, wurden aufgrund von diversen unerwünschten Nebenwirkungen zwischen 1960 und 1970 weitere Substanzen aus der Gruppe der Flurane entwickelt: Desfluran, Isofluran und Sevofluran [29]. Diese Substanzen werden bis heute insbesondere zur Aufrechterhaltung von Narkosen verwendet.

Potente gasförmige Anästhetika, wie z.B. Sevofluran, besitzen die Eigenschaft sehr schnell an- und abzufluten. Dies führt zu einer guten perioperativen Steuerung der Narkosetiefe, sowie zu einer schnellen postoperativen Erholung des Patienten [30]. Zudem wird insbesondere Sevofluran als bronchodilatatorisch und kardioprotektiv beschrieben [31, 32], was bei Patienten mit pulmonalen bzw. kardialen Vorerkrankungen von Vorteil sein kann.

Neben ihrem Einsatz als Narkotika sind volatile Anästhetika dafür bekannt, antiinflammatorische Effekte zu besitzen. Volatile Anästhetika, wie die zu den Fluranen gehörigen Substanzen Sevofluran und Isofluran, besitzen u.a. hemmende Eigenschaften auf die Aktivierung und Interaktion von Leukozyten und Thrombozyten. Erste Untersuchungen zeigten, dass inhalative Anästhetika die Aktivierung und die Adhäsion von neutrophilen Granulozyten, sowie die Freisetzung von ROS und proinflammatorischen Zytokinen hemmen können [33-35]. Durch die Applikation von Sevofluran wird die Umwandlung des Moleküls LFA-1 (Lymphocyte function-associated antigen-1), welches als wichtiger Mediator der Leukozytenaktivierung und -adhäsion fungiert, in die aktive Konformation verhindert [36]. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Inkubation mit Sevofluran die Aktivierung des bereits beschriebenen thrombozytären Rezeptors GP IIb/IIIa für die Bindung von Fibrinogen und damit die Bildung von Thrombozytenaggregaten hemmt [37]. Zusätzlich kann Sevofluran die Expression des Oberflächenmoleküls P-Selektin als Marker für Thrombozytenaktivierung senken. Die Bildung proinflammatorischer TKG konnte durch die Inkubation mit Sevofluran ebenfalls reduziert werden [38, 39]. In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass die Applikation von inhalativen Anästhetika, wie Sevofluran oder Isofluran, zu einer Reduktion des Ischämie-Reperfusionsschadens in verschiedenen vitalen Organen führen kann [40].

Volatile Anästhetika gelten als kardioprotektiv und können z.B. durch eine Präkonditionierung mit dem entsprechenden Narkosegas zu einem verminderten Myokardschaden bei Verschluss eines Koronargefäßes beitragen [40-43]. Hierbei wurde beschrieben, dass durch Präkonditionierung mit Sevofluran die Adhäsion aktivierter Thrombozyten und Leukozyten an das Endothel der Koronargefäße gehemmt wird. Dies verbessert die Myokardperfusion und trägt damit zu einer Verringerung der Infarktgröße bei [43]. Des Weiteren kann im Rahmen eines Ischämie- und Reperfusionsschadens der Leber durch Präkonditionierung mit Sevofluran der Parenchymschaden sowie die Infiltration proinflammatorischer Granulozyten in das Lebergewebe vermindert werden [44].

Zudem wurde beschrieben, dass die gezielte Ventilation mit inhalativen Anästhetika zur antiinflammatorischen Therapie einer akuten Lungenschädigung im Rahmen systemischer Inflammation beitragen kann. Dabei wird die pulmonale Inflammation durch Reduktion der Transmigration von aktivierten Granulozyten in das Alveolarinterstitium gesenkt [45]. In einem murinen Modell der systemischen Inflammation konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Inhalation von Sevofluran die Mortalität sowie die Morbidität verursacht durch Schädigung des Leber- und Nierenparenchyms senken kann [46].

Der genaue Mechanismus dieser antiinflammatorischen Wirkungen konnte jedoch bis heute nicht vollständig erklärt werden. Als ein potentieller Mechanismus der Organprotektion wurde die Interaktion von volatilen Anästhetika mit Adenosinrezeptoren im Rahmen der myokardialen Ischämie postuliert [42].

1.3 Adenosin und Adenosinrezeptoren

1.3.1 Das Signalmolekül Adenosin

Das Nukleosid Adenosin stellt neben seiner Rolle als Baustein des Genoms, ein potentes antiinflammatorisches Molekül im Organismus dar. Bereits Anfang des

20. Jhd. wurde diese zusätzliche Funktion von Adenosin als Vermittler extrazellulärer Signale beschrieben. Hierbei lag der Schwerpunkt der Forschung besonders auf der Wirkung von Adenosin auf die Koronargefäße und das Reizleitungssystem des Herzens [47]. Daraufhin wurde Adenosin zur Senkung der Herzfrequenz bei supraventrikulären Tachykardien und zur Vasodilatation der Koronargefäße für kardiologische Interventionen im klinischen Alltag verwendet [48]. In weiterführenden Studien wurde anschließend eine „Alarm-Funktion“ von extrazellulär zirkulierendem Adenosin beschrieben. Erhöhte Adenosin-Plasmaspiegel treten besonders als Folge von Parenchymschäden oder metabolischen Störungen während systemischer Inflammation und Ischämie-Reperfusionsszenarien auf [49]. Durch metabolischen Zellstress oder direkte Parenchymschäden wird vermehrt ATP bzw. ADP in den Extrazellularraum über equilibrative Nucleosidtransporter (ENT's) oder direkt aus nekrotischen Zellen freigesetzt. Diese Moleküle werden anschließend über die plasmatische Ektonucleotidase (CD39) in AMP und über die 5'Ektonucleotidase (CD73) in Adenosin umgewandelt [50]. Freies Adenosin wird im physiologischem Milieu sofort aus dem Extrazellularraum über ENT's in umgebende Zellen aufgenommen und dort metabolisiert. In pathophysiologischen Situationen, wie Zellstress oder Ischämie, besteht ein Überschuss an freiem Adenosin, welcher die Kapazität der ENT's übersteigt. Somit steigt die Konzentration im Extrazellularraum an [50]. Unter diesen Bedingungen kann endogenes Adenosin über die Bindung an Adenosinrezeptoren antiinflammatorische Effekte, wie z.B. eine Hemmung der Aktivierung von Thrombozyten und Leukozyten, vermitteln [51, 52].

1.3.2 Adenosinrezeptoren

Bis zum heutigen Tag konnten 4 verschiedene Adenosinrezeptoren beschrieben werden: Adora1, Adora2a, Adora2b und Adora3. Diese Rezeptoren gehören zu der Klasse der G-Protein gekoppelten Rezeptoren und induzieren bzw. hemmen intrazelluläre Signalkaskaden [49].

Eine wichtige Rolle in der antiinflammatorischen Wirkung von Adenosin spielt dessen Interaktion mit Adora2a und Adora2b, wobei insbesondere Adora2b bei

Einleitung

pathologisch hohen Adenosinkonzentrationen im Plasma aktiviert werden kann [49]. Über die Bindung von Adenosin an Adora2b wird über ein stimulierendes G-Protein das membranständige Enzym Adenylatcyclase aktiviert und dadurch die intrazelluläre Konzentration von zyklischem AMP (cAMP) angehoben. Ein Beispiel für die Wirkung Adenosin vermittelter Signale auf Thrombozyten ist die cAMP-induzierte Hemmung des aggregationsvermittelnden P_2Y_{12} -Rezeptors auf Thrombozyten, was zu einer Reduktion der Thrombozytenaggregation führt [51, 53, 54].

Die Aktivierung von Adora2b auf Granulozyten führt zudem zu einer reduzierten Adhäsion und Transmigration dieser Entzündungszellen in das umliegende Gewebe. Diese Mechanismen tragen zu einer geringeren Gefäß- und Parenchymschädigung in pathologischen Situationen bei [52].

Des Weiteren wurde in murinen Knock-out Modellen die antiinflammatorische Wirkung von Adora2b genauer charakterisiert. Durch Adora2b^{-/-} wurde eine gesteigerte Inflammation des Gefäßendothels und vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen festgestellt. Zudem kam es zu Störungen der Mikrozirkulation durch gesteigerte Gefäßpermeabilität und vermehrter Thrombozytenaggregation in diesem Setting [53, 54]. Adora2b-Defizienz hatte außerdem Auswirkungen auf die Aktivierung von Granulozyten. Hierbei wurde eine gesteigerte Endotheladhäsion und erhöhte Transmigration proinflammatorischer Granulozyten in das umliegende Gewebe beobachtet [54]. Im Rahmen von Ischämie-Reperfusionereignissen in Myokard und Leber sowie in Modellen der systemischen Inflammation zeigten Adora2b^{-/-} Tiere einen stärker ausgeprägten Parenchymschaden. Daraufhin wurde postuliert, dass Adora2b protektiv im Rahmen von IR und systemischer Inflammation agiert [50, 55, 56]. Diese Hypothese stärkend wurde beobachtet, dass eine gesteigerte Expression von Adora2b im Parenchym während Hypoxie und Inflammation auftrat [54].

1.4 Extrakorporale Zirkulation

1.4.1 Einsatz und Aufbau extrakorporaler Zirkulation

Extrakorporale Zirkulation wird heutzutage hauptsächlich in Form von Herz-Lungen-Maschinen für umfangreiche herzchirurgische Eingriffe am offenen Herzen und den großen herznahen Gefäßen, wie z.B. Operationen der Aorta oder während Korrekturen kongenitaler Herzfehler eingesetzt [57].

Die Etablierung eines Systems, welches sowohl die Herz- als auch die Lungenfunktion für derartige Eingriffe temporär überbrücken kann, erfolgte durch den Chirurgen John Gibbon. Der erste erfolgreiche Einsatz der Herz-Lungen-Maschine revolutionierte 1953 die Möglichkeiten der Herzchirurgie [58, 59]. Das Prinzip einer Herz-Lungen Maschine beruht auf einer fortlaufenden Aufrechterhaltung des Kreislaufes und Oxygenierung des Blutes außerhalb des Körpers. Über eine Kanüle im rechten Vorhof gelangt venöses Blut in ein venöses Reservoir. Von dort aus wird das Blut über einen Oxygenator transportiert. In diesem wird das Blut mit Sauerstoff angereichert und von Kohlendioxid befreit. Anschließend gelangt das oxygenierte Blut über verschiedene Filter in ein ebenfalls kanülierte arterielles Blutgefäß, wie z.B. die Aorta ascendens und damit zurück in den Körperkreislauf [60].

In der Intensivmedizin wird die EKZ im Rahmen von mechanischer Kreislaufunterstützung (ECLS) und extrakorporaler Oxygenierung (ECMO) zur Unterstützung von Herz- und Lungenfunktion während schwerwiegender Erkrankungen verwendet.

Um thrombotische Komplikationen zu vermeiden, ist während der EKZ eine obligate Antikoagulation mit Heparin erforderlich. Zusätzlich kann leichte bis moderate Hypothermie (<25°C) bei bestimmten Indikationen eingesetzt werden, um die Ischämietoleranz lebenswichtiger Organe zu verlängern [57].

1.4.2 Komplikationen während extrakorporaler Zirkulation

Trotz der bereits beschriebenen Maßnahmen und der Tatsache, dass die Möglichkeit der extrakorporalen Zirkulation eine wesentliche Verbesserung der

Prognose herzchirurgischer und intensivmedizinischer Patienten bedeutet, kann es während der Anwendung der EKZ zu Komplikationen kommen. So kann die EKZ ein systemisches Inflammationssyndrom induzieren, welches zu einer Verschlechterung der Prognose intensivmedizinischer Patienten führen kann.

Hierbei gibt es mehrere Auslöser: Der Kontakt des Blutes und dessen zellulären Bestandteilen mit Fremdoberflächen der EKZ, das chirurgische Trauma während der Implantation und Ischämie-Reperfusionsschäden von Lunge und Herz [61]. Diese pathologischen Prozesse führen wie bereits beschrieben zu einer Aktivierung und Interaktion von Thrombozyten und Leukozyten. Der Kontakt zellulärer Blutbestandteile mit Fremdoberflächen und auch therapeutische Hypothermie während EKZ verursachen u.a. eine gesteigerte Thrombozytenaktivierung. Durch die gesteigerte Aktivierung ist eine vermehrte Expression von P-Selektin auf der Oberflächenmembran von Thrombozyten zu beobachten. P-Selektin führt anschließend, wie bereits beschrieben, zu einer vermehrten Interaktion und Aktivierung von Leukozyten, Thrombozyten und Endothelzellen. Zusätzlich kommt es zu einer gesteigerten Sekretion proinflammatorischer Zytokine aus thrombozytärer Granula in die Zirkulation [61, 62]. Durch EKZ werden zudem neutrophile Granulozyten rekrutiert und aktiviert. Dadurch kommt es zur Freisetzung proinflammatorischer Granula und zur Hochregulierung der Expression von Adhäsionsmolekülen, wie z.B. dem leukozytären Integrin Mac-1 [63]. Zu einer weiteren Steigerung der systemischen Inflammation trägt die Freisetzung prokoagulatorischer Mediatoren, welche trotz der Antikoagulation mit Heparin während EKZ in die Zirkulation gelangen bei [61]. Schlussendlich führen diese Komplikationen zu einer systemischen Inflammationsreaktion, welche wiederum zu einer gesteigerten Morbidität und Mortalität intensivmedizinischer Patienten führen kann.

1.5 Ischämie Reperfusionsschaden der Leber

Schädigungen der Leber durch Ischämie- und Reperfusionseignisse treten vor allem in Folge von Lebertransplantationen, Leberresektionen oder

Teilresektionen auf. Zusätzlich können solche Gewebeschädigungen aber auch durch Minderperfusion des Leberparenchyms bei hämorrhagischen Schockereignissen oder im Rahmen eines Kreislaufstillstandes entstehen. Ein Hypoxie- oder IR-Schaden der Leber ist eine gefürchtete Komplikation, da sie schlussendlich mit einem letalem Multiorganversagen intensivmedizinischer Patienten assoziiert sein kann [64, 65].

1.5.1 Pathogenese

Es können zwei Arten von IR-Schäden klassifiziert werden: „Warme“ IR Schädigung sowie „kalte“ IR Schädigung. „Warme“ Ischämie entwickelt sich vor allem bei Leberresektionen sowie während eines hämorrhagischen Schocks durch Verminderung der hepatischen Gewebepfusion. Dahingegen entsteht „kalte“ Ischämie insbesondere durch eine gekühlte extrakorporale Lagerung des Organs, welche während Lebertransplantationen nötig ist [64].

Die Entwicklung des Gewebeschadens ist ein dynamischer Prozess, wobei primär eine lokale Hypoxie des Gewebes zu einer Zerstörung des Parenchyms und damit zu einer Freisetzung proinflammatorischer Moleküle, wie z.B. ATP oder DAMPS's führt. Sekundär wird durch Reperfusion des zuvor ischämischen Gewebes eine sterile inflammatorische Immunantwort induziert. Dabei kommt es direkt in der frühen Reperusionsphase zu einer Rekrutierung und Akkumulation von Immunzellen und zur Ausschüttung proinflammatorischer Mediatoren, welche die Immunabwehr aktivieren [65]. Hepatische Immunzellen, wie z.B. Kupffer Zellen, setzen zusätzlich proinflammatorische Mediatoren, reaktive Sauerstoffspezies und TNF α frei. Dies führt zu einer verstärkten Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle und damit zur Rekrutierung und Migration neutrophiler Granulozyten in das umliegende Gewebe [66, 67]. Die Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden über die Erkennung freigesetzter DAMPS's durch TLR auf Immunzellen potenziert die inflammatorische Antwort im Lebergewebe u.a. über eine vermehrte Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine. Durch Nekrose bzw. Apoptose freigesetztes ATP trägt zusätzlich zur Steigerung der vaskulären Inflammation und der Rekrutierung von Immunzellen bei [65].

In Anwesenheit aktivierter Kupffer Zellen und Leukozyten kommt es zu einer gesteigerten Thrombozytenaktivierung und -aggregation. Thrombozyten adhärieren an das hepatische Endothel und potenzieren aktiv die inflammatorische Immunantwort. Dies ist ein wichtiger Pathomechanismus der Entstehung von Organdysfunktion [68]. Unabhängig davon kommt es zu einer Freisetzung der Granula aktivierter Thrombozyten und über Interaktionen mit Granulozyten zur Formierung proinflammatorischer TGK. Diese können wiederum durch Transmigration in das Parenchym gelangen und dort Zellschäden verursachen [65].

Im Gegensatz dazu wird eine potenzielle Rolle von Thrombozyten während der Regeneration des Lebergewebes diskutiert. Hierbei kommt es zu einer Freisetzung von Serotonin durch Thrombozyten, welches als mitogener Faktor für Hepatozyten agiert [68]. In Folge der beschriebenen Pathomechanismen kann aus einer lokalen IR Schädigung der Leber mittels Verteilung proinflammatorischer Zytokine und Zirkulation von Komplexen aus Immunzellen und Thrombozyten im gesamten Organismus ein systemischer Inflammationsvorgang entstehen.

1.6 Fragestellung dieser Arbeit

Das systemische Inflammationssyndrom ist bis heute eine der Hauptursachen für gesteigerte Morbidität und Mortalität intensivmedizinischer Patienten. Verschiedene Szenarien wie z.B. die Aktivierung zellulärer Blutbestandteile durch Kontakt mit Fremdoberflächen innerhalb der EKZ oder IR-Ereignisse können eine systemische Inflammation induzieren. Im Extremfall kann SIRS mit einem lebensbedrohlichen Multiorganversagen assoziiert sein.

Hierbei spielt besonders die systemische Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und Mediatoren, sowie die Interaktion und Aktivierung von Thrombozyten und Leukozyten eine zentrale Rolle. Diese verursachen Schäden am Gefäßendothel und durch transendotheliale Migration auch eine Zerstörung des Parenchyms diverser Organe.

Einleitung

Bis heute gibt es keinen kausalen klinischen Therapieansatz, um diese pro-inflammatorischen Ereignisse während SIRS einzudämmen.

Dem Inhalationsanästhetikum Sevofluran werden antiinflammatorische Eigenschaften zugeschrieben. Jedoch ist der genaue Mechanismus dieses Effektes noch nicht vollständig aufgeklärt. Daher sollte in der vorliegenden Arbeit die Wirkung von Sevofluran auf systemische Inflammationsereignisse während extrakorporaler Zirkulation und IR in der Leber detailliert untersucht werden. Hierbei sollte unter der Kenntnis, dass volatile Anästhetika mit Adenosinrezeptoren interagieren können, untersucht werden, ob die antiinflammatorischen Eigenschaften von Sevofluran potenziell über Adenosinrezeptoren vermittelt werden. Hierzu wurden die Effekte von Sevofluran in einem Modell der extrakorporalen Zirkulation sowie in einem murinen Modell der Leber IR untersucht.

Da Adora2b besonders bei pathologisch hohen Adenosinkonzentrationen im Extrazellularraum, wie z.B. während Inflammation aktiviert wird, wurde der Fokus der vorliegenden Arbeit auf diesen Rezeptor gesetzt. Um Adora2b als potenzielle Zielstruktur für die antiinflammatorische Wirkung von Sevofluran zu identifizieren, wurde dieser Rezeptor einerseits pharmakologisch mit einem Adora2b Antagonisten als auch durch den Einsatz von Adora2b^{-/-} Tieren in den jeweiligen Modellen blockiert und die Wirkung der Sevofluranapplikation evaluiert. Um einen weiteren potenziellen Signalweg der protektiven Eigenschaften von Sevofluran näher zu betrachten, wurden in das murine Modell der Leber IR zusätzlich Adora2a^{-/-} Tiere integriert.

Folgende Fragestellungen wurden untersucht:

- Welchen Einfluss hat das volatile Anästhetikum Sevofluran auf die ADP-induzierte Interaktion und Aktivierung von Thrombozyten und Leukozyten in Humanblut in vitro?
- Wie wirkt Sevofluran auf die Aktivierung und Interaktion von Thrombozyten und Leukozyten während extrakorporaler Zirkulation und welche Rolle spielt der Adenosinrezeptor Adora2b in diesem Setting?

Einleitung

- Wie wirkt Sevofluran auf die Aktivierung und Interaktion von Thrombozyten und Leukozyten während Leber IR in der Maus und welche Rolle spielt der Adenosinrezeptor Adora2b in diesem Setting?
- Kann Sevofluran protektive Eigenschaften auf die Interaktion von Thrombozyten und Leukozyten während Leber IR über weitere Signalwege, wie z.B. Adora2a, vermitteln?
- Kann Sevofluran protektiv auf die Schädigung des murinen Leberparenchyms durch IR wirken und wird dieser potenziell antiinflammatorische Effekt über Adora2b vermittelt?
- Wie wirkt sich die Applikation von Sevofluran auf die Expression von Adora2b in murinem Lebergewebe aus?

Insgesamt sollten durch die Erforschung des Mechanismus der antiinflammatorischen Wirkung von Sevofluran während systemischer Inflammation potenzielle neue Ansatzpunkte für klinische Strategien in der Therapie des SIRS evaluiert werden.

2 Material und Methoden

Dieses Kapitel beinhaltet eine detaillierte Beschreibung der verwendeten Methoden und eine tabellarische Auflistung der Verbrauchsmaterialien, Reagenzien sowie der Laborausstattung.

2.1 Modell der Thrombozyten-Granulozyten Komplexbildung in vitro

2.1.1 Blutabnahme für in vitro Versuche

Gesunde freiwillige männliche Probanden im Alter von 18-40 Jahren wurden unter Ausschluss einer Medikamenteneinnahme innerhalb 14 Tage vor der Blutspende (insbesondere Einnahme von Acetylsalicylsäure) für die Versuche aufgeklärt und rekrutiert. Ferner waren Tabakkonsum, Infektionskrankheiten und Drogenkonsum ein Ausschlusskriterium für die Teilnahme an dieser Studie. Nach Einverständniserklärung der Probanden erfolgte die Entnahme von venösem Vollblut intrakubital mit einer Butterfly Kanüle (Safety Multifly Kanüle 21G: Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) über einen Multiadapter in Citrat-Monovetten (S-Monovette Citrat 9ml: Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland). Dabei wurde besonders darauf geachtet, keine abnahmebedingte Aktivierung der Thrombozyten durch intensive Stauung oder Scherkräfte während der Blutabnahme hervorzurufen. Die Blutentnahmen zur Durchführung dieser Studie wurden zuvor von der Ethik-Kommission der Universität Tübingen genehmigt (Nr.: 168/2013BO2).

2.1.2 Stimulation von Humanblut mittels ADP

Um die Aktivierung und Interaktion von Thrombozyten und Leukozyten in vitro zu simulieren, wurde Blut freiwilliger Probanden mit dem Thrombozytenaktivator ADP stimuliert. Dazu wurde 100µl Humanblut in separaten Ansätzen jeweils mit 1µM PGE₁ (Prostaglandin E₁: Sigma, Hamburg, Deutschland) als

Material und Methoden

Positivkontrolle versetzt bzw. mit 5µl Sevofluran (Baxter, Deerfield, IL, USA) gesättigt. Nach 5 min Inkubation im geschlossenen Milieu wurde 2µM ADP (Moelab, Langenfeld, Deutschland) zu den Ansätzen hinzugegeben und für 10 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde jeweils 9,5µl der folgenden Antikörpermischung zu den Ansätzen hinzugegeben und diese für weitere 20 min bei 37°C inkubiert:

- 2,5µl FITC-markierter anti-CD41 (IM17564U: Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland)
- 1,5µl PE-markierter anti-CD62P (348107: BD, Heidelberg, Deutschland)
- 1,5µl PerCP-markierter anti-CD45 (IM2653U: Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland)
- 2,5µl PE-Cy7-markierter anti-CD66b (25-0666-42: eBioscience, Frankfurt, Deutschland)
- 1,5µl BV421-markierter anti-CD11b (30132: Biolegend, San Diego, CA, USA)

Daraufhin wurden die Proben mit 2ml BD 1x Lysepuffer (BD, Heidelberg, Deutschland) für 5 min lysiert und anschließend abzentrifugiert (5 min, 2000g, RT). Nach einem Waschschrift mit PBS wurde das gewonnene Zellpellet in 500µl 1x BD Cell Fix (BD, Heidelberg, Deutschland) resuspendiert.

2.1.3 Durchflusszytometrische Analysen

Durchflusszytometrie bzw. FACS (= Fluorescence activated cell scan) ist eine Messmethode, mit welcher Zellen funktionell nach Oberflächenmolekülen sowie mittels ihrer Größe und Granularität beurteilt und differenziert werden können. Als Grundlage der Durchflusszytometrie dient u.a. die Fluoreszenzmikroskopie. Bei dieser bereits Mitte des 20. Jhd. entwickelten Methode, werden Oberflächenantigene von Zellen oder Geweben mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern markiert, was die Betrachtung dieser Antigene mittels fluoreszierendem Licht unter dem Mikroskop ermöglicht. Hierdurch können z.B. Oberflächenstrukturen wie Rezeptoren oder Integrine aber auch intrazelluläre Strukturen wie DNS oder RNS dargestellt werden. Zusätzlich macht sich die

Durchflusszytometrie das Prinzip eines Coulter-Zählers zu nutze [69]. Hierbei kann das Zellvolumen einer Zelle, welche zwischen zwei Messelektroden hindurchströmt, durch die entstehende Änderung des elektrischen Widerstands zwischen den beiden Messelektroden bestimmt werden.

Das Durchflusszytometer nimmt die zu untersuchende Zellsuspension über eine Kapillare auf und erzeugt mittels einer Trägerflüssigkeit eine laminare Strömung. Dieses Prinzip der hydrodynamischen Strömung, welches bereits 1969 von Dittrich und Goehde beschrieben wurde, gewährleistet, dass nur vereinzelte Zellen in die Messkammer gelangen können. Durch die Passage eines Laserstrahls in der Messkammer, kann die Größe der Zelle proportional zu der Auslöschung der Lichtintensität entlang der Achse des Laserstrahls beurteilt werden (FSC = Forwardscatter). Diese Signale werden über eine Photodiode und anschließende Umwandlung in ein elektrisches Signal detektiert.

Zusätzlich können auch Aussagen über die Granularität der Zelle mittels ihrer charakteristischen Lichtstreuung getroffen werden. Hierbei wird das gestreute Licht über seitwärts angebrachte Spiegel (= Brewsterspiegel) aufgefangen, über eine Photonen Multiplier Tube (= PMT) verstärkt und detektiert (SSC= Sidwardscatter). Das in dieser Studie verwendete FACS Canto II (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) arbeitet mit drei Lasern, welche jeweils dem Absorptionsmaximum verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe entsprechen (siehe Tabelle 2): blau (488nm), rot (633nm) und violett (405nm).

Die mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern, welche die Oberflächenstrukturen bestimmter Zellen markieren, werden durch die jeweilige Wellenlänge des Lasers angeregt und emittieren daraufhin Lichtsignale mit spezifischer Wellenlänge. Diese Signale werden nach Passage verschiedener Farbfilter und Verstärkung über eine PMT ebenfalls in ein spezifisches elektrisches Signal umgewandelt.

Laser	Exzitation		Fluorochrom	Max. Emission
„blau“	488nm		FITC (Fluorescein Isothiocyanat)	520nm
			PE (R-Phycoerythrin)	578nm
			PerCp (Peridinin Chlorophyll Protein)	678nm
			PE-Cy7 (PE Cyanin-gekoppelt)	785nm
„rot“	633nm		APC (Allophycocyanin)	660nm
„violett“	405nm		BV421 (Brilliant violett 421)	421nm

Tabelle 2: Übersicht der Laserausstattung des FACS Canto II sowie die entsprechenden Fluorochrome mit ihrer maximalen Emission.

Das Durchflusszytometer wurde vor jedem Messvorgang mittels des routinemäßig verwendeten Zytometer-Setups und standardisierten Partikeln (Tracking beads: BD, Heidelberg, Deutschland), wie vom Hersteller empfohlen kalibriert. Zudem müssen vor jeder Messung die Geräteeinstellungen optimal an die zu untersuchende Probe und die Fluoreszenzfarbstoffe angepasst werden (siehe Tabelle 3).

Einstellung	Erklärung
Schwellenwert (= Threshold)	Festlegung eines FSC-Thresholds, um sehr kleine Partikel (z.B. Zelldebris) von der Messung auszuschließen und damit Störsignale zu minimieren. Es kann auch ein Schwellenwert für die Fluoreszenz-intensität eines Fluorochroms festgelegt werden, um mögliche Auto-fluoreszenz auf unter 1% zu senken.
PMT's und Photodiode	Einstellung der Spannung der PMT's und der Empfindlichkeit der Photodiode, um optimale Signale für FSC bzw. SSC und Fluoreszenz zu erhalten.
Darstellung	Darstellung der Signale in linearer bzw. logarithmischer Skala. Die logarithmische Skala wird für besonders kleine Objekte verwendet (z.B. Thrombozyten).

Material und Methoden

Kompensation	Bei Durchführung von Multicolor Assays (= mehrere Fluoreszenz-farbstoffe in einer Messung) muss eine Kompensation durchgeführt werden. Durch Überlappung der Emissionsspektren verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe, kann ein spezifisches Fluorochrom in den Messkanal eines anderen Fluorochroms emittieren und dadurch zur Verfälschung der Messwerte führen. Diese Überlappung wird durch eine Einzelmessung der jeweiligen Fluorochrome und deren Emissionsspektren rechnerisch korrigiert.
Messbereich (= Gate)	Eingrenzung eines bestimmten Messbereiches, um z.B. verschiedene Zellpopulationen zu isolieren.
Flussrate	Die Proben können mit einer Flussrate von 120 µl/min (= Max.) bis zu 10 µl/min (=Min.) gemessen werden.
Aufzeichnung	Festlegung der Ereignisanzahl, welche aufgezeichnet werden soll.

Tabelle 3: Verschiedene Parameter zur Einstellung des Durchflusszytometers an die zu untersuchende Probe und die verwendeten Fluorochrome.

Die Darstellung der Messdaten kann als Punktauftragung (= Dotplot) bzw. als Histogramm erfolgen. Im Dotplot werden jeweils zwei Parameter, z.B. FSC und SSC, dargestellt. Dadurch können einzelne Zellpopulationen nach bestimmten Eigenschaften, wie die Größe und Granularität identifiziert werden. Im Histogramm wird die Häufigkeit der gemessenen Ereignisse meist gegen die relative Fluoreszenzintensität dieser Ereignisse aufgetragen.

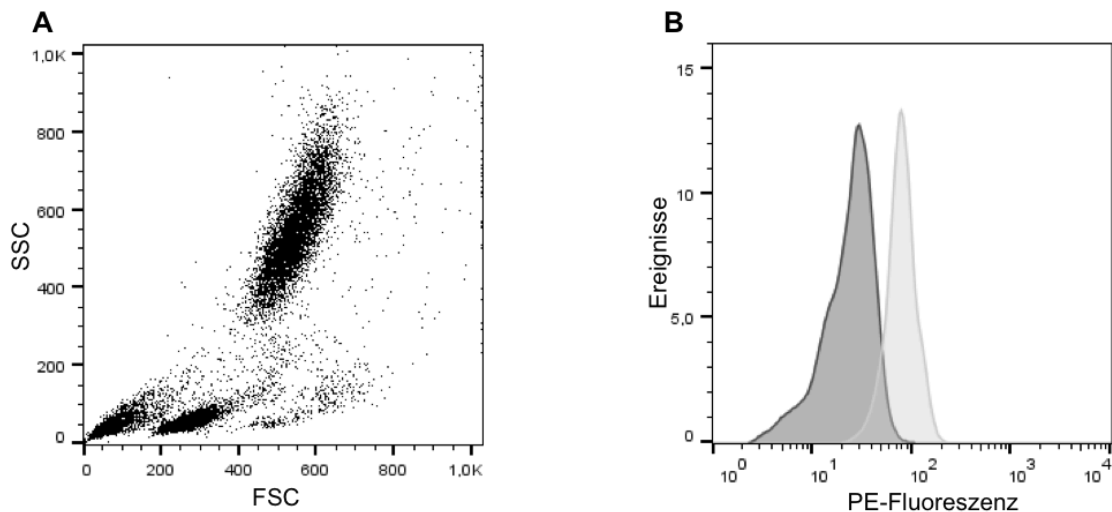


Abbildung 2: Exemplarische Darstellung durchflusszytometrischer Messungen von Leukozyten.

A: Lineare Darstellung einer Punktauftragung von FSC und SSC (= Dotplot). **B:** Darstellung der Verstärkung der PE-Fluoreszenz einer Versuchsgruppe (hellgrau) im Vergleich zu einer Kontrollgruppe (dunkelgrau) in einem Histogramm. Hier wird die Ereigniszahl gegen die Fluoreszenzintensität von PE aufgetragen.

Die Steuerung der Messung und die Aufnahme der Parameter erfolgte mittels BD FACS Diva™ Software (Version 6: BD, Heidelberg, Deutschland). Zur Auswertung der Messergebnisse und zur detaillierten statistischen Analyse wurde FlowJo (Version 9.3.2: Ashland-Oregon, USA) benutzt. Hierbei wird eine festgelegte Gating-Strategie verfolgt. Bestimmte Zellpopulationen werden über ihre Größe bzw. ihre Granularität oder über das Fluoreszenzsignal von zellspezifischen Antikörpern identifiziert. Durch den Vergleich mit einer Kontrollpopulation kann eine Aussage über die Zunahme der Fluoreszenz und damit der verstärkten Präsenz verschiedener Oberflächenstrukturen getroffen werden. Damit kann ein Messbereich festgelegt werden, der als positiv für ein bestimmtes Fluoreszenzsignal gilt. Anschließend kann in diesem Bereich oder innerhalb einer bestimmten Zellpopulation die mittlere Fluoreszenzintensität verschiedener Oberflächenstrukturen berechnet werden. Zudem kann der prozentuale Anteil einer Subpopulation an Zellen bestimmt werden, welche ein positives Fluoreszenzsignal in ihrer Ursprungspopulation besitzen (= Frequency of parent).

„Protokoll 1“: Analyse der ADP-induzierten Thrombozyten-Granulozyten Komplexbildung in vitro

Durch eine durchflusszytometrische Analyse humaner Blutproben wurde die ADP-induzierte Bildung von TGK quantifiziert. Zusätzlich wurde innerhalb dieser Komplexe die Thrombozytenaktivierung mittels der Expression des thrombozytären Aktivierungsmarkers P-Selektin und die Aktivierung von Granulozyten mittels der Mac-1 Expression bestimmt. Die Proben wurden mit einer Flussrate von 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ aufgenommen, um möglichen Scherstress während der Messung zu minimieren. Alle Parameter wurden in einer linearen Skala mit einer Grenzwelle für FSC von 5000 mV aufgenommen. Der Antikörper anti-CD45-PerCP wurde als spezifischer Detektionsmarker für Leukozyten verwendet. Daher wurde zusätzlich eine Grenzwelle für PerCP von 550 mV festgelegt, um eine möglichst störungsfreie Detektion zu gewährleisten. Bei der Messung jeder Probe wurden 10000 Ereignisse aufgezeichnet.

Folgende Strategie wurde zur Identifikation und Quantifizierung der gesuchten Zellpopulationen verfolgt. Als erster Schritt wurde die Population der Leukozyten in einem SSC/FSC Dotplot eingegrenzt. Daraufhin wurde aus dieser Population von CD45-positiven Leukozyten (CD45+) die Granulozytenpopulation isoliert (CD45+/CD66b+). Aus dieser wurden Objekte ausgewählt, welche eine positive FITC-Fluoreszenz des Thrombozytenmarkers CD41 zeigten (CD45+/CD66b+/CD41 High) und als Thrombozyten-Granulozyten Komplexe definiert. Der Aktivierungsstatus von Thrombozyten in diesen Komplexen wurde mittels des Thrombozytenaktivierungsmarkers P-Selektin (= CD62P) detektiert. Dabei wurde die PE-Fluoreszenz von anti-CD62P auf CD41-positiven Objekten aufgezeichnet (CD45+/CD66b+/CD41+/CD62P+). Der Aktivierungsstatus der Granulozyten, welche mit Thrombozyten interagieren, wurde mittels der Fluoreszenz eines Antikörpers gegen Mac-1 (CD45+/CD66b+/CD41+/CD11b+) gemessen (siehe Abbildung 3).

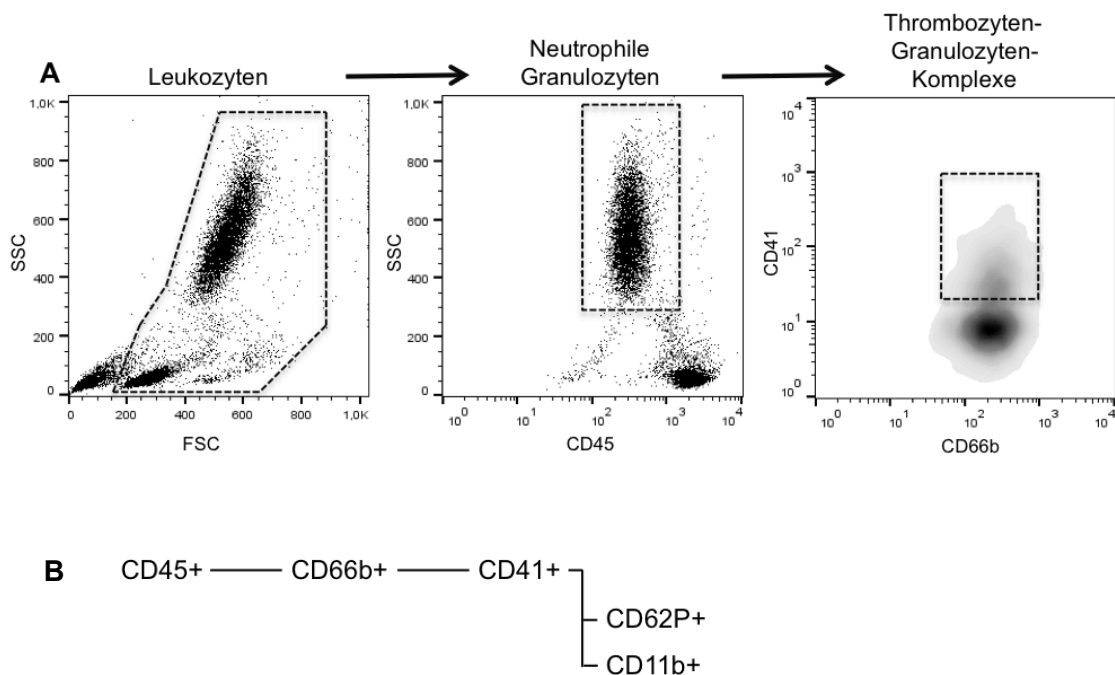


Abbildung 3: Übersicht der Gating-Strategie zur Identifizierung und Charakterisierung von TGK in vitro.

A: Darstellung der Eingrenzung von TGK mittels Dotplots. **B:** Übersicht der Gating-Strategie zur Analyse der Interaktion und Aktivierung von Thrombozyten und Granulozyten.

2.1.4 Darstellung von TGK durch Immunfluoreszenz

Zur Darstellung von TGK wurde erneut Humanblut freiwilliger Probanden mittels ADP aktiviert. Dazu wurde 500µl Humanblut in separaten Ansätzen jeweils mit 1µM PGE₁ (Prostaglandin E₁: Sigma, Hamburg, Deutschland) als Positivkontrolle versetzt bzw. mit 25µl Sevofluran inkubiert (Baxter, Deerfield, IL, USA). Nach 5 min Inkubation im geschlossenen Milieu wurden 2µM ADP (Moelab, Langenfeld, Deutschland) zu den Ansätzen hinzugegeben und für 10 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die neutrophilen Granulozyten mit einem PE-markierten anti-CD15 Antikörper (555402: BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland) gefärbt. Zusätzlich wurden die Thrombozyten mit einem FITC-markierten anti-CD41 Antikörper (IM17564U: Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland) markiert. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei RT wurden die Erythrozyten mit 4ml BD 1x Lysepuffer (BD, Heidelberg, Deutschland) für 5 min lysiert und die entsprechende Probe anschließend

abzentrifugiert (5 min, 2000g, RT). Nach einem Waschschrift mit PBS wurde das Zellpellet in 250µl 1x BD Cell Fix (BD, Heidelberg, Deutschland) und zusätzlich 1ml PBS fixiert und erneut zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in einem Permeabilisierungsmedium resuspendiert (0,1% Triton X-100, 2,0% BSA in PBS, pH=7,4; Sigma, Hamburg, Deutschland) und erneut für 10 min inkubiert. Nach Hinzufügen von 1ml PBS wurde die Zellsuspension zentrifugiert und das entstandene Zellpellet in 20µl Deckmedium, kombiniert mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol: Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) als Gegenfärbung, gelöst. Diese Suspension wurde auf Objektträger aufgetragen und mit einem Deckglas (Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland) konserviert. Die Aufnahmen der Präparate der entsprechenden Gruppen wurden mit einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop (Zeiss CLSM 510: Zeiss, Oberkochen, Deutschland) angefertigt. Hierbei handelt es sich um eine konfokale Lichtmikroskopie, wobei ein fokussierter Laserstrahl das zu untersuchende Objekt in einem Raster abtastet. Die spezifische Wellenlänge des Lasers regt die Antikörper-gekoppelten Fluorochrome zur Emission von Licht an. Durch den konfokalen Aufbau kann das emittierte Licht direkt in einer Ebene mit der Probe detektiert werden. Hierbei wird jeweils nur ein kleiner Bereich der Probe über eine Lochblende beleuchtet und detektiert, was einen besonders hohen Kontrast ermöglicht. Da dadurch kein vollständiges Bild im Mikroskop entsteht wird anschließend ein virtuelles Bild durch digitale Verarbeitung erzeugt (Zen 7.1 Software).

2.2 Modell der extrakorporalen Zirkulation (Chandler Loop)

2.2.1 Aufbau des Modells

Zur Simulation einer Herz-Lungen-Maschine und die damit assoziierte Aktivierung und Interaktion von zellulären Blutbestandteilen wurde ein „Chandler Loop“ EKZ Modell eingesetzt [70]. In diesem Modell wird heparinisiertes Humanblut freiwilliger Probanden in einem PVC Schlauch (ECC noDOP 3/8 x 3/32 inch: Länge 50cm, Raumedic AG; Helmbrechts,

Deutschland), bei konstant 37°C und definierter Drehzahl zirkuliert. Für die Rotation wird der PVC Schlauch mit einer Silikonkappe nahtlos verschlossen. Der PVC Schlauch wird auf eine Walze befestigt, welche durch einen Rotor in Bewegung gesetzt wird. Die Walze befindet sich in einem auf 37°C temperierten Wasserbad, sodass ein optimaler Wärmeaustausch gewährleistet ist. Der Rotor wird auf 60 U/min eingestellt, wodurch der Blutfluss innerhalb der extrakorporalen Zirkulation simuliert wird.

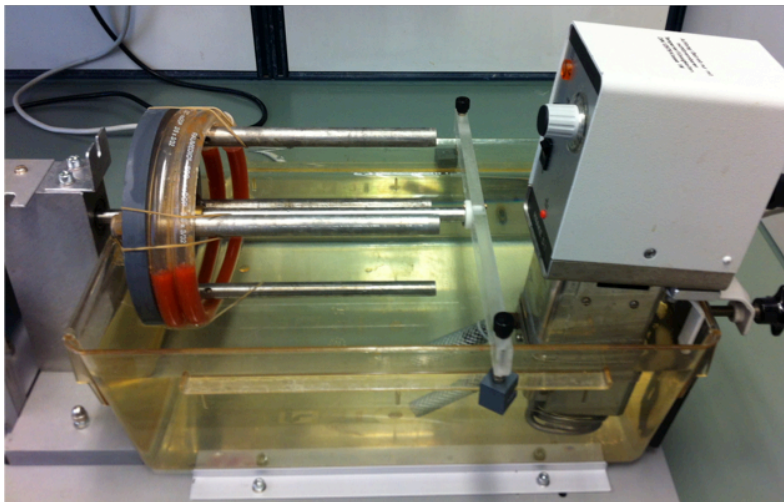


Abbildung 4: Modell der extra-korporalen Zirkulation (Chandler Loop).

Aufbau des verwendeten Modells: Die mit Humanblut gefüllten PVC Schläuche werden in den Chandler Loop, welcher mit 37°C temperiertem Wasser gefüllt ist, eingesetzt und mit Gummibändern fixiert. Ein Rotor gewährleistet eine konstante Rotation von 60 U/min.

2.2.2 Berechnung der Flussgeschwindigkeit

In einer Herz-Lungen-Maschine kann bei erwachsenen Patienten ein Blutfluss von circa 3 L/min erreicht werden [71]. Um diese Flussbedingungen im Chandler Loop zu simulieren wurden folgende Berechnungen durchgeführt:

Durchmesser des PVC Schlauches:	0,95cm
Radius „r“ des PVC Schlauches:	0,48cm
Länge „h“ des PVC Schlauches:	50cm

Material und Methoden

Berechnung des Schlauchvolumens: $V = \pi r^2 \times h$
 $= \pi \times 0,48\text{cm} \times 0,48\text{cm} \times 50\text{cm}$
 $= 36,2\text{cm}^3 = 36,2\text{ml}$

Berechnung des Flusses: Fluss = $36,2\text{ml} \times 60\text{U}/\text{min} = 2,9\text{L}/\text{min}$

2.2.3 Füllung und Lauf des Chandler Loops

Wie bereits beschrieben wurde gesunden männlichen Probanden intrakubital venöses Vollblut unter Vermeidung einer Aktivierung der Thrombozyten und antikoaguliert mit 3IE/ml Heparin (Heparin-Natrium-25000-ratiopharm: ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland) entnommen. Um abnahmebedingte Differenzen zu vermeiden, wurde das Blut aus mehreren Abnahmeröhrchen in einem Becherglas zusammengeführt. Aus diesem Pool wurde eine Probe für das Erstellen eines Ausgangswertes vor dem Lauf für weitere Analysen entnommen.

Folgende Ansätze wurden für den Lauf im Chandler Loop vorbereitet:

- Unbehandeltes Humanblut
- Humanblut + 1mM Sevofluran
- Humanblut + 1mM Sevofluran + Adora2b Antagonist (10 ng/ml [72])

Anschließend wurde unter ständiger Durchmischung 20ml Blut in eine 25ml Stripette aufgezogen. Dabei wurde darauf geachtet, keinen Scherstress auszuüben und keine Luftblasen zu pipettieren. Anschließend wurde das Blut in den vorbereiteten PVC Schlauch pipettiert. Zusätzlich wurde in den jeweiligen Ansatz der Adora2b Antagonist (PSB1115: Tocris Biosciences, Bristol, UK) gegeben und 5 min unter schwacher Zirkulation inkubiert. Daraufhin wurde in die entsprechenden Ansätze mit einer gasdichten Kanüle eine klinisch relevante Konzentration von 1mM Sevofluran [36] in den PVC Schlauch appliziert, welcher dann sofort nahtlos mit einer Silikonkappe verschlossen wurde. Die Schläuche wurden anschließend in den Chandler Loop eingesetzt und mit Gummibändern fixiert. Nun wurde die Zirkulation mit 60 U/min gestartet. Nach 30 min wurde der Lauf beendet und es wurden Proben für weitere Analysen entnommen.

2.2.4 Durchflusszytometrische Analyse

Zur Analyse der Aktivierung und Interaktion von Thrombozyten und Leukozyten nach Zirkulation im Chandler Loop wurde eine durchflusszytometrische Analyse der entnommenen Blutproben durchgeführt. Dazu wurde das Blut mit einer Antikörpermischung versetzt. Für ein Totalvolumen von 30µl, wurden 16µl des Blutes mit 11µl des Antikörpercocktails und 3µl PBS vermischt. Der Antikörpercocktail setzte sich wie folgt zusammen:

- 2,5µl FITC-markierter anti-CD41 (IM17564U: Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland)
- 1,5µl PE-markierter anti-CD62P (348107: BD, Heidelberg, Deutschland)
- 1,5µl PerCP-markierter anti-CD45 (IM2653U: Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland)
- 2,5µl PE-Cy7-markierter anti-CD66b (25-0666-42: eBioscience, Frankfurt, Deutschland)
- 1,5µl APC-markierter anti-CD14 (301808: Biolegend, San Diego, CA, USA)
- 1,5 µl BV421-markierter anti-CD11b (301324: Biolegend, San Diego, CA, USA)

Anschließend wurden die Proben für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation der Antikörper wurden 3µl der Probe entnommen und in 500µl 1x BD Cell Fix (BD, Heidelberg, Deutschland) in Rundbodenröhrchen verdünnt und fixiert. Direkt nach der Inkubation wurden die Proben in einem Durchflusszytometer (FACS Canto II: Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) analysiert.

„Protokoll 2“: Analyse der Thrombozyten-Granulozyten Komplexbildung nach extrakorporaler Zirkulation [73]

Das Durchflusszytometer wurde vor jedem Messvorgang, wie bereits beschrieben, kalibriert. Die Proben wurden mit einer Flussrate von 10 µl/min und in einer logarithmischen Skala mit einer Grenzwelle für FSC von 200

mV aufgenommen. Der Antikörper anti-CD41-FITC wurde als spezifischer Detektionsmarker für Thrombozyten verwendet. Daher wurde zusätzlich eine Grenzwelle für FITC von 300 mV festgelegt. Bei jeder Messung wurden 10000 Ereignisse aufgezeichnet. Um die einzelnen Zellpopulationen genauer zu charakterisieren, wurden mittels Polystyrolpartikeln definierter Größe ($1,7 \pm 0,2\mu\text{m}$, $4,2 \pm 0,2\mu\text{m}$ und $8,9 \pm 0,2\mu\text{m}$; Spherotech, Lake Forest, IL, USA) zwei verschiedene Bereiche in einem FSC/SSC Dotplot festgelegt: Thrombozyten und Komplexe. Dazu wurden die Polystyrolpartikel in FACSflow Lösung verdünnt und homogenisiert. Anschließend wurden die Proben im Durchflusszytometer gemessen und die entsprechenden Messbereiche festgelegt. Dabei wurde die durchschnittliche Größe von Thrombozyten auf $2\text{--}4\mu\text{m}$ definiert (Thrombozyten) [74]. Größere Objekte wurden als Komplexe bezeichnet.

Folgende Strategie wurde verwendet, um die Interaktion und Aktivierung von Thrombozyten und Granulozyten zu identifizieren und zu quantifizieren. Der Aktivierungsstatus von Thrombozyten wurde erneut mittels der PE-Fluoreszenz des Thrombozytenaktivierungsmarkers P-Selektin auf CD41-positiven Objekten detektiert (CD41+/CD62P+). Die Interaktion zwischen Thrombozyten und Leukozyten wurde durch die PerCP-Fluoreszenz des Panleukozytenmarkers anti-CD45 auf der Oberfläche von CD41-positiven Zellen quantifiziert. (CD41+/CD45+). Um die Population der Leukozyten innerhalb der Aggregate genauer zu klassifizieren, wurden innerhalb der CD41+/CD45+ Zellen einerseits Granulozyten durch die PE-Cy7-Fluoreszenz der anti-CD66b positiven Zellen (CD41+/CD45+/CD66b+) und Monozyten durch die APC-Fluoreszenz auf anti-CD14 positiven Objekten (CD41+/CD45+/CD14) differenziert und quantifiziert. Der Aktivierungsstatus der Leukozyten, welche mit Thrombozyten interagieren, wurde mittels der Fluoreszenz eines Antikörpers gegen Mac-1 (CD11b/CD18) bestimmt. Dabei wurde zwischen der CD11b Expression auf Granulozyten (CD41+/CD45+/CD66b+/CD11b+) und Monozyten (CD41+/CD45+/CD14+/CD11b+) differenziert (siehe Abbildung 5).

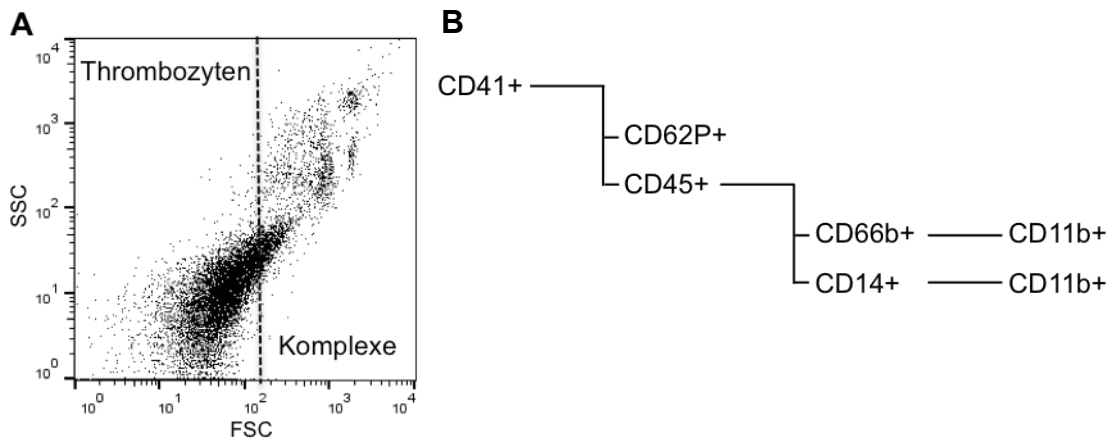


Abbildung 5: Gating-Strategie zur Identifizierung und zur Charakterisierung von TGK im Modell der extrakorporalen Zirkulation.

A: Darstellung der Messbereiche definiert als Thrombozyten und Komplexe mittels FSC/SSC Dotplot. **B:** Übersicht der Gating Strategie zur Untersuchung von TGK und für die Analyse der Aktivierung von Thrombozyten und Leukozyten.

2.3 In vivo Ischämie Reperusionsmodell der Leber in der Maus

Für dieses Tiermodell wurden C57BL/6 und CD1 Wildtyp Mäuse (8-12 Wochen alt, Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland) eingesetzt. In weiteren Versuchsgruppen wurden *Adora2b^{-/-}* und *Adora2a^{-/-}* Tiere (Zucht aus C57BL/6 bzw. CD1 Mäusen [75, 76]) verwendet. Die Mäuse wurden in einen 12-12 h hell-dunkel Tageszyklus bei Raumtemperatur und 60% Luftfeuchtigkeit gehalten. Futter und Wasser waren ad libidum vorhanden. Alle Tierexperimente wurden nach deutschen Tierschutzrichtlinien und Bestimmungen des Universitätsklinikums Tübingen und des Regierungspräsidiums Tübingen durchgeführt. Eine Genehmigung zur Durchführung dieser Versuche wurde zuvor vom Regierungspräsidium Tübingen erteilt (Tierversuchsantrag Nr.: A3/12). Als Basisanästhesie wurde Pentobarbital (70 mg/kg KG: Pentobarbital Natriumsalz, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) intraperitoneal appliziert. Anschließend wurden die Mäuse auf einem 37°C-warmen Wärmetisch (Thermo Scientific, Rockford, Illinois, USA) mit atraumatischen Klebestreifen an den

Extremitäten fixiert. Zusätzlich wurde eine rektale Sonde zur Kontrolle der Körpertemperatur eingebracht.

2.3.1 Leber Ischämie und Reperfusionsmodell

Unter einem Operationsmikroskop (SZX7: Olympus, Hamburg, Deutschland) wurde eine mediane Laparotomie entlang der Linea alba durchgeführt. Anschließend wurden Magen und Duodenum vorsichtig mit einem befeuchteten Wattetupfer aus dem Sichtfeld mobilisiert, bis die Gefäße im Ligamentum hepatoduodenale und der Lobus caudatus der Leber sichtbar wurden. Durch eine Inzision wurde der Lobus caudatus vom linken Leberlappen getrennt. Der rechte Leberlappen wurde mobilisiert bis die lebersorgenden Strukturen, bestehend aus A. hepatica, V. portae und Ductus choledochus, deutlich im Lig. hepatoduodenale sichtbar wurden. Daraufhin wurde nach einem etablierten Modell [77] eine reversible und partielle Ischämie der Leberperfusion erzeugt. Dazu wurde eine Ligatur (7/0, Ethicon, Norderstedt, Deutschland) unter den lebersorgenden Strukturen kaudal der Abzweigung der Blutgefäße des Lobus dexter und Lobus caudatus gelegt und zweifach gekreuzt. Durch das Anhängen von Gewichten an die Fadenenden und durch das anschließende Befestigen des Fadens an einer Haltevorrichtung wurden die blutversorgenden Strukturen unterbrochen und damit eine reversible und partielle Ischämie der Leber erreicht.

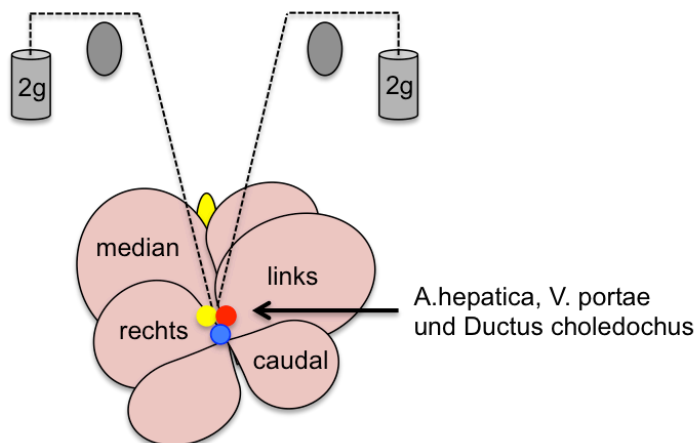


Abbildung 6: Präparation der murinen Leber.

Darstellung des rechten, des medianen, des linken und des kaudalen Leberlappens. Mittig sitzen die lebersorgenden Gefäße (A. hepatica, V. portae) sowie der Ductus choledochus. Diese Strukturen werden durch die Ligatur und das Anhängen von 2g - Gewichten partiell unterbrochen.

Der Lobus dexter und Lobus caudatus waren während dieser Zeit weiterhin durchblutet, um einen venösen Blutrückstau und damit eine potentielle Ischämie des Darmes zu vermeiden. Zur Sicherstellung der Leberischämie wurde eine Abblassung des ischämischen Lebergewebes visuell überprüft. Während der 30-minütigen Ischämiephase wurde die Leber kontinuierlich durch das Abdecken mit befeuchteten Tupfern vor dem Austrocknen geschützt. Nach der Ischämiephase wurden die Gewichte und die Ligatur entfernt und damit die Perfusion der Leber wiederhergestellt. Es folgte nun die Reperfusionphase, welche je nach Versuchsansatz 5 min bzw. 3 h andauerte.

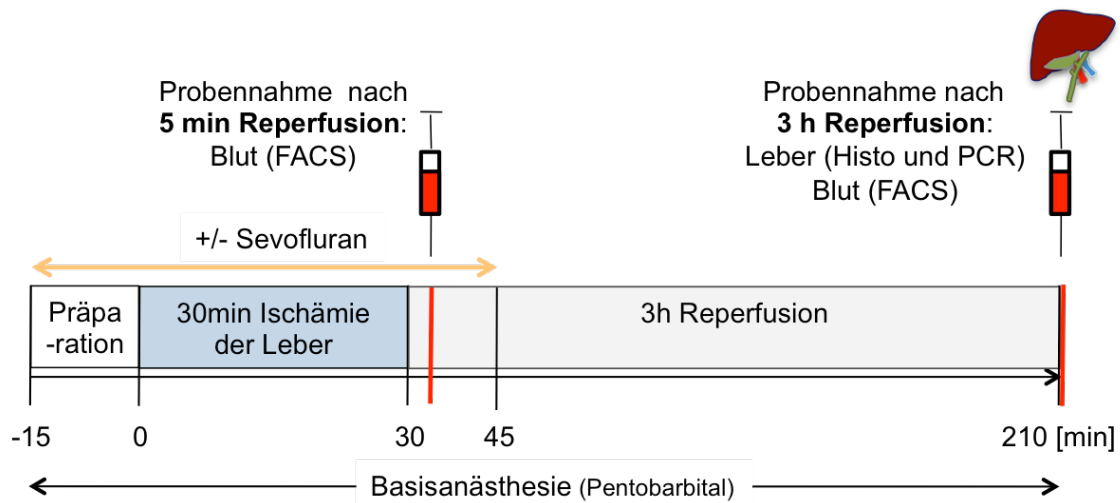


Abbildung 7: Zeitplan des Leber IR Modells der Maus.

2.3.2 Inhalation von Sevofluran

Während der Ischämie- und Reperusionsphase erhielt eine Gruppe von Mäusen zusätzlich zur Basisanästhesie 2 Vol.-% Sevofluran per inhalationem. Die Inhalation startete 15 min vor der Ischämiephase und dauerte insgesamt 1 h an. Dabei inhalierten die Mäuse in Spontanatmung über einen Konus 2 Vol.-% Sevofluran. Sevofluran wurde hierbei über einen Verdampfer (Dräger Vapor Sevofluran: Dräger Medical GmbH, Lübeck, Deutschland) evaporiert und mit Raumluft zu der gewünschten Konzentration 2 Vol.-% in einer Mischeinheit angereichert. Die Abluft wurde direkt über den beschriebenen Konus abgesaugt und entsprechend gefiltert.

2.3.3 Blut- und Organentnahme

Anschließend an die Reperfusionphase wurde für eine Zelldifferenzierung mittels Durchflusszytometrie und für Zytokinanalysen den anästhesierten Tieren Blut entnommen. Die Blutentnahme von 300µl Vollblut erfolgte nach einer Thorakotomie aus der rechten Herzkammer mit einer Kanüle (256x1 Nr.18: BD Microlance, Heidelberg, Germany) und einer mit 10µl Citrat (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) versetzten Spritze (1ml: B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany). Dabei wurde darauf geachtet, keinen negativen Druck zu erzeugen und eine potenzielle Thrombozytenaktivierung zu vermeiden. Ein Teil des mit Citrat antikoagulierten Blutes wurde für die durchflusszytometrische Analyse verwendet. Ungefähr 250µl Vollblut wurde für 10 min bei 2500g und RT abzentrifugiert. Anschließend wurde das gewonnene Plasma separiert und in Flüssigstickstoff schockgefroren. Mit einer weiteren Punktion wurde ungefähr 500µl Blut mit einer unbehandelte Spritze und Kanüle gewonnen. Dieses Blut wurde zur Gewinnung von Serum bei 20000g für 15 min bei 7°C zentrifugiert (Eppendorf 5417R, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland). Das Serum wurde anschließend separiert und bei -80°C schockgefroren. Das Tier wurde in tiefer Narkose mittels zervikaler Dislokation fachgerecht getötet. Anschließend wurden die Organe aus dem Situs entnommen. Der mediane und der linke Leberlappen wurden für die Weiterverarbeitung zu Kryoschnitten in einer Bettungslösung (Tissue-Tek O.C.T.: Sakura Finetek, Leiden, Niederlande) in entsprechende Einbettschälchen (R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik, Emmendingen, Deutschland) gelegt und bei -20°C eingefroren. Die Lagerung bis zur weiteren Verarbeitung erfolgte bei -80°C. Teile der Leber und der Lunge wurden für weitere Analysen in Flüssigstickstoff schockgefroren und ebenfalls bei -80°C gelagert. Die Analysen des entnommen Blutes und der Organe werden im Folgenden genauer beschrieben.

2.3.4 Durchflusszytometrische Analyse

Um eine durchflusszytometrische Analyse der murinen Blutproben durchzuführen wurde das Blut mit einer Antikörpermischung versetzt: 16µl der

Blutprobe wurden mit 13µl des Antikörpercocktails und 3µl PBS vermischt. Der Antikörpercocktail setzte sich wie folgt zusammen:

- 2,5µl FITC-markierter anti-CD42b (M040-1: Emfret, Eibelstadt, Deutschland)
- 1,5µl APC-markierter anti-CD62P (56367: BD, Heidelberg, Deutschland)
- 1,5µl PE-markierter GPIIb/IIIa-aktivierungsspezifischer anti-CD41/CD61 (JON/A; M023-2: Emfret, Eibelstadt, Deutschland)
- 1,5µl PerCp-markierter anti-CD45 (1031321: Biolegend, San Diego, CA, USA)
- 2,5µl PE-Cy7-markierter anti-Ly6G/ Ly6C (108416: Biolegend, San Diego, CA, USA)
- 1,5µl BV510-markierter anti-F4/80 (123135: Biolegend, San Diego, CA, USA)
- 1,5µl BV421-markierter anti-CD11b (101236: Biolegend, San Diego, CA, USA)

Anschließend wurden die Proben für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation der Antikörper wurden 3µl der Probe entnommen und in 500µl 1x BD Cell Fix (BD, Heidelberg, Deutschland) fixiert. Die Proben wurden daraufhin im Durchflusszytometer (FACS Canto II: Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) gemessen.

„Protokoll 3“: Analyse der Thrombozyten-Granulozyten Komplexbildung nach Leber IR in vivo

Es wurden prinzipiell die Einstellungen des Multicolour Assays für humane Blutproben verwendet (siehe Protokoll 2). Da in diesen Messungen ein weiteres Fluorochrom eingesetzt wurde, musste die Kompensation erneut berechnet werden. Die festgelegten Messbereiche wurden zudem an murine zelluläre Blutbestandteile angepasst. Folgende Strategie zur Identifikation von TGK und zur Analyse der Aktivierung der enthaltenen Zellen wurde verfolgt:

Der Antikörper anti-CD42b-FITC wurde als spezifischer Detektionsmarker für murine Thrombozyten verwendet. Der Aktivierungsstatus von Thrombozyten

wurde mittels APC-Fluoreszenz von anti-CD62P auf CD41-positiven Objekten aufgezeichnet (CD41+/CD62P+). Zusätzlich wurde die Aktivierung des thrombozytären Rezeptors GP IIb/IIIa durch die Quantifizierung der PE-Fluoreszenz von anti-GP IIb/IIIa auf CD41-positiven Zellen bestimmt (CD41+/GPIIb/IIIa+). Die Thrombozyten-Leukozyten-Komplexbildung wurde durch die PerCP - Fluoreszenz des Panleukozytenmarkers anti-CD45 auf der Oberfläche von CD41-positiven Zellen quantifiziert. (CD41+/CD45+). Erneut wurde der Gehalt von Granulozyten und Monozyten in den Komplexen genauer bestimmt. Innerhalb der CD41+/CD45+ Zellen wurden die Granulozyten durch anti-CD66b positive Zellen (CD41+/CD45+/ CD66b+) und die Monozyten durch anti-CD14 positive Objekte (CD41+/CD45+/CD14) differenziert und quantifiziert. Die Leukozytenaktivierung in diesen Thrombozyten-Leukozyten-Komplexen, wurde durch die Mac-1 (CD11b/CD18) Expression auf Granulozyten (CD41+/CD45+/CD66b+/CD11b+) oder Monozyten (CD41+/CD45+/CD14+/CD11b+) bestimmt (siehe Abbildung 8).

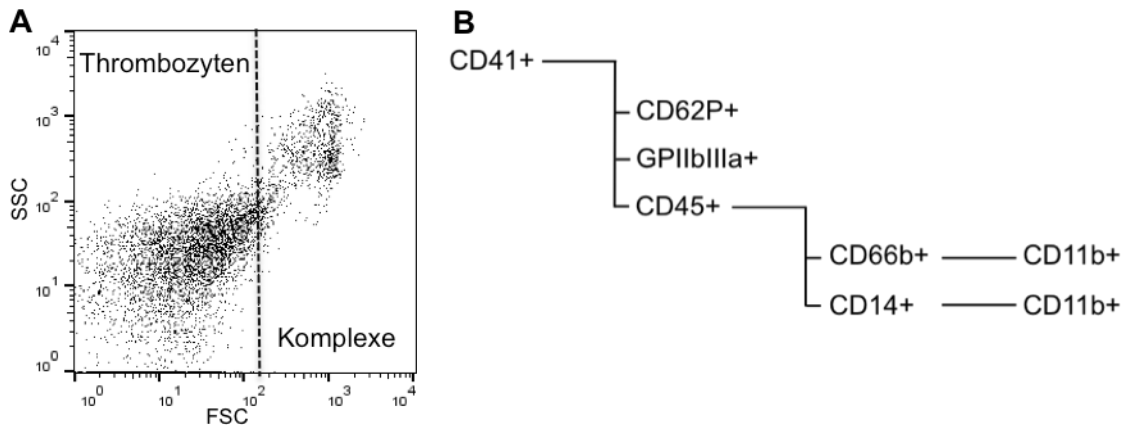


Abbildung 8: Gating-Strategie zur Identifizierung und zur Charakterisierung von TGK im murinen Modell der Leber IR.

A: Darstellung der Messbereiche definiert als Thrombozyten und Komplexe mittels FSC/ SSC Dotplot. **B:** Übersicht der Gating Strategie zur Untersuchung von TGK und für die Analyse der Aktivierung von Thrombozyten und Leukozyten.

2.3.5 Bestimmung von plasmatischen Zytokinen

Zur Quantifizierung von löslichen Zytokinen in murinen Plasmaproben vor und nach Leber IR wurde eine durchflusszytometrische Analyse (Cytometric Bead

Array mouse soluble protein flex set: BD, Heidelberg; Deutschland) durchgeführt. Dabei binden spezifische Partikel das jeweilige Zytokin, worauf die Konzentration der Zytokine mit Hilfe von PE-markierten Detektionspartikeln im Durchflusszytometer (FACS Canto II: Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) bestimmt werden kann.

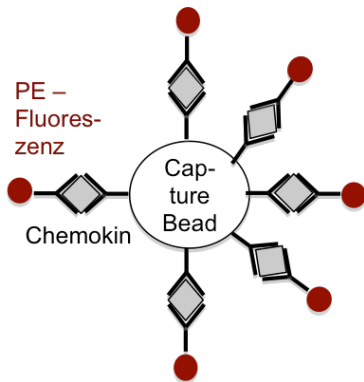


Abbildung 9: Schema der Quantifizierung von Zytokinen mittels Cytometric Bead Array.

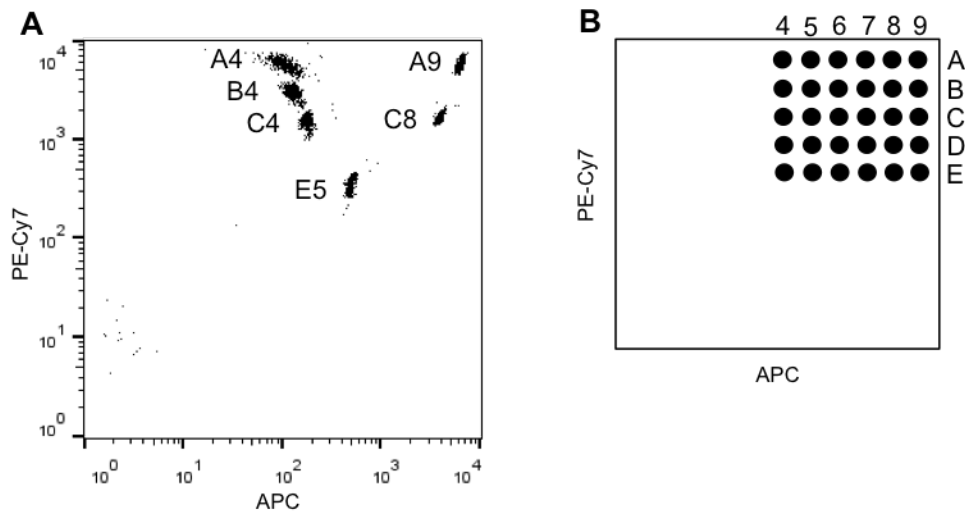


Abbildung 10: Darstellung der Messpositionen der einzelnen Partikel zur Identifikation und spezifischen Konzentrationsbestimmung verschiedener Zytokine mittels Durchflusszytometrie.

A: Darstellung der einzelnen Positionen der jeweiligen Zytokine mittels Dotplot. **B:** Schematische Darstellung der möglichen Positionen im Dotplot zu Messung der verschiedenen Partikel.

Material und Methoden

Folgende Partikel wurden für die Erfassung der jeweiligen Zytokine eingesetzt:

- IL-6 (BD™ CBA Mouse IL-6 Flex Set Position B4)
- KC (BD™ CBA Mouse KC Flex Set Position A9)
- TNF α (BD™ CBA Mouse TNF α Flex Set Position C8)
- IFN γ (BD™ CBA Mouse IFN γ Flex Set Position A4)
- IL-1 β (BD™ CBA Mouse IL-1 β Flex Set Position E5)
- IL-10 (BD™ CBA Mouse IL-10 Flex Set Position C4)

Das Plasma wurde vorsichtig aufgetaut und 1:4 mit PBS gemäß den Vorschriften des Herstellers mit einer Verdünnungslösung verdünnt (Assay Diluent: BD Mouse/ Rat soluble protein master buffer kit-CBA). Die lyophilisierten Standards wurden in einem 15ml Röhrchen zusammengeführt und in 4ml Assay Diluent vorsichtig gelöst (Top Standard). Der Standard ruhte für mindestens 15 min bei RT. Anschließend wurde eine 1:2 Verdünnungsreihe angefertigt in dem 500 μ l des Standards mit jeweils 500 μ l Assay Diluent verdünnt wurden (siehe Abbildung 11 und Tabelle 4).

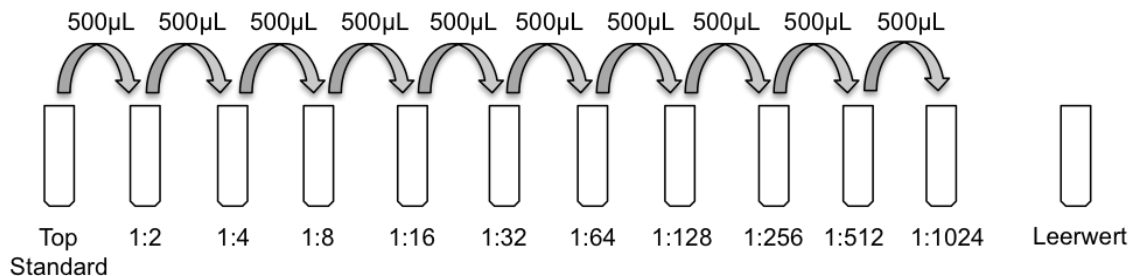


Abbildung 11: Verdünnungsreihe für die Standardkurve zur Bestimmung der Zytokinkonzentrationen.

Standardverdünnung	Konzentration [pg/ml]
Leerwert	0 (Negativkontrolle)
1:1024	2,5
1:512	5
1:256	10
1:128	20

Standardverdünnung	Konzentration [pg/ml]
1:64	40
1:32	80
1:16	156
1:8	312,5
1:4	625
1:2	1250
Top Standard	2500

Tabelle 4: Konzentrationen der Standardreihe der jeweiligen Zytokine zur Anfertigung einer Kalibrierungskurve.

Die Partikel für die Erfassung der einzelnen Zytokine (Capture Beads) liegen in 50x Konzentration vor und müssen je nach Anzahl der Testansätze verdünnt werden. Das Durchflusszytometer wurde mit vorgegebenen Zytometereinstellungen und Parametern des Herstellers kalibriert. Zur Durchführung des Assay wurden 50µl der Standardlösungen in die ersten 10 Röhren in aufsteigender Konzentration pipettiert. Ebenso wurden 50µl der verdünnten Plasmaproben in Röhren gegeben. Nach erneuter Durchmischung der Capture Beads wurden 50µl in jedes Ansatzröhrchen pipettiert und anschließend vorsichtig suspendiert. Nach einer Inkubation von 1 h bei RT wurden in jeden Ansatz 50µl der PE-Detektionspartikel hinzugefügt und erneut durchgemischt. Es folgte eine Inkubation von 1 h abgedunkelt bei RT. Daraufhin wurde 1ml Waschpuffer in jedes Ansatzröhrchen gegeben und die Probe abzentrifugiert (5 min, 200g, RT). Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt. Das Pellet wurde in 300µl Waschpuffer resuspendiert.

Die Proben wurden am selben Tag durchflusszytometrisch gemessen. Dabei wurde die PE-Fluoreszenz der Detektionspartikel der jeweiligen Zytokine quantifiziert. Die Analyse aller Daten erfolgte mittels FlowJo Software (Version 9.3.2, Ashland, Oregon, USA). Nach Abzug des Leerwertes wurden die Zytokinkonzentrationen mit Hilfe der Standardkurven für die einzelnen Zytokine in den einzelnen Plasmaproben berechnet. Um Messfehler zu minimieren, wurde aus Doppelbestimmungen der Mittelwert bestimmt.

2.3.6 Enzymatische Analyse der Lebertransaminase ALT

Um den zellulären Schaden des Leberparenchyms genauer zu beurteilen, wurde aus den entnommenen Serumproben der jeweiligen Gruppen die Konzentration der leberspezifischen Transaminase ALT (Alanin-Aminotransferase), welche bei Parenchymschäden aus nekrotischen Zellen in die systemische Zirkulation freigesetzt wird, bestimmt. Der Gehalt des Serumenzyms in den Proben wurde dabei durch die photometrische Bestimmung eines Farbkomplexes, wie vom Hersteller beschrieben, quantifiziert (TECO Diagnostics, Anaheim, CA, USA). Der Farbkomplex entsteht hierbei durch die Reaktion des Reagenz mit einem durch ALT synthetisierten Molekül. Für die ALT Bestimmung wurden die Proben 1:2 mit PBS verdünnt. Die Messung wurde als Doppelbestimmung durchgeführt, zusätzlich wurden Kontrollwerte ohne Substrat und eine Kalibrierungskurve mit bekannter Konzentration eines ALT Kalibrators angelegt. In eine Mikrotiterplatte wurde anschließend 50µl ALT Substrat pro Vertiefung pipettiert und auf 37°C im Brutschrank angewärmt. Der detaillierte Versuchsablauf wird im Folgenden beschrieben:

ALT Messung

Nach dem Anwärmen des ALT Substrates, wurde der ALT Kalibrator (Volumina und Konzentrationen siehe Tabelle) bzw. 5µl der verdünnten Serumproben und 5µl ALT Substrat als Blankowert in die entsprechenden Vertiefungen der Platte pipettiert.

ALT Substrat [µl]	ALT Kalibrator [µl]	ALT Konzentration [U/L]
60	0	0 (Leerwert)
55	5	23
50	10	50
45	15	83
40	20	125

Tabelle 5: Volumen des ALT Substrates bzw. des ALT Kalibrators und dazugehörige Konzentrationen der Kalibrierungskurve für die Messung von ALT.

Die Reagenzien wurden für 1 min vorsichtig gemischt. Es folgte eine Inkubation für 30 min bei 37°C. Anschließend wurden 50µl ALT Farbreagenz zugegeben und für 10 min bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurde 200µl ALT Farentwickler in jeden Ansatz pipettiert und für 5 min bei 37°C inkubiert. Die Proben wurden innerhalb 1 h photometrisch bei 505nm gemessen (GENios microplate reader: Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz).

Anschließend wurde nach Abzug des Blankowertes von den Messwerten die Konzentration von ALT mit Hilfe der angefertigten Kalibrierungskurve in den einzelnen Proben berechnet. Um Messfehler zu minimieren, wurde aus Doppelbestimmungen jeweils der Mittelwert bestimmt, (Magellan Software V5.03: Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz).

2.3.7 Anfertigung von Organschnitten

Der eingebettete mediane und linke Leberlappen wurde bei -20°C in einer Dicke von 5µm geschnitten (Kryotom: Leica, Nussloch, Deutschland; Microtome Blades R 35). Anschließend wurde der Schnitt auf Objektträger (Super Frost Plus (R): Menzel GmbH, Braunschweig; Deutschland) positioniert und getrocknet. Dabei wurden drei Schnitte auf einen Objektträger aufgebracht und dieser bei -20°C gelagert.

2.3.8 IHC Färbung

Um die Sequestrierung von TGK im Lebergewebe zu evaluieren wurden mit den zuvor angefertigten Schnitten der Leber immunhistochemische Analysen durchgeführt. Dazu wurden die TGK im Lebergewebe mittels Vectastain ABC Kit (Linaris-Vector, Wertheim, Deutschland) sichtbar gemacht.

Folgende Antikörper wurden für die Detektion der Thrombozyten benutzt:

- Anti-CD41 Primärantikörper (rabbit anti-mouse; 63983-100: Abcam Inc, Cambridge, MA, USA)
- IgG Kontrolle rabbit normal IgG (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA)
- Biotinylierter goat anti-rabbit Sekundärantikörper (Vector laboratories, Burlingame, CA, USA)

Material und Methoden

Folgende Antikörper wurden für die Detektion der Granulozyten benutzt:

- Anti-Ly6b Primärantikörper (rat anti-mouse; MCA771GA: AbDSerotec, Düsseldorf, Deutschland)
- IgG Kontrolle rat normal IgG (Santa Cruz Biotechnology, Dallas. TX, USA)
- Biotinylierter goat anti-rat Sekundärantikörper (Vector laboratories, Burlingame, CA, USA)

Zur Vorbereitung wurden die Schnitte für 5 min mit einem Methanol/Aceton Gemisch (1:1) auf Eis getrocknet und anschließend mit PBS gewaschen. Daraufhin erfolgte ein Peroxidase-Block durch die Inkubation mit Wasserstoffperoxid (70ml Methanol + 1ml H₂O₂ 30%ig; AppliChem, Darmstadt, Deutschland) für 30 min bei RT. Nach einem Waschschrift mit PBS wurde der Färbereich mit einem Fettstift eingegrenzt (ImmEdge Hydrophobic Barrier Stift: Vector labs, Burlingame; USA). Um unspezifische Bindungen zu verhindern wurde anschließend ein Avidin Block durchgeführt. Die Blockierungslösung bestand aus 1,5ml 0,5%-igem FSGO (verdünnt in PBS); 150µl goat Normalserum (Santa Cruz Biotechnology, Dallas. TX, USA) und 6 Tropfen Avidinblock (Vectastain ABC Kit) Nach einer Inkubation von 1 h bei RT und einem Waschschrift mit PBS wurde der anti-CD41 Primärantikörper gegen Thrombozyten aufgetragen. Negativkontrolle, IgG Kontrolle und die zu untersuchende Probe wurden nach folgendem Schema (siehe Abbildung 12) auf den Objektträger mit jeweils drei Schnitten aufgebracht.

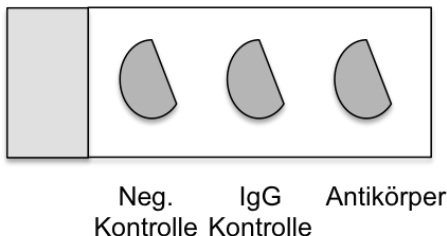


Abbildung 12: Anordnung der verschiedenen Ansätze für die immunhistochemische Darstellung von TGK im Lebergewebe.

Negativkontrolle, IgG Kontrolle und die zu untersuchende Probe (von links nach rechts).

Material und Methoden

Der Primärantikörper wurde in einer Blockierungslösung gegen Biotin 1:500 verdünnt. Diese Blockierungslösung bestand aus 1,5ml 0,5%-igem FSGO; 150µl goat Normalserum und 6 Tropfen Biotinblock (Kit). Ebenso wurde die IgG Kontrolle 1:400 in der Blockierungslösung verdünnt (Endkonzentration 200 µg/ml) und ebenfalls aufgetragen. Als Negativkontrolle wurde die Blockierungslösung verwendet. Die Antikörper wurden über Nacht bei 4°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde nach einem Waschschriff mit PBS der biotinylierte goat anti-rabbit Sekundärantikörper, verdünnt in 0,5%-igem FSGO, aufgetragen. Dazu wurde 1,2ml 0,5%-iges FSGO mit 120µl goat Normalserum und 12µl des Sekundärantikörpers vorsichtig vermischt und auf die Schnitte aufgetragen. Anschließend wurde nach 1 h Inkubation bei RT erneut mit PBS gewaschen und das Vectastain ABC Reagenz aufgetragen. Durch dieses System wird das Signal durch einen Avidin-Biotin Komplex potenziert. Die Schnitte werden dazu für 30 min abgedunkelt bei RT inkubiert und daraufhin gewaschen. Die Entwicklung des Farbkomplexes erfolgt mittels Zersetzung des DAB Substrates durch eine Peroxidase-reaktion. Dazu werden die Schnitte mit der DAB Lösung (1:1 mit H₂O₂; SIGMAFast 3,3'Diaminobenzidine Tabletten: Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) unter mikroskopischer Kontrolle der gewünschten Farbtintensität inkubiert und anschließend sofort mit PBS gewaschen.

Als nächster Schritt wurde eine Co-Färbung der Granulozyten in ähnlicher Weise durchgeführt. Es wurde erneut ein Avidin Block (1,5ml 0,5%-igem FSGO; 150µl rabbit Normalserum und 6 Tropfen Avidinblock (Kit) für 1 h bei RT aufgetragen und anschließend gewaschen. Der zweite Primärantikörper gegen Granulozyten (anti-Ly6b) wurde dabei in einer Blockierungslösung gegen Biotin (1,5ml 0,5%-igem FSGO; 150µl rabbit Normalserum und 6 Tropfen Biotinblock (Kit)) 1:1000 verdünnt und auf die Schnitte pipettiert. Ebenso wurde die IgG Kontrolle 1:400 in der Blockierungslösung verdünnt (Endkonzentration 200 µg/ml) und ebenfalls aufgetragen. Als Negativkontrolle wurde wie bereits beschrieben die Blockierungslösung verwendet. Die Schnitte wurden für 1 h bei RT inkubiert und anschließend mit PBS gewaschen. Es folgte der biotinylierte rabbit anti-rat Sekundärantikörper verdünnt in 0,5%-igem FSGO (1,2 ml 0,5%

FSGO, 120µl rabbit Normalserum, 12µl Sekundärantikörper). Nach 1 h Inkubation bei RT wurde mit PBS gewaschen, das Vectastain ABC Reagenz aufgetragen und für 30 min abgedunkelt bei RT inkubiert und erneut gewaschen. Zur Entwicklung des Farbkomplexes wurden die Schnitte mit Histogreen Lösung (Histoprime: Linaris, Dossenheim; Deutschland), gemäß des Herstellers, unter mikroskopischer Kontrolle der gewünschten Farbtintensität entwickelt und anschließend sofort mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte mit A. dest. gespült und für 5 min mit einem Kernfarbstoff (Nuclear Fast Red solution: Sigma-Aldrich, Saint Louis; USA) gegengefärbt. Nachdem die Schnitte mit PBS gewaschen wurden, folgte zur Entwässerung des Gewebes eine Ethanol-Xylol Reihe (96% Alkohol - 100% Alkohol - 100% Alkohol - Xylol – Xylol; Ethanol absolut: Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA; Xylol: Roth, Karlsruhe, Deutschland). Durch die Abdeckung der Schnitte mit einem Deckmedium (Eukitt quick-hardening mounting Medium: Fluka BioChemika, Buchs, Schweiz) und einem Deckglas (Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland) wurden die Schnitte konserviert.

Die Quantifizierung der Sequestrierung von TGK in der Leber in den verschiedenen Versuchsgruppen wurde mittels manueller Auszählung in drei unabhängigen Bereichen des Lebergewebes, welche in 200-facher Vergrößerung mikroskopisch aufgenommen wurden, durchgeführt (Leica DM IRB: Bensheim, Deutschland; ImageJ Software: National Institute of Health in USA).

2.3.9 Transkriptionsanalyse (rtPCR)

Um eine genauere Aussage über den Effekt von Sevofluran und Leber IR auf die Expression von Adora2b zu treffen, wurde eine Transkriptionsanalyse des relativen Expressionlevels von Adora2b in Lebergewebe der jeweiligen Gruppen durchgeführt. Hierbei wurde zusätzlich zu den bereits beschriebenen Gruppen im Modell der Leber IR eine Kontrollgruppe gebildet. Diese Kontrollgruppe inhalierte wie bereits beschrieben für 1 h 2 Vol.-% Sevofluran zusätzlich zur Basisanästhesie mit Pentobarbital. Nach dieser Inhalationsphase wurde das Tier in tiefer Narkose mittels zervikaler Dislokation fachgerecht

Material und Methoden

getötet und die Leber für histologische Darstellungen und Expressionsanalysen entnommen. Das bei -80°C gefrorene Gewebe wurde unter denaturierenden Bedingungen homogenisiert und die RNS wurde nach Anweisungen des Herstellers mittels Silicagel-Membran Technologie extrahiert (NucleoSpin RNA II: Macherey Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland). Dabei wurde das Gewebe durch Zugabe von β -Mercaptoethanol und das Auftragen auf eine Homogenisierungssäule homogenisiert und lysiert. Anschließend wurde die Bindungseigenschaft der RNS an die Silicagelmembran durch Zugabe von 70%-igem Ethanol optimiert. Nach der RNS-Bindung an die Silicagelmembran wurde die DNS durch DNasen entfernt und die RNS schließlich gewaschen und in RNase-freiem Wasser (Ultra PURE distilled water, DNase, RNase Free: Invitrogen Corp.- Gibco, Carlsbad, CA, USA) von der Säule gelöst.

Aus der gewonnenen RNS wurde durch ein reverse Transkriptase Kit nach Anleitung des Herstellers cDNS synthetisiert (iScript cDNA synthesis Kit: Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland). Hierbei wird ein zur RNS komplementärer cDNS Strang mittels reverser Transkriptase synthetisiert. Von dem hieraus entstandenen RNS-DNS Hybrid wird der RNS-Anteil durch eine RNase verdaut und die DNS-Polymerase I kann anschließend den komplementären Strang zur verbleibenden DNS-Komponente synthetisieren. Die Quantifizierung der Expression des murinen Adora2b in der Leber wurde anschließend mittels rtPCR durchgeführt (iCycler CFX 96: Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland). Als Haushaltsgen (Housekeeping-Gen) wurde zur Kontrolle der ablaufenden PCR Reaktion die ribosomale 18S Untereinheit verwendet.

Folgende Primer wurden verwendet:

Vorwärts-Primer: 5'- GTAACCCGTTGAACCCATT -3'

Rückwärts-Primer: 5'- CCATCCAATCGGTAGTAGCG -3'

Zur Analyse der Regulation von Adora2b im Gewebe wurden folgende Primer verwendet:

Vorwärts-Primer: 5'- GCATTACAGACCCCCACCAA -3'

Rückwärts-Primer: 5'- TTT ATA CCT GAG CGG GAC GC -3'

Folgendes Amplifikationsprotokoll wurde benutzt:

3 min 95°C zur Aktivierung der Enzyme, 10 sek 95°C zur Denaturierung des cDNS Stranges, 15 sek 65°C für das Annealing der Primer und 45 sek 72°C zur Synthese des neuen DNS Stranges durch die DNS Polymerase.

Insgesamt wurden 40 Zyklen von Denaturierung, Annealing und Strangsynthese gefahren. Nach jedem Durchlauf wurde eine Schmelzkurve angefertigt, um über die spezifische Schmelztemperatur T_m des entstandenen DNS-Produkts die Qualität des Laufes zu überprüfen. Die Analyse der Daten erfolgte mittels StepOnePlus rtPCR Software (ABI, Darmstadt, Deutschland) und Prism (Version 5.0: GraphPad Software, San Diego, California; USA).

2.3.10 Immunfluoreszenzfärbung

Um die Präsenz der Adenosinrezeptoren in Lebergewebe zu untersuchen, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung des gewonnenen murinen Lebergewebes durchgeführt.

Ein Teil des Gewebes wurde dazu nach der Entnahme mit physiologischer Kochsalzlösung gespült und anschließend eingebettet. Dadurch wurden autofluoreszierende Erythrozyten aus dem Gewebe größtenteils entfernt. Anschließend wurden, wie bereits beschrieben, 5µm dicke Gefrierschnitte des Gewebes angefertigt. Diese wurden mit einem Methanol/ Aceton (1:1) Gemisch für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde durch das Aufbringen 5%-iger BSA-Lösung in PBS für 45 min unspezifische Bindungsstellen blockiert.

Folgende Antikörper wurden für die Detektion von Adora2b im Gewebe verwendet:

- Anti-Adora2b (sc28996: Santa Cruz, Kalifornien, USA)
- Anti E-Cadherin (sc31021: Santa Cruz, Kalifornien, USA)
- Anti-rabbit Alexa488 Sekundärantikörper für Adora2b (4412: Cell Signaling, Danvers, MA, USA)
- Anti-goat Alexa4594 Sekundärantikörper für E-Cadherin (ab150136: Abcam, Cambridge UK)

Material und Methoden

Der Primärantikörper für Adora2b wurde 1:100 verdünnt auf die Schnitte gegeben, ebenso wie der Primärantikörper gegen E-Cadherin zur Färbung der Gewebestrukturen der Leber. Zusätzlich wurden IgG Kontrollen für Adora2b und E-Cadherin (rabbit anti-mouse IgG-HRP sc358914 und mouse anti-goat IgG-HRP sc2354: Santa Cruz, Kalifornien, USA) und eine Negativkontrolle mit 1%igen BSA in PBS angefertigt. Die Antikörper wurden bei 4°C über Nacht inkubiert. Daraufhin wurden die Schnitte dreifach mit PBS gewaschen und die Sekundärantikörper (1:500 in PBS) auf die Schnitte pipettiert und 1 h abgedunkelt bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte erneut mit PBS gewaschen und mit einem Deckungsmedium (Prolong Gold antifade) kombiniert mit DAPI (Molecular Probes) zur Gegenfärbung der Nuclei konserviert. Die Bildgebung der fluoreszenzmarkierten Schnitte erfolgte wie bereits beschrieben (2.1.4.) mit einem Fluoreszenzmikroskop (Axiophot: Zeiss, Jena, Deutschland) kombiniert mit einer digitalen Kamera (Axio Vision 4.8 Software.)

2.4 Statistik

Alle Daten der in vitro Versuche, sowie die Daten der Versuche mit dem Modell der extrakorporalen Zirkulation sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. Es wurden statistische Analysen mittels one-way ANOVA in Kombination mit einem Bonferronis post-hoc Test durchgeführt. Die in vivo Daten des Modells der Leberischämie und -reperfusion in der Leber der Maus sind als Mediane + IQR dargestellt. Die statistische Analyse dieser Daten erfolgte durch einen Mann Whitney Test bzw. ungepaarten t-test. Ein p-Wert von $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant definiert. Alle statistischen Analysen wurden mit GraphPad Prism (Version 5.0: GraphPad Software, San Diego, California; USA) durchgeführt.

2.5 Verbrauchsmaterialien und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller	Hauptsitz
Aceton	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
BSA (Bovines Serumalbumin)	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Chlorwasserstoff; 0,1N HCl	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Combitips plus; 0,5 ml	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Dulbeccos phosphate buffered saline	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Ethanol absolut	VWR chemicals	Darmstadt, Deutschland
Falcon serologische Pipette 5, 10, 25ml	Becton Dickinson	Franklin Lakes, NJ, USA USA
Fettstift	Invitrogen Corp.- Gibco	Carlsbad, CA, USA
FSGO (Gelatine from cold water fish skin)	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Kanüle 256x1 und 306x1/2	BD Microlance	Heidelberg, Deutschland
Kryoröhrchen; Nunc; 1,8ml	Nunc A/S	Roskilde, Dänemark
Methanol	VWR chemicals	Darmstadt, Deutschland
Mikrotiterplatte Microplate 96-well F-Bottom Clear	Greiner bio-one GmbH	Frickenhausen, Deutschland
Parafilm; M; Verschlussfolie	Pechiney Plastic-Packaging	Chicago, IL, USA
Pipettenspitzen; SafeSeal premium; 10; 100; 1000µl	Biozym Diagnostik GmbH	Hess; Deutschland
Spritze 1ml	B. Braun AG	Melsungen, Deutschland
Teströhrchen, Safe-Lock; 0,5; 1,5; 2ml	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Teströhrchen; PP Cellstar; 15ml	Greiner bio-one GmbH	Frickenhausen, Deutschland
Untersuchungshandschuhe:	Paul Hartmann AG	Heidenheim,

Material und Methoden

Peha-soft nitril white		Deutschland
Wasserstoffperoxid 30%	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Zentrifugen Röhren, Falcon; 50ml	Becton Dickinson	Franklin Lakes, NJ, USA

2.6 Laborausstattung

Bezeichnung	Hersteller	Hauptsitz
Analytische Waage HR-200	A&D Company, Ltd.	Tokyo, Japan
Eismaschine, Scotsman AF10	Infors AG	Bottmingen, Schweiz
Eppendorf Multipette plus	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Eppendorf reference Pipette 0,5-10; 10-100; 100-1000µl	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Eppendorf research Pipette 500-5000µl	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Heraeus Megafuge 10R	Thermo Scientific	Watham, MA, USA
Heraeus Oven	Thermo Scientific	Braunschweig, Deutschland
iCycler	Bio-Rad Laboratories	München, Deutschland
iCycler	Bio-Rad Laboratories	München, Deutschland
Kryotom Leica	Leica	Nussloch, Deutschland
Magellan Software	Tecan Group Ltd.	Männedorf, Schweiz
Operationsmikroskop	Olympus	Hamburg, Deutschland
Photometer	Tecan Group Ltd.	Männedorf, Schweiz
Pipetboy acu	Integra Bio- sciences GmbH	Fernwald, Deutschland
Thermomixer 5436	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Vakuum Pumpe N811 KN.18	KNF Neuberger	Freiburg, Deutschland
Vortex genie 2	Scientific Industries	Bohemia, NY, USA

Material und Methoden

Wärmebad	Memmert GmbH & Co. KG	Schwabach, Deutschland
Wärmetisch	Thermo Scientific	Watham, MA

3 Ergebnisse

Um mögliche Effekte von Sevofluran auf die über TGK vermittelte systemische Inflammation und den Mechanismus dieser potentiellen Wirkung zu identifizieren, wurde in einem ersten Versuchsansatz die antiinflammatorische Wirkung von Sevofluran auf die ADP-induzierte Aktivierung von Humanblut unter in vitro Bedingungen evaluiert (3.1). Anschließend wurde Sevofluran in einem ex vivo Modell der extrakorporalen Zirkulation appliziert (3.2). Unter Kenntnisnahme dieser Ergebnisse, wurde in einem Leber IR Modell der Maus die Wirkung von Sevofluran auf das Inflammationsgeschehen in vivo analysiert (3.3). Hierbei wurde der Effekt des Anästhetikums auf systemische Inflammationsparameter, sowie der Effekt auf IR-vermittelte Parenchym-schädigung untersucht (3.4). Um den genauen Wirkmechanismus von Sevofluran näher zu beleuchten wurden Expressionsanalysen im Leberparenchym durchgeführt (3.5).

3.1 Effekt des Anästhetikums Sevofluran auf die Aktivierung und Interaktion von Thrombozyten und Leukozyten in Humanblut

3.1.1 Analyse des Einflusses von Sevofluran auf die ADP-induzierte proinflammatorische TGK-Bildung

Als erstes Ziel der vorliegenden Studie sollte der Effekt von Sevofluran auf die ADP-induzierte Interaktion von Thrombozyten und Granulozyten mittels Durchflusszytometrie untersucht werden.

Das Nukleosid ADP ist u.a. in der dichten Granula von Thrombozyten gespeichert und wird bei Aktivierung freigesetzt [21]. ADP agiert als Thrombozytenaktivator und bindet an thrombozytäre Purinrezeptoren (z.B. P₂Y₁₂), was eine weitere Thrombozyten-aktivierung und eine gesteigerte Thrombozytenaggregation zur Folge hat [51]. Ein wichtiger Schritt in der Bildung von TGK ist die im Rahmen der Thrombozytenaktivierung entstehende Konformationsänderung des Glykoproteins IIb/IIIa (GP IIb/IIIa) [25]. GP IIb/IIIa kann frei zirkulierendes Fibrinogen binden und über Interaktionen mit Oberflächenproteinen von Granulozyten zu einer Aktivierung und Interaktion von Granulozyten und Thrombozyten führen [21].

Wie bereits in Material und Methoden beschrieben, wurde nach Inkubation von Humanblut mit ADP die Komplexbildung zwischen Thrombozyten und Granulozyten in vitro durchflusszytometrisch analysiert und quantifiziert. Unter diesen Bedingungen wurde auch der Effekt von Sevofluran auf die TGK-Bildung evaluiert. Auch wurde der Effekt des etablierten Thrombozyteninhibitors PGE₁ [78-80] untersucht. Zur Identifikation und Quantifizierung der TGK wurde die Fluoreszenzintensität des spezifischen Granulozytenmarkers CD66b gleichzeitig mit dem Thrombozytenmarker CD41 betrachtet. Zu Beginn wurde eine Blutprobe zur Darstellung von Kontrollwerten entnommen (Abbildung 13; Kontrolle). Nach der Inkubation mit ADP zeigte sich ein signifikanter Anstieg der TGK-Bildung (Abbildung 13; ADP; n=5, One way ANOVA mit Bonferronis post hoc Test, *** p< 0,0005). PGE₁ induzierte eine signifikante Verminderung der Komplexbildung in vitro (Abbildung 13; PGE₁; n=5, One way ANOVA mit

Ergebnisse

Bonferronis post hoc Test, * = $p < 0,05$). Durch die Zugabe von Sevofluran konnte dieser protektive Effekt von PGE_1 , dargestellt durch die signifikante Verminderung der TGK-Bildung in Humanblut, ebenfalls erreicht werden (Abbildung 13; Sevofluran; $n=5$, One way ANOVA mit Bonferronis post hoc Test, ** = $p < 0,005$).

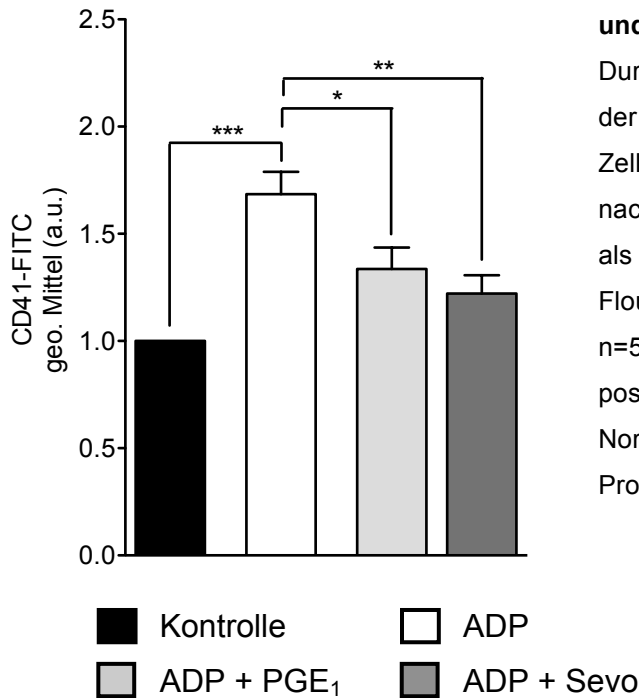


Abbildung 13: Effekt von Sevofluran und PGE_1 auf die TGK-Bildung.

Durchflusszytometrische Quantifizierung der CD45/CD66b/CD41 positiven Zellpopulation in humanen Blutproben nach Aktivierung mittels ADP. Dargestellt als Mittelwert + SEM der Fluoreszenzintensität von CD41-FITC; $n=5$; One way ANOVA mit Bonferronis post hoc Test, *** $p < 0,0005$; Normalisierung: Kontrolle der jeweiligen Probe = 100%.

Zusammenfassend zeigt sich, dass Sevofluran eine durch ADP-induzierte TGK-Bildung in vitro ähnlich dem als protektiv beschriebenen PGE_1 inhibieren kann.

3.1.2 Analyse des Einflusses von Sevofluran auf die ADP-induzierte proinflammatorische Aktivierung von Thrombozyten

Anschließend sollte der Effekt von Sevofluran auf die Bestandteile der ADP-induzierten TGK betrachtet werden. Vorerst wurde das Oberflächenmolekül P-Selektin als Marker für Thrombozytenaktivierung in TGK-gebundenen Thrombozyten analysiert. P-Selektin kann über PSGL-1 an Leukozyten binden, was zu proinflammatorischer Thrombozyten-/ Granulozyten Interaktion führen

Ergebnisse

kann. Vor ADP-Inkubation wurde eine Probe analysiert (Abbildung 14; Kontrolle). Die Thrombozytenaktivierung wurde durchflusszytometrisch mittels der Fluoreszenzintensität von CD62P-positiven Thrombozyten quantifiziert. ADP-Inkubation löste im Vergleich zur Kontrollgruppe eine deutliche Thrombozytenaktivierung aus (Abbildung 14; ADP; n=5, One way ANOVA mit Bonferronis post hoc Test, *** $p < 0,0005$). Die Zugabe von PGE_1 reduzierte diese proinflammatorische Aktivierung nicht signifikant (Abbildung 14; PGE_1 ; n=5, One way ANOVA mit Bonferronis post hoc Test, ns= nicht signifikant). Zusätzliche Inkubation mit Sevofluran konnte dahingegen die ADP-induzierte Thrombozytenaktivierung signifikant hemmen (Abbildung 14; Sevofluran; n=5, One way ANOVA mit Bonferronis post hoc Test, ** = $p < 0,005$).

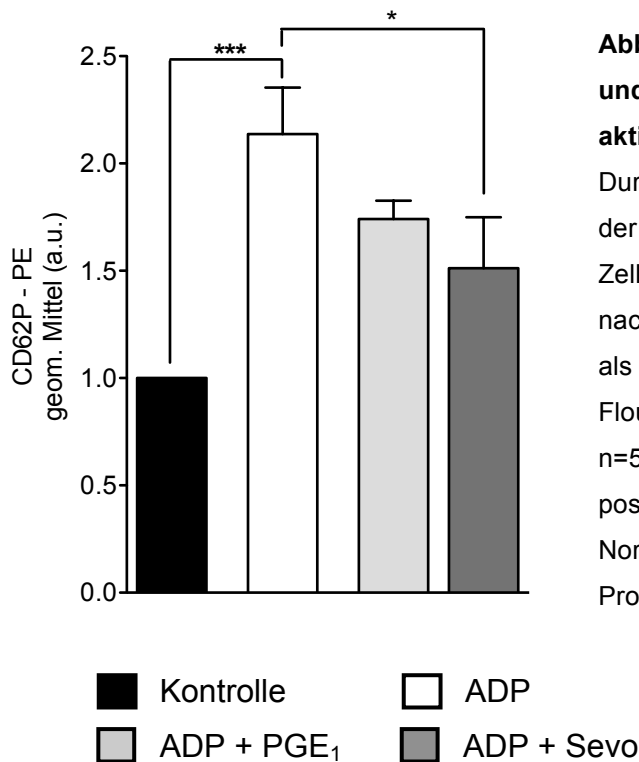


Abbildung 14: Effekt von Sevofluran und PGE_1 auf die Thrombozytenaktivierung.

Durchflusszytometrische Quantifizierung der CD45/CD66b/CD41/CD62P positiven Zellpopulation in humanen Blutproben nach Aktivierung mittels ADP. Dargestellt als Mittelwert + SEM der Fluoreszenzintensität von CD62P-PE; n=5; One way ANOVA mit Bonferronis post hoc Test, *** $p < 0,0005$; Normalisierung: Kontrolle der jeweiligen Probe = 100%.

Zusammenfassend zeigt sich, dass Sevofluran eine Thrombozytenaktivierung in Humanblut dargestellt durch P-Selektin Expression in-vitro inhibieren kann.

3.1.3 Analyse des Einflusses von Sevofluran auf die ADP-induzierte proinflammatorische Aktivierung von Granulozyten

Zusätzlich zu den beschriebenen protektiven Effekten von Sevofluran auf die Thrombozytenaktivierung sollte festgestellt werden, ob ein antiinflammatorischer Effekt hinsichtlich der Granulozytenaktivierung zu finden ist. Hierzu wurde das leukozytäre Integrin Mac-1 (CD11b/CD18), welches ebenfalls zur TKG-Bildung beitragen kann durchflusszytometrisch quantifiziert. Die Intensitätszunahme der Fluoreszenz, und damit die vermehrte Aktivierung von Mac-1 auf TKG-gebundenen Granulozyten, wurde mit einem Kontrollansatz verglichen (Abbildung 15; Kontrolle). Durch die Inkubation mit ADP konnte eine deutliche Erhöhung der Mac-1 Expression erreicht werden (Abbildung 15; ADP; n=5, One way ANOVA mit Bonferronis post hoc Test, * p< 0,05). Die Zugabe von PGE₁ erzielte eine signifikante Hemmung der Mac-1 Expression (Abbildung 15; PGE₁; n=5, One way ANOVA mit Bonferronis post hoc Test, * p< 0,05). Sevofluran führte ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion von Mac-1 auf Granulozyten (Abbildung 15; Sevofluran; n=5, One way ANOVA mit Bonferronis post hoc Test, * p< 0,05).

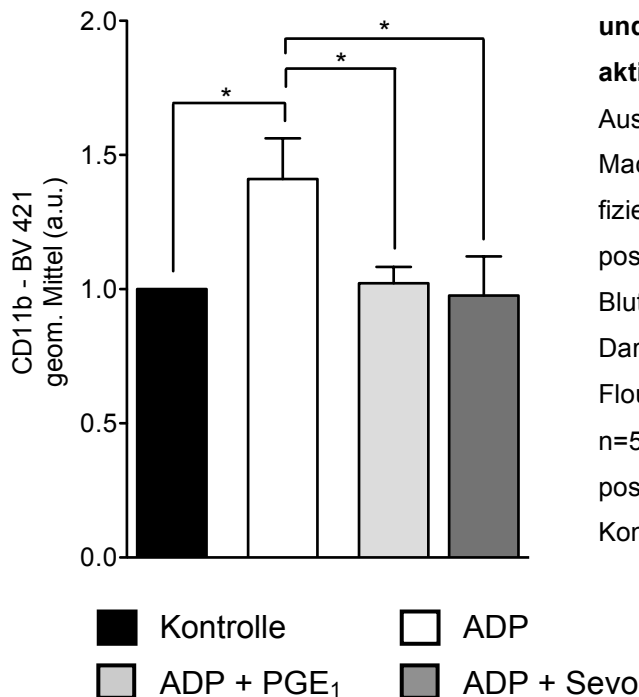


Abbildung 15: Effekt von Sevofluran und PGE₁ auf die Granulozyten-aktivierung.

Ausgedrückt durch die Expression von Mac-1: Durchflusszytometrische Quantifizierung der CD45/CD66b/CD41/CD11b positiven Zellpopulation in humanen Blutproben nach Aktivierung mittels ADP. Dargestellt als Mittelwert + SEM der Fluoreszenzintensität von CD11b-BV421; n=5; One way ANOVA mit Bonferronis post hoc Test, * p < 0,05; Normalisierung: Kontrolle der jeweiligen Probe = 100%.

Zusammenfassend zeigte sich, dass Sevofluran eine Granulozytenaktivierung in Humanblut dargestellt durch die verminderte Expression von Mac-1 (CD11b/CD18) in-vitro ähnlich zu dem als protektiv bekannten Molekül PGE₁ inhibieren kann.

3.1.4 Analyse der Morphologie ADP-induzierter TGK mittels Immunfluoreszenz

Im Weiteren sollte der beobachtete Effekt von Sevofluran auf die TGK-Bildung induziert durch die Zugabe des Aktivators ADP in humanen Blutproben mittels Immunfluoreszenz verifiziert werden. Nach Inkubation von Humanblut mit ADP wurde die Morphologie und die Größe proinflammatorischer TGK analysiert. Hierzu wurden, wie bereits in Material und Methoden beschrieben, humane Blutproben in vitro mittels ADP aktiviert. Es wurden zusätzlich Proben mit dem Inhibitor PGE₁ [78-80] oder mit Sevofluran versetzt.

Durch die Zugabe von Fluoreszenz-markierten Antikörpern wurden die Bestandteile der entstandenen Komplexe mikroskopisch sichtbar gemacht: CD15 als Granulozytenmarker (=rot) und CD41 als spezifischer Thrombozytenmarker (=grün). In der Analyse der Komplexmorphologie zeigte sich, dass die Zugabe von ADP im Vergleich zur Kontrolle eine deutliche Zunahme der Komplexbildung von Thrombozyten und Granulozyten bewirkte (Abbildung 16; ADP). Sowohl die Inkubation der Proben mit Sevofluran als auch mit PGE₁ führten zu einer vergleichbaren Reduktion der Größe sowie der Zelldichte der TGK (Abbildung 16; Sevo+ADP und PGE₁+ADP).

Ergebnisse

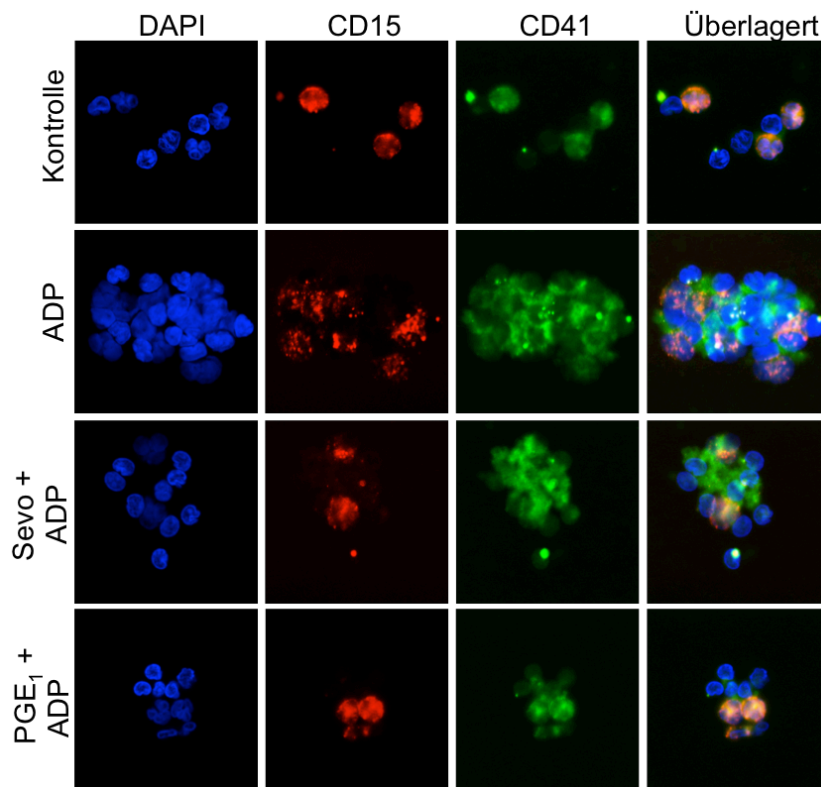


Abbildung 16: Darstellung von ADP-induzierten TGK in humanen Blutproben durch Immunfluoreszenz

DAPI zur Darstellung von Nukleoli (=blau); CD15 als Granulozyten-marker (=rot) und CD41 als spezifischer Thrombozytenmarker (grün).

3.2 Effekt des Anästhetikums Sevofluran auf Thrombozyten-Leukozyten Aktivierung in Humanblut während extrakorporaler Zirkulation

In weiteren ex vivo Versuchen sollte nun der bereits in vitro beobachtete potenziell protektive Effekt von Sevofluran auf die Aktivierung und Interaktion von Thrombozyten und Granulozyten bestätigt werden. Zudem sollte in diesem Setting die Rolle von Adora2b, als potenziellen Zielrezeptor von Sevofluran zur Vermittlung der protektiven Eigenschaften genauer untersucht werden.

3.2.1 Identifizierung und Quantifizierung von TGK in Humanblut im Modell Chandler Loop

Da in vorrangigen in vitro Untersuchungen gezeigt wurde, dass Sevofluran potenziell inhibitorisch auf die Interaktion und Aktivierung von Thrombozyten und Granulozyten wirken kann, sollte nun unter ex vivo Bedingungen die EKZ-induzierte Bildung proinflammatorischer TGKs durchflusszytometrisch quantifiziert werden. Um die TGK durchflusszytometrisch zu identifizieren, wurde wie in Material und Methoden beschrieben, die Fluoreszenzintensität eines Thrombozyten-spezifischen Antikörpers (CD41) sowie eines Granulozyten-spezifischen Antikörpers (CD66b) betrachtet.

Vor einer 30-minütigen Zirkulation im Chandler Loop wurde eine Blutprobe entnommen und durchflusszytometrisch analysiert (Abbildung 17; Kontrolle). Nach Zirkulation im Chandler Loop zeigte sich eine signifikante Erhöhung der mittleren Fluoreszenzintensität der CD41/CD66b-positiven Population und somit der TGK-Bildung (Abbildung 17; Chandler Loop; n=5, One way ANOVA mit Bonferronis post hoc Test, ** $p < 0,005$). Die Zugabe von Sevofluran induzierte eine signifikante Reduktion der Bildung von TGK (Abbildung 17; Chandler Loop + Sevo; n=5, One way ANOVA mit Bonferronis post hoc Test, * $p < 0,05$), konnte jedoch die zirkulationsinduzierte Komplexbildung nicht komplett supprimieren. Durch den gleichzeitigen Einsatz eines Adora2b Antagonisten wurde die Sevofluran induzierte Reduktion der proinflammatorischen Komplexbildung revidiert (Abbildung 17; Sevo + Adora2b Block; n=5, One way ANOVA mit Bonferronis post hoc Test, ns= nicht signifikant).

Ergebnisse

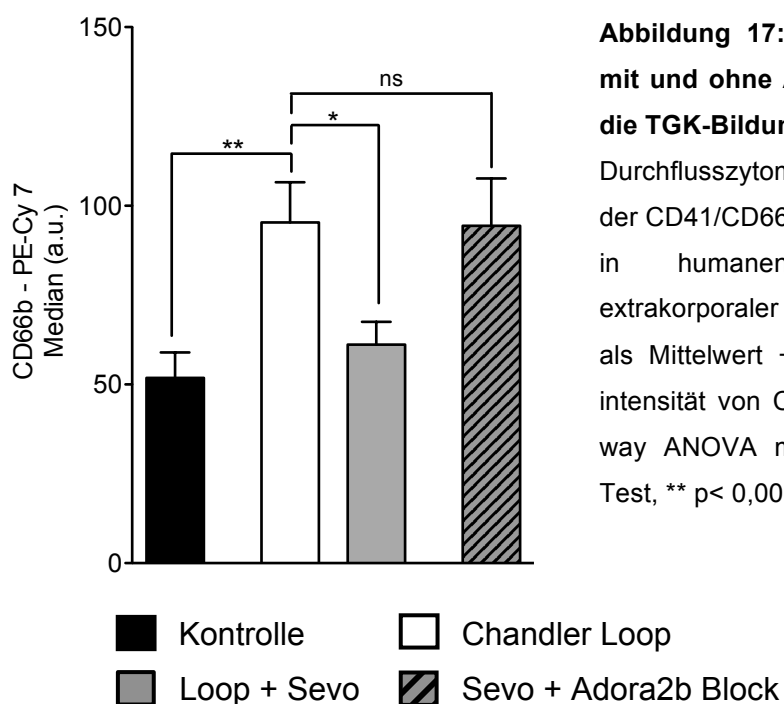


Abbildung 17: Effekt von Sevofluran mit und ohne Adora2b Antagonist auf die TGK-Bildung.

Durchflusszytometrische Quantifizierung der CD41/CD66b positiven Zellpopulation in humanen Blutproben nach extrakorporaler Zirkulation. Dargestellt als Mittelwert + SEM der Fluoreszenzintensität von CD66b-PE-Cy7; n=5, One way ANOVA mit Bonferronis post hoc Test, ** p< 0,005.

Zusammenfassend zeigte sich, (i) dass Sevofluran eine TGK-Bildung, dargestellt durch Verminderung der CD41/CD66b-positiven Zellpopulation im Chandler Loop, inhibieren kann und (ii) Adora2b eine wichtige mechanistische Rolle in der Vermittlung des Sevofluran-assoziierten protektiven Effektes spielt.

3.2.2 Analyse des Effektes von Sevofluran auf die mittels P-Selektin dargestellte Thrombozytenaktivierung

Um den Effekt von Sevofluran auf die EKZ-induzierte Thrombozytenaktivierung innerhalb von TGK zu quantifizieren, wurde das thrombozytäre Oberflächenmolekül P-Selektin in diesen Komplexen quantifiziert. In einem ersten Ansatz wurde vor 30-minütiger Zirkulation im Chandler Loop eine Blutprobe entnommen und durchflusszytometrisch analysiert (Abbildung 18; Kontrolle). Nach Zirkulation im Chandler Loop zeigte sich eine signifikante Erhöhung der mittleren Fluoreszenzintensität von P-Selektin und damit der Thrombozytenaktivierung (Abbildung 18; Chandler Loop; n=5, One way ANOVA mit Bonferronis post hoc Test, ** p< 0,005). Sevofluran induzierte eine signifikante Reduktion dieser zirkulationsinduzierten Thrombozytenaktivierung

Ergebnisse

(Abbildung 18; Chandler Loop + Sevo; n=5, One way ANOVA mit Bonferronis post hoc Test, * = $p < 0,05$), supprimierte die Aktivierung jedoch nicht komplett. Interessanterweise konnte die Zugabe eines Adora2b Antagonisten die Sevofluran-induzierte Inhibition der Thrombozytenaktivierung aufheben (Abbildung 18; Sevo + Adora2b Block; n=5, One way ANOVA mit Bonferronis post hoc Test, ns = nicht signifikant).

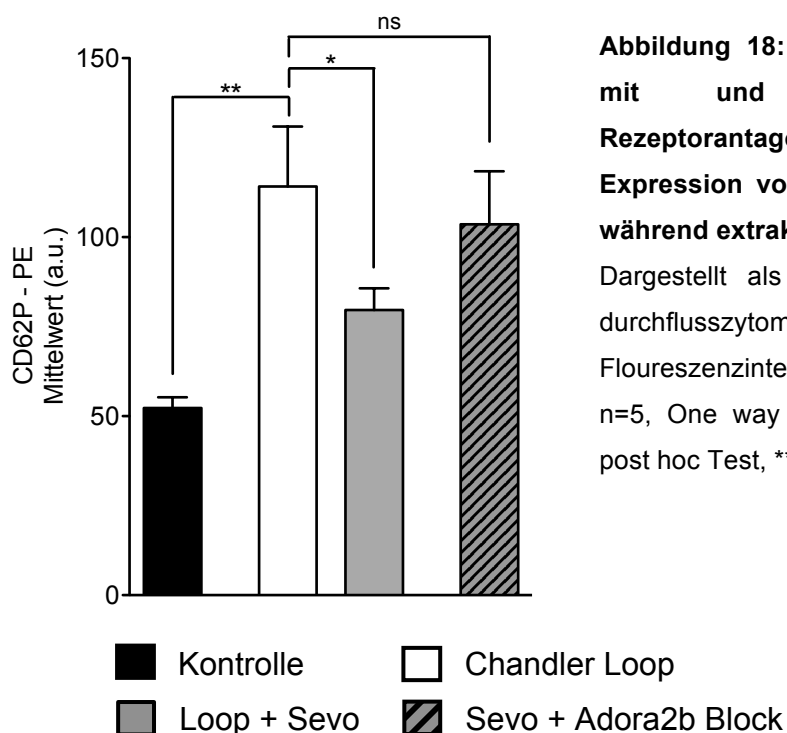


Abbildung 18: Effekt von Sevofluran mit und ohne Adora2b Rezeptorantagonist auf die P-Selektin Expression von humanen Blutproben während extrakorporaler Zirkulation. Dargestellt als Mittelwert + SEM der durchflusszytometrisch quantifizierten Fluoreszenzintensität von CD62P-PE; n=5, One way ANOVA mit Bonferronis post hoc Test, ** $p < 0,005$, * = $p < 0,05$.

Zusammenfassend zeigte sich, (i) dass Sevofluran eine Thrombozytenaktivierung in Humanblut, dargestellt durch die P-Selektin Expression, ex vivo inhibieren kann und (ii) Adora2b eine wichtige mechanistische Rolle in der Vermittlung des Sevofluran-assoziierten protektiven Effektes spielt.

3.2.3 Analyse des Effektes von Sevofluran auf die GP IIb/IIIa Aktivierung

Um den ersten Nachweis einer Adora2b vermittelten Wirkung von Sevofluran auf die Thrombozytenaktivierung weiter zu untersuchen, wurde in einem

Ergebnisse

nächsten Ansatz zusätzlich zu dem Thrombozytenaktivierungsmarker P-Selektin, der Fibrinogenrezeptor GP IIb/IIIa auf der Oberfläche von Thrombozyten mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. GP IIb/IIIa kann über Fibrinogen an den leukozytären Rezeptor Mac-1 (CD11b/CD18) binden und damit ebenfalls zur proinflammatorischen TKG-Bildung beitragen. In diesem Ansatz wurde erneut eine Blutprobe vor Zirkulation entnommen (Abbildung 19; Kontrolle). Nach 30-minütiger Zirkulation im Chandler Loop zeigte sich eine signifikante Erhöhung der mittleren Fluoreszenzintensität von GP IIb/IIIa (Abbildung 19; Chandler Loop; n=5, One way ANOVA mit Bonferronis post hoc Test, * = $p < 0,05$). Sevofluran suppressierte in diesem Versuchsansatz jedoch die zirkulationsinduzierte Aktivierung von GP IIb/IIIa nicht signifikant (Abbildung 19; Loop + Sevo; n=5, One way ANOVA mit Bonferronis post hoc Test, ns= nicht signifikant). Der Adora2b-Rezeptorantagonist in Kombination mit Sevofluran bewirkte keine Veränderung der Thrombozytenaktivierung.

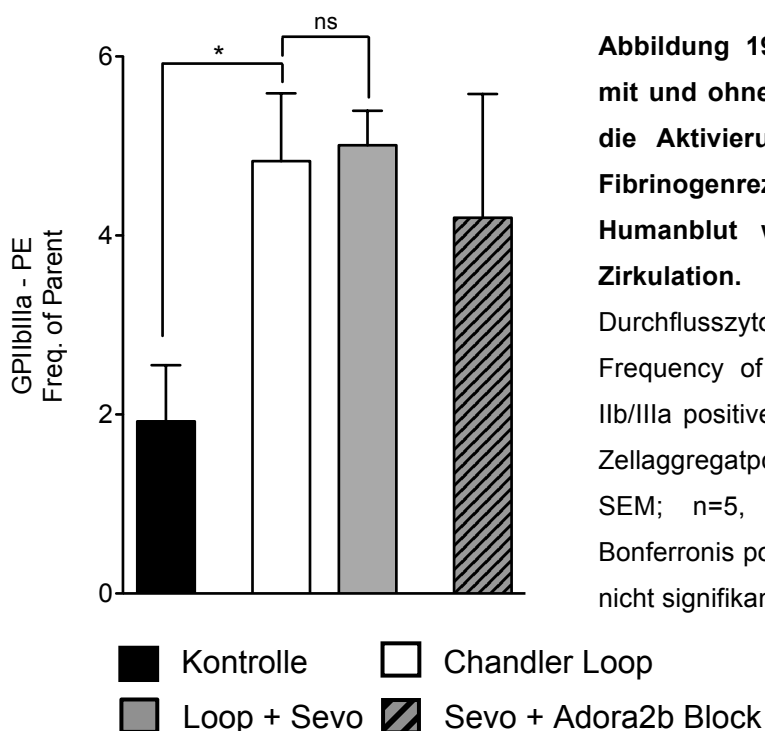


Abbildung 19: Effekt von Sevofluran mit und ohne Adora2b Antagonist auf die Aktivierung des thrombozytären Fibrinogenrezeptors GP IIb/IIIa in Humanblut während extrakorporaler Zirkulation.

Durchflusszytometrisch bestimmte Frequency of Parent (= Anteil der GP IIb/IIIa positiven Zellen in der parentalen Zellaggregatpopulation); Mittelwert + SEM; n=5, One way ANOVA mit Bonferronis post hoc Test, * $p < 0,05$, ns= nicht signifikant.

Zusammenfassend zeigte sich, dass Sevofluran die EKZ-induzierte GP IIb/IIIa Aktivierung in diesem Modell nicht inhibiert.

3.2.4 Analyse des Effektes von Sevofluran auf die Mac-1 Aktivierung von Granulozyten

Zusätzlich zu der Analyse der Thrombozytenaktivierung während EKZ, wurde in einem weiteren Ansatz die Granulozytenaktivierung anhand des leukozytären Integrins Mac-1 (CD11b/CD18) auf TKG-gebundenen Granulozyten durchflusszytometrisch quantifiziert. In einem ersten Ansatz wurde erneut vor Zirkulation im Chandler Loop eine Blutprobe entnommen und analysiert (Abbildung 20; Kontrolle). Nach der Zirkulation zeigte sich eine signifikante Erhöhung der mittleren Fluoreszenzintensität von CD11b (Abbildung 20; Chandler Loop; n=5, One way ANOVA mit Bonferronis post hoc Test, * = $p < 0,05$). Sevofluran induzierte eine signifikante Reduktion der CD11b Expression und damit eine Verminderung der Granulozytenaktivierung (Abbildung 20; Chandler Loop + Sevo; n=5, One way ANOVA mit Bonferronis post hoc Test, * = $p < 0,05$). Der applizierte Adora2b- Antagonist hob die hemmenden Wirkung von Sevofluran auf die Granulozytenaktivierung auf (Abbildung 20; Sevo + Adora2b Block; n=5, One way ANOVA mit Bonferronis post hoc Test, ns= nicht signifikant).

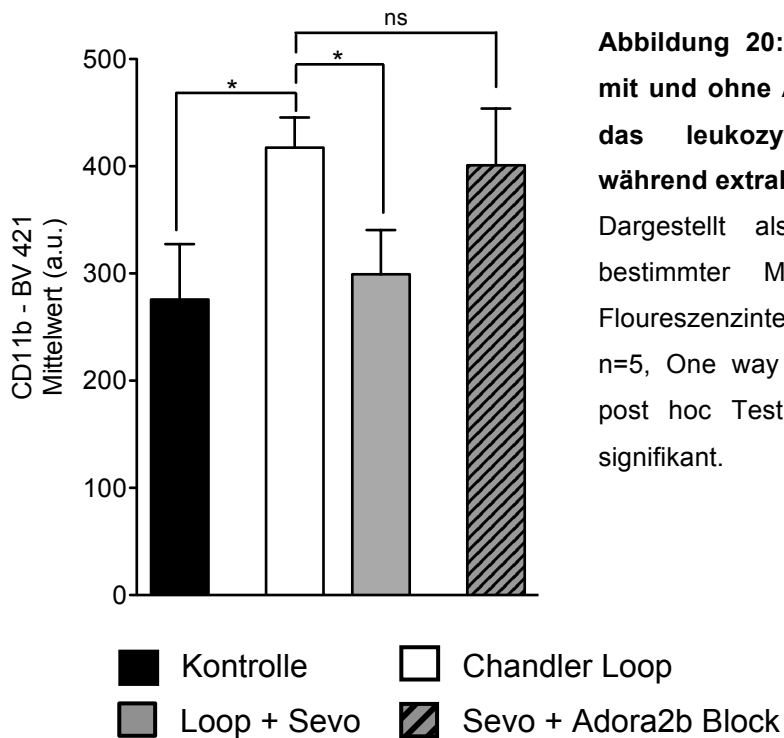


Abbildung 20: Effekt von Sevofluran mit und ohne Adora2b Antagonist auf das leukozytäre Integrin Mac-1 während extrakorporaler Zirkulation.

Dargestellt als durchflusszytometrisch bestimmter Mittelwert + SEM der Fluoreszenzintensität von CD11b-BV421; n=5, One way ANOVA mit Bonferronis post hoc Test, * $p < 0,05$, ns= nicht signifikant.

Zusammenfassend zeigte sich, (i) dass Sevofluran eine Granulozytenaktivierung in Humanblut ausgelöst durch EKZ und dargestellt durch Mac-1 (CD11b/CD18) Expression ex vivo inhibieren kann, (ii) dass Adora2b eine wichtige mechanistische Rolle in der Vermittlung dieses Sevofluran-assoziierten antiinflammatorischen Effektes spielt.

3.2.5 Identifizierung und Aktivierung von Thrombozyten-/ Monozyten Komplexen in Humanblut im Modell Chandler Loop

Nach Analyse der erhobenen Daten zeigte sich in dem Chandler Loop Modell kein relevanter Effekt auf die Aktivierung und Interaktion von Monozyten und Thrombozyten durch EKZ.

3.3 Effekt des Anästhetikums Sevofluran auf proinflammatorische Thrombozyten-/ Leukozyten Interaktion in murinem Blut während Ischämie und Reperfusion der Leber

3.3.1 Identifizierung und Quantifizierung von TGK in einem murinen Modell der Leber IR

Zur Festigung des ex vivo gezeigten potenziell über Adora2b vermittelten inhibitorischen Effektes von Sevofluran wurde nun die Wirkung von Sevofluran auf die Komplexbildung zwischen Leukozyten und Thrombozyten in einem murinen Modell der Leber IR in vivo untersucht.

Da ex vivo bereits gezeigt wurde, dass Sevofluran potentiell über Adora2b antiinflammatorische Effekte vermittelt, wurden in einem Versuchsansatz C57BL/6 Wildtyp Mäuse und in einem weiteren Ansatz Adora2b^{-/-} Mäuse untersucht.

Während einer partiellen und reversiblen Ischämie der Leber über 30 min erfolgte in einer entsprechenden Gruppe die Applikation von Sevofluran (2 Vol.-%) per inhalationem zusätzlich zur Basisanästhesie. Die Blutentnahme und weitere Analysen erfolgten nach 5 min Reperfusion. Zur Identifikation der TGK

Ergebnisse

wurde die CD42a (murine Thrombozyten) und Ly6G (murine Granulozyten) positive Zellpopulation durchflusszytometrisch isoliert. Wie bereits ex vivo gezeigt, reduzierte Sevofluran die TGK-Bildung auch in vivo während Leber IR in den Wildtypen (Abbildung 21; WT + Sevo; n=7, Mann Whitney Test, * $p < 0,05$), konnte jedoch diesen durch Leber IR induzierten Effekt nicht komplett revidieren (Abbildung 21; WT; n=8). Wie bereits ex vivo gezeigt konnte auch in vivo in Adora2b^{-/-} Mäusen die Reduktion der TGK durch Sevofluran nicht reproduziert werden (Abbildung 21; Adora2b^{-/-} und Adora2b^{-/-} +Sevo; n=5; Mann Whitney Test, ns= nicht signifikant).

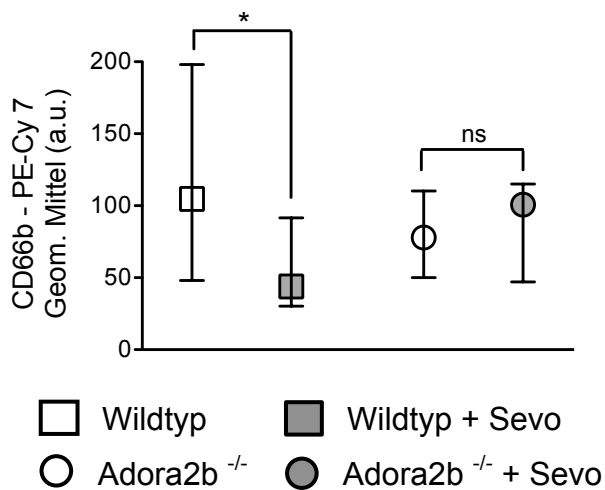


Abbildung 21: Effekt von Sevofluran in Wildtypen und Adora2b^{-/-} Mäusen auf die TGK-Bildung.

Durchflusszytometrische Quantifizierung der CD42a/Ly6G positiven Zellpopulation in murinen Blutproben nach Leber IR. Dargestellt als Median + IQR der Fluoreszenzintensität von CD66b-PE-Cy7, n=5-8, Mann Whitney Test, * $p < 0,05$.

Zusammenfassend zeigte sich, (i) dass Sevofluran eine Interaktion von Thrombozyten und Granulozyten, dargestellt durch die durchflusszytometrische Quantifizierung der CD42a/Ly6G - positiven Zellpopulation, in vivo inhibieren kann und (ii) die Sevofluran induzierte Reduktion der TGK-Bildung potenziell über Adora2b vermittelt wird.

3.3.2 Analyse des Effektes von Sevofluran auf die thrombozytäre P-Selektin Expression

Um die ex vivo beobachteten Effekte von Sevofluran auf die Thrombozytenaktivierung in vivo zu bestätigen, wurde der Effekt von Sevofluran

Ergebnisse

auf die Thrombozytenaktivierung mittels durchflusszytometrischer Quantifizierung der P-Selektin Expression in murinem Blut dargestellt. Während 30-minütiger Ischämie und anschließender Reperfusion induzierte Sevofluran eine signifikante Reduktion der Thrombozytenaktivierung in Wildtypen (Abbildung 22; WT + Sevo; n=7, Mann Whitney Test, * p< 0,05) im Vergleich zu der Kontrollgruppe (Abbildung 22; WT; n=8). Zudem konnte, wie zuvor in ex vivo Experimenten gezeigt, auch in vivo in *Adora2b*^{-/-} Mäusen die Sevofluran-induzierte Inhibition der Thrombozytenaktivierung nicht beobachtet werden (Abbildung 22; *Adora2b*^{-/-} und *Adora2b*^{-/-} +Sevo; n=5, Mann Whitney Test, ns= nicht signifikant).



Abbildung 22: Effekt von Sevofluran auf die P-Selektin Expression in murinen Blutproben von C57BL/6 Wildtyp und *Adora2b*^{-/-} Mäusen nach Leber IR.

Durchflusszytometrische Quantifizierung der CD42a/CD62P positiven Population. Dargestellt als Median + IQR der Fluoreszenzintensität von CD62P-APC, n=5-8, Mann Whitney Test, * p< 0,05, ns= nicht signifikant.

Zusammenfassend zeigte sich, (i) dass Sevofluran eine Thrombozytenaktivierung, dargestellt durch die P-Selektin Expression, in vivo im Rahmen der Leber IR inhibieren kann und (ii) die Sevofluran induzierte Reduktion der Thrombozytenaktivierung potenziell über *Adora2b* vermittelt wird.

3.3.3 Analyse des Effektes von Sevofluran auf die thrombozytäre GP IIb/IIIa Aktivierung

Zusätzlich zu den in vivo Untersuchungen der Thrombozytenaktivierung dargestellt durch P-Selektin wurde der Aktivierungszustand des thrombozytären Rezeptors GP IIb/IIIa nach Leber IR mittels Durchflusszytometrie in murinem Blut quantifiziert. Damit sollte der beobachtete inhibitorische Effekt von

Ergebnisse

Sevofluran auf die Thrombozytenaktivierung während Leber IR weiter untersucht werden. Ein weiteres Ziel dieser Untersuchung war die nähere Charakterisierung der Inhibition der Thrombozytenaktivierung durch Sevofluran in *Adora2b^{-/-}* Mäusen. Sevofluran reduzierte die Thrombozytenaktivierung während Leber IR in Wildtypen signifikant (Abbildung 23; WT + Sevo, n=7, Mann Whitney Test, * p< 0,05) im Vergleich zu der Kontrollgruppe (Abbildung 23; WT; n=8. Diese Reduktion der Thrombozytenaktivierung, dargestellt durch die Expression der aktivierten Konformation von GP IIb/IIIa, war ähnlich den vorangegangenen Versuchen beim Einsatz von *Adora2b^{-/-}* Mäusen nicht zu beobachten (Abbildung 23; *Adora2b^{-/-}* und *Adora2b^{-/-}* + Sevo, n=5, Mann Whitney Test, ns= nicht signifikant).



Abbildung 23: Effekt von Sevofluran auf die GP IIb/IIIa Expression in murinen Blutproben von C57BL/6 Wildtypen und *Adora2b^{-/-}* Mäusen nach Leber IR.

Durchflusszytometrische Quantifizierung der CD42a/GP IIb/IIIa positiven Population Dargestellt als Median + IQR der Fluoreszenzintensität von GP IIb/IIIa-PE, n=5-8, Mann Whitney Test, * p< 0,05.

Zusammenfassend zeigte sich, (i) dass Sevofluran eine Thrombozytenaktivierung, dargestellt durch die Expression der aktivierten Konformation von GP IIb/IIIa, in vivo inhibieren kann und (ii) die Sevofluran-induzierte Hemmung der Thrombozyten-aktivierung potenziell über *Adora2b* vermittelt wird.

3.3.4 Analyse des Effektes von Sevofluran auf die Granulozytenaktivierung anhand des Integrins Mac-1

Ähnlich den ex vivo Experimenten sollte auch in vivo zusätzlich in einem weiteren Ansatz die Granulozytenaktivierung anhand des leukozytären Integrins Mac-1 (CD11b/CD18) auf TKG-gebundenen Granulozyten durchflusszytometrisch in murinem Blut von C57BL/6 Wildtypen sowie in Adora2b^{-/-} Mäusen analysiert werden. In diesem Versuchsansatz hatte Sevofluran keinen signifikanten Effekt auf die Granulozytenaktivierung während Leber IR in Wildtypen (Abbildung 24; WT + Sevo; n=7) und in Adora2b^{-/-} Mäusen (Abbildung 24; Adora2b^{-/-} + Sevo; n=5) im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollgruppen (Abbildung 24; WT n= 8 und Adora2b^{-/-} n=5).

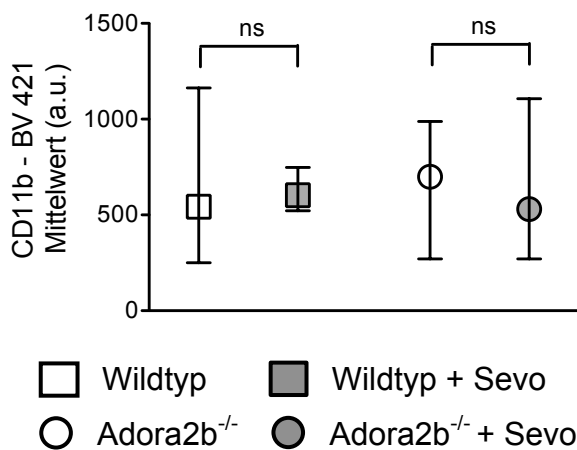


Abbildung 24: Effekt von Sevofluran auf die CD11b Expression in murinen Blutproben von C57BL/6 Wildtyp und Adora2b^{-/-} Mäusen nach Leber IR.

Durchflusszytometrische Quantifizierung der CD42a/Ly6G/CD11b positiven Population. Dargestellt als Median + IQR der Fluoreszenzintensität von CD11b-BV421, n=5-8, Mann Whitney Test.

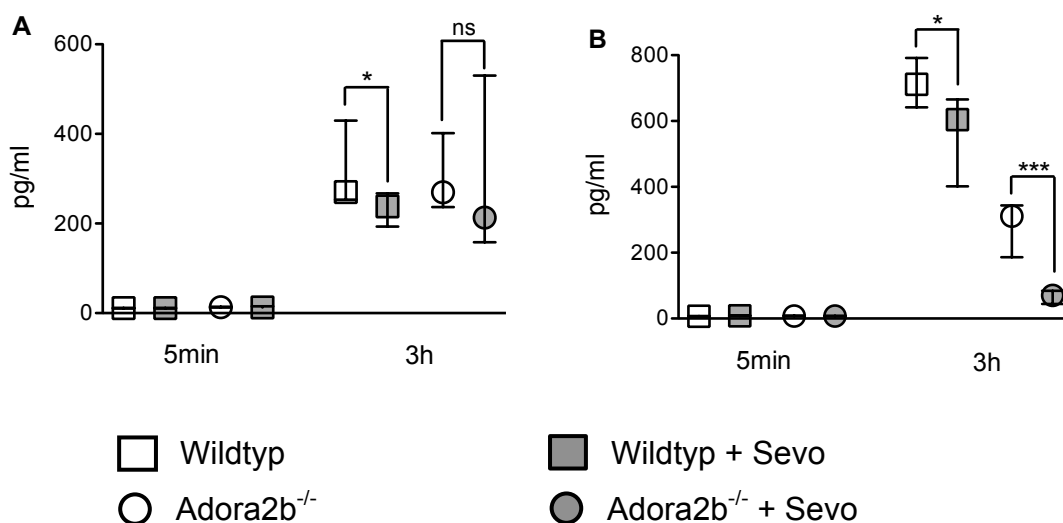
Zusammenfassend zeigte sich, dass Sevofluran keinen relevanten Effekt auf die granulozytäre Mac-1 Expression ausübte.

3.3.5 Identifizierung und Aktivierung von Thrombozyten-/ Monozyten Komplexen im murinen Modell der Leber IR

Nach Analyse der erhobenen Daten zeigte sich in diesem Modell der Leber IR in der Maus kein eindeutiger Effekt auf die Aktivierung und Interaktion von Monozyten und Thrombozyten in Wildtypen sowie in Adora2b^{-/-} Mäusen.

3.3.6 Systemische Wirkung von Sevofluran auf Zytokinkonzentrationen in murinem Blut während Leber IR

Um die systemischen Effekte der murinen Leber IR und der zirkulierenden proinflammatorischen TKG genauer zu analysieren, wurden während systemischer Inflammation relevante Zytokine (IL-6 und KC) mittels Durchflusszytometrie in murinen Plasmaproben bestimmt. Nach 30-minütiger Ischämie und anschließender 5-minütiger Reperfusion zeigte sich keine relevante Erhöhung der plasmatischen Zytokinkonzentrationen (Abbildung 25; 5min). Nach 3-stündiger Reperfusionsphase konnten hingegen erhöhte Zytokinkonzentrationen bei C57BL/6 Wildtypen sowie bei Adora2b^{-/-} Tieren nachgewiesen werden. Durch die Inhalation von Sevofluran während Leber IR konnte der Anstieg von IL-6 sowie von KC bei den Wildtypen signifikant reduziert werden (Abbildung 25; WT + Sevo; n=4, Mann-Whitney Test, * p<0,05). Dieser antiinflammatorische Effekt von Sevofluran dargestellt als reduzierte IL-6 Konzentration in murinen Blutproben konnte bei der Untersuchung von Adora2b^{-/-} Tieren nicht reproduziert werden (Abbildung 25; Adora2b^{-/-} +Sevo; n=4, Mann-Whitney Test, ns= nicht signifikant). Sevofluran hatte interessanterweise auf die Erhöhung des Zytokins KC durch Leber IR auch in Adora2b^{-/-} Tieren einen signifikant hemmenden Effekt (Abbildung 25; Adora2b^{-/-} + Sevo; n=4, Mann-Whitney Test, *** p<0,0005).



Ergebnisse

Abbildung 25: Effekt von Sevofluran auf Zytokinkonzentrationen im murinem Plasma nach Leber IR.

A: IL-6 Plasmalevels in murinen Proben der jeweiligen Gruppen nach 30-minütiger Ischämie und anschließender 5-minütiger Reperfusion (frühe Reperfusionsphase) und nach 3-stündiger Reperfusion (späte Reperfusionsphase). **B:** KC Spiegel in murinen Blutproben der jeweiligen Gruppen nach 30-minütiger Ischämie und anschließender 5-minütiger Reperfusion (frühe Reperfusionsphase) und nach 3-stündiger Reperfusion (späte Reperfusionsphase). Dargestellt als Median + IQR der Plasmakonzentration in pg/ml, Wildtyp +/- Sevo: n= 4 Adora2b^{-/-} +/- Sevo: n=4, Mann Whitney Test, * p<0,05, *** p<0,0005.

Zusammenfassend zeigte sich, (i) dass die Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und KC durch Applikation von Sevofluran während Leber IR signifikant reduziert werden kann (ii) und die hemmende Wirkung von Sevofluran auf die IL-6 Plasmakonzentration potenziell über Adora2b vermittelt wird. Dies gilt jedoch interessanterweise nicht für KC.

3.3.7 Re-Analyse des protektiven Effektes von Sevofluran während Leber IR in Adora2a^{-/-} Tieren

Abschließend wurde zur weitergehenden Analyse der potenziell über Adora2b vermittelten Protektion durch Sevofluran auf die Interaktion von Thrombozyten und Granulozyten eine weitere Kohorte innerhalb des bereits beschriebenen Modelles der Leber IR untersucht. Da die bisher erhobenen Ergebnisse zeigten, dass Sevofluran antiinflammatorisch über Adora2b interagiert, sollte in einem weiteren Versuchsansatz der ebenfalls als potenziell antiinflammatorisch wirkende Adora2a genauer betrachtet werden. Dazu wurden CD1 Wildtyp und Adora2a^{-/-} Mäuse im Modell der Leber IR analysiert. Anschließend erfolgte die Evaluation der Wirkung von Sevofluran während Leber IR auf die Bildung proinflammatorischer TGK in CD1 Wildtypen und Adora2a^{-/-} Tieren.

Die TGK wurden, wie bereits beschrieben, über die CD42a (murine Thrombozyten) und Ly6G (murine Granulozyten) positive Zellpopulation durchflusszytometrisch eingegrenzt. Sevofluran Inhalation reduzierte die TGK-Bildung in vivo während Leber IR in den CD1 Wildtypen analog zu den C57BL/6 Wildtypen (Abbildung 26; WT + Sevo; n=4, Mann Whitney Test, * p< 0,05) im

Ergebnisse

Vergleich zu der Kontrollgruppe (Abbildung 26; WT; n=4). Jedoch konnte Sevofluran in Adora2a^{-/-} Mäusen ebenfalls eine signifikante Reduktion der TKG im Vergleich zur entsprechenden Kontrollgruppe auslösen (Abbildung 26; Adora2a^{-/-} und Adora2a^{-/-} +Sevo; n=4; Mann Whitney Test, ** p<0,005).

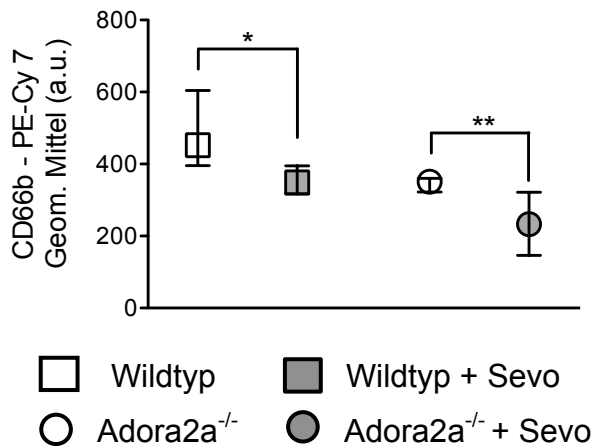


Abbildung 26: Effekt von Sevofluran in Wildtypen und Adora2a^{-/-} Mäusen auf die TKG-Bildung.

Durchflusszytometrische Quantifizierung der CD42a/Ly6G positiven Zellpopulation in murinen Blutproben nach Leber IR. Dargestellt als Median + IQR der Fluoreszenzintensität von CD66b-PE-Cy7, n=4, Mann Whitney Test, * p< 0,05, ** p<0,005.

In dieser Kohorte von CD1 Wildtypen und Adora2a^{-/-} Tieren wurden weitergehend die systemischen Effekte der Leber IR und die Wirkung von Sevofluran auf die während systemischer Inflammation relevanten Zytokine (IL-6 und KC) mittels Durchflusszytometrie analysiert. Sevofluran Inhalation während Leber IR reduzierte die IL-6 sowie die KC-Plasmakonzentrationen bei den CD1 Wildtypen analog zu den bereits beschriebenen Ergebnissen der C57BL/6 Wildtypen im Vergleich zu der Kontrollgruppe (Abbildung 27; WT + Sevo; n=4, Mann-Whitney Test, * p<0,05). Dieser antiinflammatorische Effekt von Sevofluran, dargestellt durch die Reduktion der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und KC, konnte jedoch auch bei der Untersuchung von Adora2a^{-/-} Tieren reproduziert werden (Abbildung 27; Adora2a^{-/-} +Sevo; n=4, Mann-Whitney Test, * p<0,05).

Ergebnisse

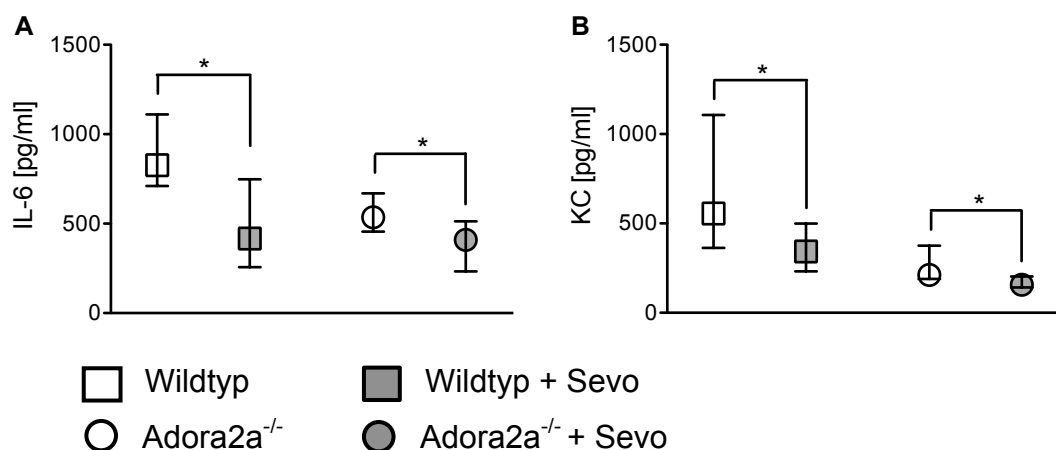


Abbildung 27: Effekt von Sevofluran auf Plasmakonzentrationen von IL-6 und KC nach Leber IR.

A: Durchflussszytometrisch bestimmte IL-6 Plasmalevel in murinen Proben der jeweiligen Gruppen nach 30-minütiger Ischämie und 3-stündiger Reperfusion in Wildtypen sowie Adora2a^{-/-} Tieren. **B:** Durchflussszytometrisch bestimmte KC Spiegel in murinen Blutproben der jeweiligen Gruppen nach 30-minütiger Ischämie und 3-stündiger Reperfusion. Dargestellt als Median + IQR der Plasmakonzentration in pg/ml, n= 4, Mann Whitney Test, * p<0,05.

Zusammenfassend bestätigte sich, (i) dass Sevofluran eine Interaktion von Thrombozyten und Granulozyten und die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine in vivo inhibieren kann und (ii) diese Sevofluran induzierte Reduktion der TGK-Bildung sowie die Senkung der Plasmakonzentrationen von IL-6 und KC potenziell über Adora2b und nicht über Adora2a vermittelt wird.

3.4 Effekt von Sevofluran auf murines Leberparenchym während Leber IR

3.4.1 Analyse des Effektes von Sevofluran auf Lebertransaminasen als Marker für Gewebsnekrose

Zusätzlich zu den durchgeführten Analysen der Interaktion und Aktivierung von Thrombozyten und Granulozyten wurde in einem weiteren Experiment die Schädigung des Parenchyms durch die Einwanderung proinflammatorischer TGK mit Hilfe enzymatischer Bestimmung der spezifischen Lebertransaminase ALT im Serum untersucht. Wie in Material und Methoden beschrieben, wurde

Ergebnisse

nach Leber IR aus murinen Serumproben von C57BL/6 Wildtyp Mäusen sowie Adora2b^{-/-} Mäusen die Konzentration von ALT bestimmt. Die Inhalation von Sevofluran während Leber IR in einem Versuchsansatz konnte den Anstieg von ALT im Vergleich zu der Kontrollgruppe signifikant verringern (Abbildung 28; WT und WT + Sevo; n=5, Mann Whitney Test * p< 0,05). Diese Reduktion der ALT-Konzentration durch die Inhalation von Sevofluran während Leber IR, war in Adora2b^{-/-} Mäusen nicht zu beobachten (Abbildung 28; Adora2b^{-/-} + Sevo; n=5, Mann Whitney Test, ns= nicht signifikant).

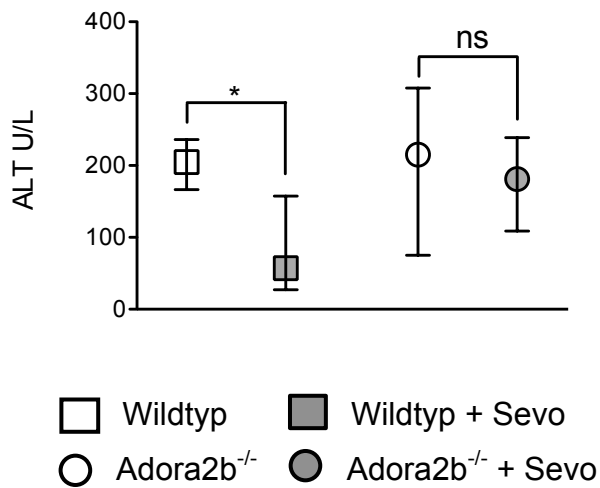


Abbildung 28: Analyse des Einflusses von Sevofluran auf die Schädigung des murinen Leberparenchyms durch Leber IR.

Dargestellt durch enzymatische Bestimmung der spezifischen Lebertransaminase ALT (= Alanin-Aminotransferase) in murinem Serum der entsprechenden Gruppen. Dargestellt als Median + IQR der Enzymkonzentrationen in U/L, n=5, Mann Whitney Test * = p<0,05, ns= nicht signifikant.

3.4.2 Analyse des Effektes von Sevofluran auf die TGK-Sequestrierung im Leberparenchym

Zur Darstellung der bereits in murinem Blut nachgewiesenen zirkulierenden TGK als potenziell gewebeschädigende Faktoren in der Leber wurde eine immunhistochemische Quantifizierung von TGK in der murinen Leber, wie in Material und Methoden beschrieben, durchgeführt. Die Versuchsgruppe, welche während Leber IR Sevofluran inhalierte, zeigt eine signifikante Verringerung der Migration von TGK in das Lebergewebe (Abbildung 29; WT + Sevo; n= 4, Mann Whitney Test, ** p<0,005) im Vergleich zu der Kontrollgruppe (Abbildung 29; WT; n= 5). Dieser protektive Effekt der Sevofluran Inhalation war in Adora2b^{-/-}

Ergebnisse

Tieren nicht zu beobachten (Abbildung 29; Adora2b^{-/-} und Adora2b^{-/-} + Sevo; n= 5, Mann Whitney Test, ns= nicht signifikant).

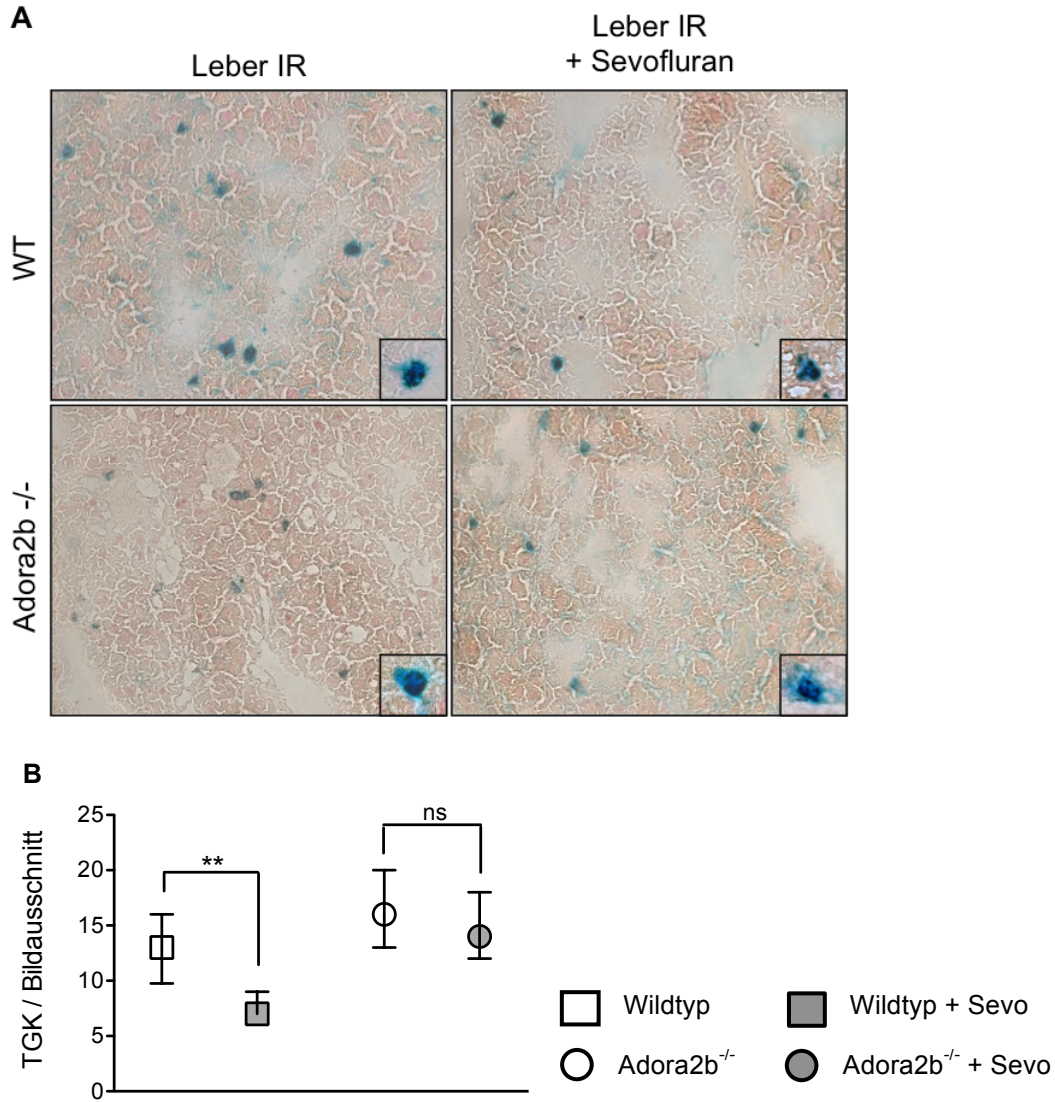


Abbildung 29: Analyse des Einflusses von Sevofluran auf die Quantität morphologisch dargestellter TGK in der Leber.

A: Exemplarische immunhistochemische Färbung der sequestrierten TGK in das Lebergewebe der jeweiligen Gruppen (Granulozyten = blau; Thrombozyten = schwarz) als Übersicht (200x) und im Detail (1000x). **B:** Auszählung der TGK pro Bildausschnitt (200x) in den untersuchten Gruppen. Dargestellt als Median + IQR der TGK/ Bildausschnitt, n=4-5, Mann Whitney Test, ** p< 0,005.

3.5 Untersuchung der Sevofluran-vermittelten Effekte auf die Expression von Adora2b in murinem Leberparenchym

3.5.1 Analyse des Einflusses von Sevofluran auf das mögliche Target Gen Adora2b in murinem Lebergewebe

Um den Mechanismus der in vivo dargestellten hemmenden Wirkung von Sevofluran auf die TGK-Migration über die Interaktion mit Adora2b in der Leber näher zu untersuchen, wurde die Expression von Adora2b in murinem Leberparenchym von C57BL/6 Wildtypen mittels rtPCR untersucht. In einer ersten Versuchsgruppe wurde nach einstündiger Sevofluran Inhalation eine signifikant erhöhte relative Expression von Adora2b in murinem Lebergewebe im Vergleich zu der mit Raumluft beatmeten Kontrollgruppe festgestellt. (Abbildung 30A; Sevofluran; n=4, ungepaarter t-test, ** p< 0,005). Zusätzlich wurde die bereits beschriebene Kohorte an Wildtypmäusen untersucht, welche zusätzlich zur Inhalation von Sevofluran das Modell der Leber IR durchlaufen hat. Hierbei zeigte sich eine signifikant gesteigerte Expression von Adora2b in murinem Leberparenchym im Vergleich zu der mit Raumluft beatmeten Gruppe (Abbildung 30B; Sevofluran; n=8, ungepaarter t-test, *** p< 0,0005).

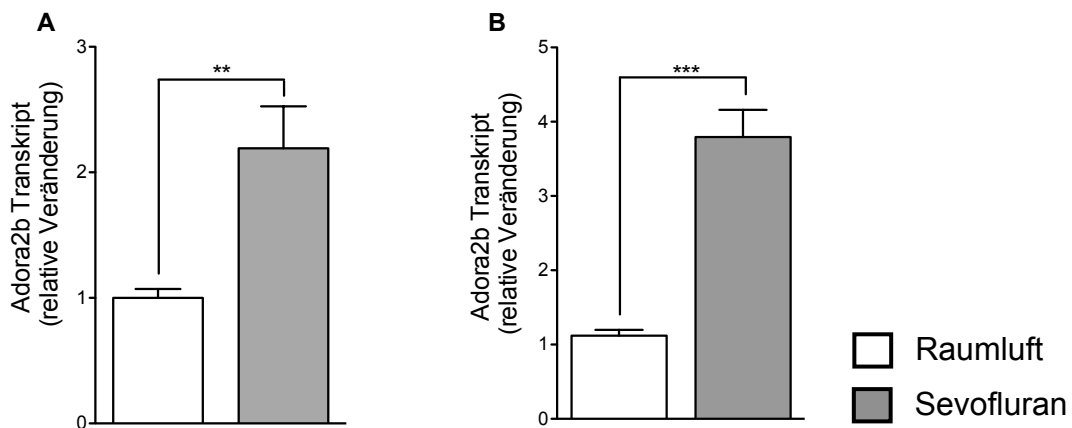


Abbildung 30: Adora2b Expression in murinem Lebergewebe mittels rtPCR.

A: Analyse in murinem Lebergewebe von C57BL/6 Wildtypen mit und ohne Verabreichung von Sevofluran. **B:** Analyse in murinem Lebergewebe von C57BL/6 Wildtypen mit und ohne Sevofluran während Leber IR. Dargestellt als Mittelwert + SEM der relativen Veränderung der Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe; Normalisierung: Kontrollgruppe mit Raumluft = 100%; n=4 bzw. n=8, ungepaarter t-test, *** p<0,0005, ** p< 0,005.

3.5.2 Darstellung der Adora2b Expression als mögliches Target Gen von Sevofluran in murinem Lebergewebe mittels Immunfluoreszenz

Im Anschluss an die Quantifizierung der Adora2b Expression in murinem Lebergewebe mit und ohne Inhalation von Sevofluran sollte dieser Effekt mittels Immunfluoreszenz mikroskopisch dargestellt werden. Wie bereits in Material und Methoden beschrieben, wurden histologische Schnitte von Lebergewebe der jeweiligen Gruppen angefertigt und mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern inkubiert. Die Struktur des Lebergewebes von C57BL/6 Wildtypen wurde mittels Fluoreszenz-markiertem E-Cadherin determiniert (=rot). Die Nukleoli der Hepatozyten wurden mittels DAPI angefärbt (=blau). Zusätzlich wurde ein Fluoreszenz-markierter Antikörper gegen Adora2b verwendet (=grün), um durch Überlagerung der angefertigten Färbungen dessen Verteilungsmuster im Parenchym zu beurteilen. Hierbei zeigte sich, dass die einstündige Inhalation von Sevofluran im Vergleich zu der mit Raumluft beatmeten Gruppe eine deutliche Hochregulation der Adora2b Expression im Lebergewebe erzeugte (Abbildung 31; +Sevo). Dieser steigende Effekt von Sevofluran auf die Adora2b Expression, zeigte sich ebenfalls durch Sevofluran Inhalation während Leber IR (Abbildung 31; Leber IR + Sevo).

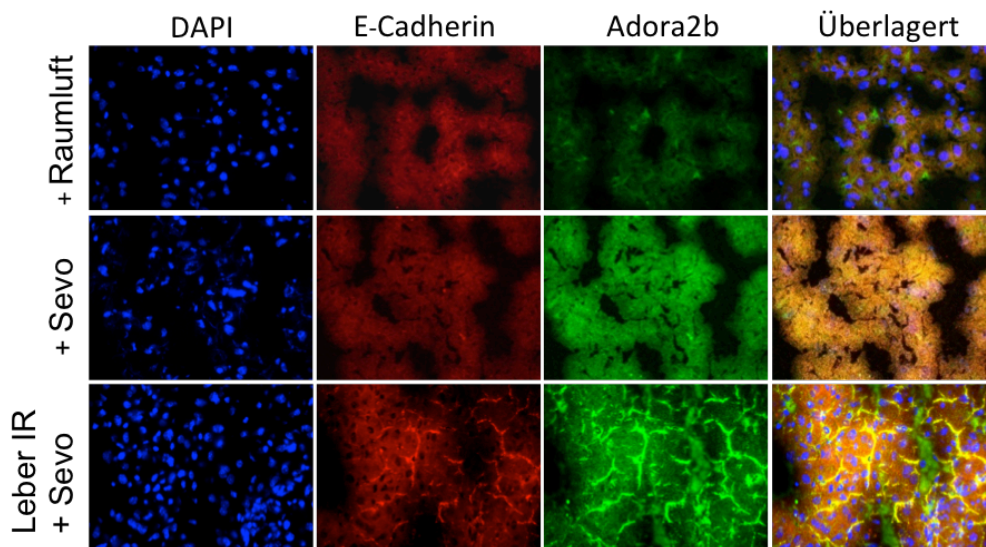


Abbildung 31: Expression von Adora2b in murinem Lebergewebe von C57BL/6 Wildtypen mit/ ohne Sevofluraninhalation dargestellt durch Immunfluoreszenz.

Darstellung der Leberstruktur (E-Cadherin; rot), Nukleoli der Hepatozyten (DAPI; blau), Adora2b (grün) und übereinander gelagerten Bildsequenzen.

4 Diskussion

Das systemische Inflammationssyndrom (SIRS) ist weiterhin eine Hauptursache für gesteigerte Morbidität und Mortalität intensivmedizinischer Patienten. Insbesondere SIRS-assoziierte Parenchymschäden an lebenswichtigen Organen tragen zur Prognoseverschlechterung der betroffenen Patienten bei. Bis heute ist noch kein kausaler Therapieansatz gegen SIRS in der klinischen Praxis verfügbar. Daher ist es essentiell, potenzielle Wege zur Therapie der systemischen Inflammation zu erforschen.

Neben dem Einsatz volatiler Anästhetika wie Sevofluran zu Narkosezwecken, zeigen weitergehende Studien neue Einblicke in das Wirkspektrum dieser Substanzen. Eine antiinflammatorische Wirkung volatiler Anästhetika konnte bereits in Inflammationsmodellen verschiedener Organe, wie z.B. Leber und Niere, aber auch Herz und Lunge, gezeigt werden [41, 44-46]. Auch in einem Modell der extrakorporalen Zirkulation von Schmid et al. wurde festgestellt, dass Sevofluran eine hemmende Wirkung auf verschiedene Inflammationsparameter, wie z.B. die proinflammatorische Aktivierung von Leukozyten ausübt [35].

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigten die bereits beschriebenen antiinflammatorischen Effekte von Sevofluran, insbesondere auf die Aktivierung und Interaktion von Thrombozyten und Granulozyten. Während systemischer Inflammation trägt die Bildung von TKG durch proinflammatorische Stimuli wie ADP, Fremdoberflächen während EKZ oder IR Ereignisse zur Potenzierung der inflammatorischen Antwort und damit zu einer gesteigerten Parenchymschädigung diverser lebenswichtiger Organe bei [14, 21, 80]. Pathomechanistisch spielen während der TKG-Bildung einige Oberflächenproteine, welche durch proinflammatorische Aktivierung vermehrt exprimiert werden, eine wichtige Rolle. Ein zentraler Parameter zur Beurteilung der Thrombozytenaktivierung ist die Expression des Moleküls P-Selektin auf der Oberflächenmembran von Thrombozyten. P-Selektin kann über PSGL-1 auf

Leukozyten zur Bildung proinflammatorischer TGK beitragen. Ein weiterer wichtiger Marker für die Aktivierung von Thrombozyten ist das thrombozytäre Glykoprotein GP IIb/IIIa, welches u.a. über Fibrinogenbrücken an das Integrin Mac-1 (CD11b/CD18) auf der Oberfläche von Leukozyten binden kann [21-23, 27].

Verschiedene Effekte von Sevofluran auf diese Oberflächenproteine wurden bereits in zuvor durchgeführten Studien diskutiert. Dabei inhibierte Sevofluran die Expression und Aktivierung der Thrombozytenaktivierungsmarker P-Selektin und GP IIb/IIIa sowie weitergehend die Bildung proinflammatorischer TGK [37-39].

In der vorliegenden Arbeit konnten in ersten Untersuchungen die bereits gezeigten antiinflammatorischen Effekte von Sevofluran bestätigt werden. Die ADP-induzierte Bildung von TGK wurde durch Sevofluranapplikation vermindert. Zudem wurde die thrombozytäre P-Selektin Expression durch Sevofluran inhibiert. Zusätzlich konnte eine Verminderung der Granulozytenaktivierung, dargestellt als reduzierte Expression von Mac-1 auf der Oberfläche von Granulozyten, durch Sevofluran erreicht werden.

Diese antiinflammatorischen Effekte von Sevofluran auf die TGK-Bildung wurden mittels mikroskopischer Analysen von TGK gefestigt. Durch die Applikation von Sevofluran konnte die Dichte und die Größe der Komplexe deutlich reduziert werden.

In weiteren Experimenten der vorliegenden Arbeit wurden die antiinflammatorischen Effekte von Sevofluran auch im Setting der EKZ weiter analysiert. Durch den Einsatz der EKZ kommt es über verschiedene Pathomechanismen, wie z.B. Kontakt von zellulären Blutbestandteilen mit EKZ Fremdoberflächen, Scherstress oder passagerer Hypoxie im Gewebe zur Ausbildung systemischer Inflammation. Dabei spielt erneut die vermehrte Aktivierung und Interaktion von Thrombozyten und Leukozyten eine essentielle Rolle bei der Entstehung und Aggravation des SIRS. Die Beobachtung einer Studie von Schmid et al. [35], dass Sevofluran die Aktivierung von Granulozyten während EKZ hemmt, konnte in der vorliegenden Arbeit in einem Modell der

Diskussion

EKZ, dem sogenannten Chandler Loop, bestätigt werden. Hierbei zeigte sich eine verminderte Expression des leukozytären Integrins Mac-1 (CD11b/CD18) auf Granulozyten durch die Applikation von Sevofluran während EKZ im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dies zeigt, dass Sevofluran die proinflammatorische Granulozytenaktivierung während EKZ reduzieren kann. Zusätzlich konnten weiterführende Erkenntnisse hinsichtlich der Auswirkungen von Sevofluranapplikation während EKZ gewonnen werden. Sevofluran reduzierte die Bildung proinflammatorischer TKG und die thrombozytäre P-Selektin Expression während EKZ. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Sevofluran protektive Eigenschaften hinsichtlich prothrombotischer und proinflammatorischer Aktivierung von Thrombozyten und Leukozyten während EKZ besitzt.

Da die Mechanismen, über welche volatile Anästhetika antiinflammatorisch wirken noch nicht vollständig verstanden sind, wurde in dieser Studie ein potenzieller Signalweg untersucht. Hierbei wurde der Fokus auf Adenosin und seine Rezeptoren Adora1, Adora2a, Adora2b und Adora3 gelegt. Diese spielen im Rahmen systemischer Inflammation eine wichtige Rolle.

Die durch systemische Inflammation oder IR entstehenden nekrotischen Zellschäden setzen vermehrt das Nukleotid ATP in den Extrazellularraum frei. Dieses wird dort über die plasmatischen Ektonukleotidasen CD39 und CD73 in Adenosin umgewandelt [49, 50]. Eine vermehrte Konzentration von Adenosin im Extrazellularraum trägt über eine Interaktion mit Adenosinrezeptoren zu einer Regulation und Modulation des Inflammationsgeschehens bei. Besonders der Adora2b Rezeptor wird bei pathologisch hohen Adenosinkonzentrationen im Plasma aktiviert und ist Teil eines Signalwegs, welcher während Inflammation angesteuert wird [49]. Durch die Bindung entsprechender Liganden an Adora2b kommt es zu einer Anhebung der intrazellulären cAMP-Konzentration. In vorherigen Studien wurde eine cAMP-induzierte Hemmung des aggregationsvermittelnden P_2Y_{12} -Rezeptors auf Thrombozyten und damit eine Reduktion der Thrombozytenaggregation beschrieben [51, 53, 54]. Zudem wurde gezeigt, dass über die Aktivierung von Adora2b eine reduzierte Adhäsion

und Transmigration von aktivierten Granulozyten in das Gewebe erzielt werden kann [52]. Aufgrund dieser Eigenschaften des Adora2b und insbesondere mit Hinblick auf eine Studie, in welcher die Interaktion von Sevofluran mit Adenosinrezeptoren beschrieben wurde, ist dieser Signalweg hinsichtlich des antiinflammatorischen Wirkmechanismus von Sevofluran besonders interessant [42]. Der genaue Mechanismus und damit die Möglichkeit zu einem gezielten Einsatz von Sevofluran gegen systemische Inflammation konnte bisher nicht vollständig geklärt werden. In Anbetracht der genannten Ergebnisse sollte in der vorliegenden Arbeit der Schwerpunkt auf die potenzielle Interaktion von Sevofluran mit Adora2b und die dadurch resultierende antiinflammatorische Wirkung gesetzt werden.

Um die Rolle von Adora2b und die mögliche Interaktion von Sevofluran mit diesem Rezeptor genauer zu beschreiben, wurde innerhalb des EKZ-Modells ein Adora2b Antagonist eingesetzt. Die Applikation von Sevofluran in Anwesenheit des Adora2b Antagonisten während EKZ konnte keine protektiven Effekte erzeugen. Auch die Sevofluran-assoziierte Inhibition der TGK-Bildung konnte durch den Einsatz des Adora2b Antagonisten revidiert werden.

Ebenso hatte Sevofluran nach der Applikation eines Adora2b Antagonisten keinen inhibitorischen Effekt auf die thrombozytäre P-Selektin Expression sowie auf die Mac-1 Expression auf Granulozyten. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass die protektiven Effekte von Sevofluran auf die Aktivierung und Interaktion von Thrombozyten und Granulozyten maßgeblich über Adora2b vermittelt werden.

Um diese ex vivo beobachteten antiinflammatorischen Effekte des volatilen Anästhetikums Sevofluran und den postulierten Signalweg über Adora2b weiter zu untersuchen, wurde im Verlauf der vorliegenden Arbeit ein murines Modell eingesetzt. Hierbei wurde die Auswirkung der Inhalation von Sevofluran auf die Interaktion und Aktivierung von Thrombozyten und Granulozyten in einem etablierten Modell der Leber IR in der Maus [77] untersucht. Ischämie und Reperfusionsszenarien der Leber treten vor allem während

viszeralchirurgischen Eingriffen oder während Lebertransplantationen auf. Eine verminderte Perfusion der Leber kann auch während eines Herz-Kreislaufstillstands bzw. während Schockzuständen auftreten. Durch die transiente Hypoxie des Gewebes und die anschließende Reperfusion kann es zur Aktivierung von Entzündungszellen und zur Freisetzung verschiedener Entzündungsmediatoren kommen. Diese Pathomechanismen können schlussendlich zur Ausbildung systemischer Inflammation bis hin zu einem lebensbedrohlichen Multiorganversagen des betroffenen Patienten führen [64, 65].

Pathomechanistisch tragen insbesondere in das Gewebe migrierende Granulozyten und Thrombozyten zur Schädigung des Lebergewebes bei [65, 67]. Daher sollte die Aktivierung und Interaktion von Thrombozyten und Granulozyten in der vorliegenden Arbeit genauer betrachtet werden.

Um den potenziell antiinflammatorischen Signalweg von Sevofluran über Adora2b genauer zu charakterisieren, wurden hierzu zusätzlich zu Wildtypen Adora2b^{-/-} Tiere eingesetzt und die jeweiligen Versuchsgruppen verglichen.

Vorhandene Studien diskutierten in verschiedenen murinen Knockout Modellen den anti-inflammatorischen Signalweg über Adora2b. Diese Ergebnisse zeigten bereits, dass durch Adora2b^{-/-} eine deutlich gesteigerte endotheliale Inflammation sowie eine vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen mit Störungen der Gefäßpermeabilität und gesteigerter Thrombozytenaggregation in der Mikrozirkulation auftrat [53, 54]. Des Weiteren wurde bei Adora2b-Defizienz eine gesteigerte Transmigration und Adhäsion von Granulozyten festgestellt [54]. Dahingegen konnte bei Defizienz der Adenosinrezeptoren Adora1, Adora2a und Adora3 keine vermehrte Schädigung des Leberparenchyms, verglichen mit den jeweiligen Kontrollgruppen, durch Leber IR detektiert werden [56]. Daraus lässt sich schließen, dass das Vorhandensein und die Aktivierung von Adora2b im Parenchym zu einer Protektion der Leber während Leber IR beiträgt.

In der vorliegenden Studie konnte der Mechanismus der antiinflammatorischen Wirkung von Sevofluran näher charakterisiert werden. Die Ergebnisse weisen

Diskussion

darauf hin, dass Adora2b eine wichtige mechanistische Rolle im antiinflammatorischen Wirkmechanismus von Sevofluran spielt.

Sevofluran inhibierte in vivo die proinflammatorische Interaktion von Thrombozyten und Granulozyten. Dieser protektive Effekt von Sevofluran auf die Bildung von TGK konnte in Adora2b^{-/-} Tieren nicht beobachtet werden. Des Weiteren senkte Sevofluran die Thrombozytenaktivierung, dargestellt mittels des Thrombozytenaktivierungsmarkers P-Selektin und Aktivierung des thrombozytären GP IIb/IIIa Rezeptors. Diese antiinflammatorischen Effekte konnten wiederum in Adora2b^{-/-} Tieren nicht reproduziert werden. Jedoch bewirkte die Inhalation von Sevofluran keine signifikante Reduzierung der Granulozytenaktivierung, dargestellt durch die Expression des leukozytären Integrins Mac-1.

Um in dem murinen Leber IR Modell die systemischen Auswirkungen des IR-Schadens genauer zu analysieren, wurden plasmatische Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine bestimmt. Hierbei zeigte sich eine deutlich verringerte Konzentration von IL-6 und KC nach Applikation von Sevofluran während Leber IR in Wildtyp Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dieser inhibierende Effekt von Sevofluran auf die IL-6 Produktion wurde in Adora2b^{-/-} Tieren nicht beobachtet, was vermuten lässt, dass dieser anti-inflammatorische Effekt über Adora2b vermittelt wird. Interessanterweise wurde die plasmatische KC-Konzentration auch in Adora2b^{-/-} Tieren durch Sevofluran signifikant gesenkt. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass weitere Signalwege außerhalb des Rezeptors Adora2b an der antiinflammatorischen Wirkung von Sevofluran beteiligt sind.

Abschließend wurden zur weiteren mechanistischen Analyse der Vermittlung protektiver Eigenschaften von Sevofluran im Modell der Leber IR über den Rezeptor Adora2b, Adora2a-defiziente Tiere untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass Sevofluran sowohl in den Wildtypen, als auch in den Adora2a^{-/-} Tieren protektive Eigenschaften entfalten kann. Sevofluran reduzierte hierbei auch in Adora2a^{-/-} Mäusen die IR-assoziierte Bildung proinflammatorischer TGK signifikant. Zudem konnte die Inhalation von Sevofluran während Leber IR in

Diskussion

Adora2a-defizienten Tieren die Ausschüttung der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und KC analog zu den Wildtypen hemmen. Diese Erkenntnisse festigen die Hypothese, dass Sevofluran inhibitorisch auf die Interaktion und Aktivierung von Thrombozyten und Granulozyten über die Interaktion mit Adora2b und nicht über weitere Adenosinrezeptoren, wie Adora2a, wirkt.

In weiteren Studien wurde beschrieben, dass über Adora2b auch direkt organprotektive Effekte wie z.B. im Rahmen von IR in Myokard und Leber vermittelt werden. Auch in Modellen der systemischen Inflammation zeigten Tiere mit Adora2b-Defizienz einen stärker ausgeprägten Parenchymschaden [50, 55, 56].

Diese Erkenntnisse konnten in einem hier verwendeten Modell der Leber IR in der Maus bestätigt werden. Der Parenchymschaden, ausgedrückt als Erhöhung der spezifischen Lebertransaminase ALT, welche durch Nekrose von Hepatozyten freigesetzt werden, konnte durch die Inhalation von Sevofluran signifikant verringert werden. In Adora2b^{-/-} Mäusen konnte die Verringerung der plasmatischen ALT-Konzentration durch Sevofluran nicht beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass Sevofluran über Adora2b protektiv auf das Leberparenchym wirkt.

Um diesen Effekt auf zellulärer Ebene zu charakterisieren, wurde in dieser Arbeit als nächster Schritt die Migration proinflammatorischer TGK in das Leberparenchym betrachtet. Hierbei bestätigte sich der protektive Effekt von Sevofluran auf das Gewebe: In Tieren mit Sevofluran Inhalation migrierten signifikant weniger TGK in das Leberparenchym, was einen geringeren inflammatorischen Gewebedefekt impliziert. Diese Beobachtung konnte in Adora2b^{-/-} Tieren wiederum nicht reproduziert werden. Daraufhin lässt sich schließen, dass Sevofluran über eine Interaktion mit Adora2b anti-inflammatorisch und organprotektiv, ausgedrückt als verminderte TGK-Rekrutierung in das Leberparenchym, agiert.

Zudem wurde von Aherne et al. beobachtet, dass eine gesteigerte Expression von Adora2b während Hypoxie und Inflammation auftrat [54]. Daher war ein weiteres Ziel dieser Studie zu untersuchen, ob auch Sevofluran zu einer

Diskussion

gesteigerten Adora2b Expression im Gewebe führt. Erste Experimente bestätigten, dass Leber IR assoziierte Inflammation und Hypoxie des Leberparenchyms zu einer gesteigerten Expression von Adora2b im Gewebe führen. Alleinige Sevofluran Inhalation führte zu einer deutlich gesteigerten Adora2b Expression im Lebergewebe im Vergleich zu mit Raumluft beatmeten Tieren. Sevofluranexposition während Leber IR verursachte zudem ebenfalls eine signifikant gesteigerte Adora2b Expression. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Sevofluran die Expression des antiinflammatorisch agierenden Adora2b steigert und somit die protektive Antwort über Adora2b potenzieren kann.

Insgesamt erweitern die Ergebnisse dieser Studie, zusammen mit den bereits veröffentlichten Erkenntnissen, das Verständnis über die antiinflammatorischen Signalwege von Sevofluran. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Sevofluran antiinflammatorisch und organprotektiv über die Interaktion mit Adora2b wirken kann. Durch dieses Verständnis könnte der klinische Einsatz von Sevofluran in bestimmten Krankheitsstadien intensivmedizinischer Patienten zu einer Reduktion von postoperativen Komplikationen führen und damit die Mortalität und Morbidität reduzieren. Sevofluran könnte dabei gezielt als volatiles Narkotikum während Operationen, welche den Einsatz von EKZ benötigen oder welche ein erhöhtes Risiko für Ischämien tragen, wie z.B. während Lebertransplantationen, eingesetzt werden.

Durch eine gezielte Applikation von Sevofluran könnten unter klinischen Bedingungen einsetzbare Möglichkeiten entwickelt werden, um Komplikationen der systemischen Inflammation, u.a. potenziert durch zirkulierende TGK, während EKZ oder durch IR Ereignisse zu reduzieren. Somit könnte durch eine abgeschwächte systemische Inflammation und einem weniger ausgeprägten Parenchymschaden lebenswichtiger Organe die Mortalität und Morbidität von Patienten auf Intensivstationen gesenkt und die Prognose dieser Patienten verbessert werden.

Diskussion

Um Sevofluran gezielt zur Protektion gegen systemische Inflammation in den klinischen Alltag zu integrieren müssen jedoch noch unbekannte Faktoren in weiteren Studien untersucht werden.

Einige Ergebnisse dieser Studie weisen bereits darauf hin, dass die Interaktion von Sevofluran mit Adora2b nur einer von mehreren noch nicht genau beschriebenen Signalwegen der antiinflammatorischen Wirkung von Sevofluran darstellt. Es wurde bereits postuliert, dass Sevofluran über weitere Signalwege die Funktion von Leukozyten beeinflussen kann. Yuki et al. beschrieb, dass Sevofluran, über die Bindung an ein spezifisches Antigen (LFA-1) auf Leukozyten, die Bindungsmöglichkeiten dieser Entzündungszellen allosterisch inhibiert [36]. Zudem wurde beschrieben, dass Sevofluran intrazelluläre proinflammatorische Kaskaden über die Inhibition von Transkriptionsfaktoren, wie z.B. NFkB, in Nierengewebe hemmt [36, 81].

Diese und weitere Signalwege von Sevofluran sollten in weiteren Studien genauer evaluiert werden, um anschließend die antiinflammatorische Wirkung von Sevofluran sicher in klinischen Studien analysieren zu können. Jedoch identifizieren die Ergebnisse dieser und bereits vorhandener Untersuchungen Adora2b als einen wichtigen Signalweg der protektiven Wirkung von Sevofluran und erweitern damit die Erkenntnisse über das Wirkspektrum dieser Substanz. Zudem könnten weitere Studien auch den Einsatz eines spezifischen Adora2b-Agonisten untersuchen, welcher auch außerhalb der Anästhesie angewendet werden könnte. In einem bereits durchgeführten Tiermodell der hepatischen Inflammation konnte gezeigt werden, dass ein Adora2b-Agonist die Parenchymschädigung vermindert [56]. Bevor ein Adora2b-Agonist systemisch in klinischen Studien eingesetzt werden könnte, müssen jedoch noch weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Da Adora2b nicht nur auf Hepatozyten, sondern auch in diversen anderen Zelltypen und Organsystemen exprimiert wird, könnten diverse nicht vorhersehbare Nebenwirkungen auftreten. Um systemische Nebenwirkungen zu umgehen, könnte daher auch eine gezielte Applikation eines Adora2b-Agonisten in das jeweilige Gewebe erfolgen. Ein derartiger Ansatz wurde bereits in einem murinen Modell der LPS-induzierten akuten Lungenschädigung durch Hoegl et al. demonstriert. In dieser Studie

Diskussion

fürte die gezielte Inhalation eines spezifischen Adora2b-Agonisten zu einer Verminderung der inflammatorischen Lungenschädigung [82].

Weitere Studien sollten auch die Rolle von Adora1, Adora2a und Adora3 im Setting der antiinflammatorischen Signalkaskaden und der Interaktion von Sevofluran mit diesen Rezeptoren näher untersuchen.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Fokus auf Adora2b gelegt. Die Ergebnisse zeigen eine deutliche Inhibition von systemischer Inflammation durch Sevofluran über Interaktion mit diesem Rezeptor. Es konnte zudem gezeigt werden, dass Sevofluran auch in Adora2a-defizienten Tieren einen protektiven Effekt auf die Interaktion von Thrombozyten und Granulozyten im Modell der Leber IR bewirkt. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Interaktion mit Adora2a nicht zu der antiinflammatorischen Wirkung von Sevofluran beiträgt.

5 Zusammenfassung

Sowohl das systemische Inflammationssyndrom (SIRS) als auch eine durch Mikroorganismen ausgelöste Sepsis stellen bis heute eine große therapeutische Herausforderung in der Intensivmedizin dar. Systemische Inflammation kann einerseits durch freigesetzte Toxine im Rahmen einer Infektion aber auch durch nicht infektiöse Ursachen ausgelöst werden. Hierbei spielen vor allem Parenchymschäden durch Ischämie und auch Ischämie-Reperfusionsschäden, welche während herzchirurgischer Operationen, nach Kreislaufchockzuständen und im Rahmen von Organresektionen sowie Transplantationen auftreten eine pathomechanistische Rolle.

Während systemischer Inflammation kommt es zu einer Störung des Gleichgewichts pro- und antiinflammatorischer Vorgänge im Körper. Ein zentraler Pathomechanismus ist hierbei eine Aktivierung und Interaktion von Thrombozyten und Leukozyten, welche durch proinflammatorische Mediatoren induziert wird. Folglich wird die Freisetzung von proinflammatorischen und prokoagulatorischen Mediatoren gesteigert. Die Aktivierung und Interaktion von Thrombozyten und Leukozyten ist somit ein wichtiger Faktor in der Entstehung und Aufrechterhaltung des Inflammationsgeschehens. Zudem werden Thrombozyten-Granulozyten Komplexe in der Mikrozirkulation sequestriert. Dies fördert die Migration von Granulozyten in das umliegende Gewebe und führt somit zu einer vermehrten Parenchymschädigung in dem betroffenen Organ. Diese Vorgänge können schlussendlich bis zu einem lebensbedrohlichen Organversagen des betroffenen Patienten führen.

Bis dato gibt es noch keine kausale Behandlungsstrategie gegen diese komplexen pathophysiologischen Vorgänge. Aus diesem Grund ist systemische Inflammation weiterhin ein wichtiger kausaler Faktor in der Erhöhung der Morbidität und Mortalität bei intensivmedizinischen Patienten.

Inhalativen Anästhetika, wie dem volatilen Anästhetikum Sevofluran, werden in der Literatur antiinflammatorische Eigenschaften zugeschrieben. Hierbei konnte gezeigt werden, dass Sevofluran die Aktivierung und Interaktion von

Zusammenfassung

Thrombozyten und Leukozyten inhibiert und im Rahmen von Ischämie und Reperfusionsszenarien organprotektive Eigenschaften besitzt. Der genaue Mechanismus dieser Wirkung ist jedoch bis heute nicht vollständig erklärbar.

Das Nukleosid Adenosin ist ein potentes extrazelluläres Signalmolekül, welches unter physiologischen Bedingungen über die Interaktion mit spezifischen Rezeptoren antiinflammatorische Effekte vermittelt und daher eine wichtige Rolle im Inflammationsgeschehen besitzt. Im Rahmen dieser antiinflammatorischen Wirkung von Adenosin sind unter anderem die Adenosinrezeptoren Adora2a und Adora2b bedeutend. Adenosin kann die Thrombozytenaggregation und die proinflammatorische Adhäsion und Migration aktivierter Granulozyten in das umliegende Gewebe inhibieren. Aus früheren experimentellen Studien ist bekannt, dass Sevofluran mit Adenosinrezeptoren interagiert. Eine Interaktion von Sevofluran mit Adenosinrezeptoren im Rahmen systemischer Inflammation könnte zum Mechanismus der antiinflammatorischen Wirkung dieses volatilen Anästhetikums beitragen.

In dieser Arbeit wurden zwei häufige Ursachen systemischer Inflammation betrachtet. Einerseits die extrakorporale Zirkulation (EKZ), welche vor allem während herzchirurgischer Operationen und bei kritisch herzinsuffizienten Patienten als Kreislaufunterstützung eingesetzt wird. Andererseits Ischämie und Reperfusion (IR) der Leber, welche vor allem bei Lebertransplantationen bzw. -resektionen aber auch im Rahmen von Kreislaufschockzuständen auftritt. Zur Verifizierung eines potentiell protektiven Effektes von Sevofluran wurde vorerst der Effekt von Sevofluran auf die Interaktion und Aktivierung von Thrombozyten und Leukozyten unter in vitro Bedingungen betrachtet. Hierbei wurde Humanblut mit dem Thrombozytenaktivator ADP stimuliert und anschließend durchflusszytometrisch die Expression proinflammatorischer Epitope und Aktivierungsmarker auf Leukozyten und Thrombozyten gemessen sowie die Komplexbildung beider Zelltypen analysiert. Weiterhin wurde in einem ex vivo Modell der EKZ Humanblut mit und ohne Sevofluranapplikation in einem PVC Schlauch zirkuliert und anschließend erneut durchflusszytometrisch die Aktivierung von Thrombozyten und Leukozyten untersucht.

Zusammenfassung

Zur Betrachtung des antiinflammatorischen Effektes von Sevofluran unter Bedingungen von Leber IR in vivo wurde ein etabliertes Mausmodell eingesetzt. In diesem Modell wird über eine Laparotomie die Leber präpariert und durch vorübergehenden, partiellen Verschluss der Perfusion ein Leber IR Schaden erzeugt. Anschließend wird die Aktivierung und Interaktion von Thrombozyten und Granulozyten durchflusszytometrisch bestimmt sowie die Schädigung des Leberparenchyms beurteilt.

Um die Rolle von Adenosinrezeptoren während der Vermittlung antiinflammatorischer Effekte von Sevofluran in diesen Modellen zu betrachten, wurden im EKZ Modell Adenosinrezeptor Antagonisten sowie Adora2a^{-/-} und Adora2b^{-/-} Mäuse verwendet.

Es zeigte sich, dass Sevofluran inhibierend auf die Aktivierung und Interaktion von Thrombozyten und Granulozyten wirkt. Sevofluran konnte in den beschriebenen Modellen die Bildung proinflammatorischer Thrombozyten-Granulozyten Komplexe signifikant reduzieren, was in direktem Zusammenhang mit verminderter systemischer Inflammation und milderem Parenchymschaden lebenswichtiger Organe steht. Zudem konnte eine Reduktion der Thrombozytenaktivierung, dargestellt als gesenkte Expression des Thrombozytenaktivierungsmarkers P-Selektin, durch Sevofluranapplikation erreicht werden. Des Weiteren inhibierte Sevofluran in vivo die Aktivierung des thrombozytären GP IIb/IIIa Rezeptors. Auch auf die Aktivierung von Granulozyten hatte Sevofluran einen inhibierenden Effekt, indem das proinflammatorische Integrin Mac-1 (CD11b/CD18) vermindert exprimiert wurde. Während Leber IR in vivo reduzierte Sevofluran zudem die Plasmaspiegel der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und KC. Zusätzlich konnte in der vorliegenden Arbeit auch eine organprotektive Komponente von Sevofluran bestätigt werden. Die Inhalation von Sevofluran während Leber IR reduzierte die Serumspiegel der Lebertransaminase ALT, was eine verminderte Zellnekrose von Hepatozyten ausdrückt. Zudem konnte mikroskopisch eine Inhibition der Migration proinflammatorischer Thrombozyten-Granulozyten

Zusammenfassung

Komplexe in das Leberparenchym und damit eine verminderte Zerstörung der Organstrukturen durch die Applikation von Sevofluran erreicht werden.

Um den exakten Signalweg dieser protektiven Wirkung von Sevofluran genauer zu evaluieren, wurden unter der Kenntnis, dass Sevofluran mit Adenosinrezeptoren interagieren kann, die potentiell antiinflammatorisch wirkenden Adenosinrezeptoren Adora2a und Adora2b genauer betrachtet. In Adora2a^{-/-} Tieren bewirkte Sevofluran, ähnlich wie in Wildtypen, einen antiinflammatorischen Effekt. Jedoch konnten sowohl in in vitro als auch in vivo Experimenten mittels Einsatz von Adora2b Antagonisten bzw. Adora2b^{-/-} Tieren, die beschriebenen antiinflammatorischen und organprotektiven Effekte von Sevofluran aufgehoben werden. Dies gibt einen deutlichen Hinweis darauf, dass Sevofluran antiinflammatorisch und organprotektiv über Adora2b agiert. Diese Hypothese wird zusätzlich durch die Beobachtung gestärkt, dass Sevofluran Inhalation während Leber IR die Expression von Adora2b in Hepatozyten deutlich steigert.

Einige Ergebnisse zeigten jedoch, dass auch andere Signalwege für die Inhibition systemischer Inflammation durch Sevofluran in Frage kommen. Diese noch nicht vollständig erklärbaren Mechanismen sollten in weiteren Untersuchungen genauer betrachtet werden.

In dieser Studie wurde somit der Adora2b Rezeptor als wichtiger Signalweg der antiinflammatorischen und organprotektiven Wirkung von Sevofluran identifiziert. Um die Möglichkeit zu prüfen, Sevofluran als potenziellen klinischen Therapieansatz gegen systemische Inflammation durch EKZ bzw. Leber IR zu verwenden, sollte als nächster Schritt eine klinische Studie mit gezielter Sevofluran Inhalation erfolgen. Zusammenfassend bestätigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit eine antiinflammatorische und organprotektive Wirkung von Sevofluran unter ex vivo Bedingungen im Rahmen systemischer Inflammation und EKZ sowie während Ischämie und Reperfusion der Leber in vivo.

6 Literaturverzeichnis

1. Martin, G.S., et al., *The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000*. N Engl J Med, 2003. **348**(16): p. 1546-54.
2. Melamed, A. and F.J. Sorvillo, *The burden of sepsis-associated mortality in the United States from 1999 to 2005: an analysis of multiple-cause-of-death data*. Crit Care, 2009. **13**(1): p. R28.
3. Wheeler, A.P. and G.R. Bernard, *Treating patients with severe sepsis*. N Engl J Med, 1999. **340**(3): p. 207-14.
4. Weycker, D., et al., *Long-term mortality and medical care charges in patients with severe sepsis*. Crit Care Med, 2003. **31**(9): p. 2316-23.
5. Engel, C., et al., *Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study*. Intensive Care Med, 2007. **33**(4): p. 606-18.
6. Funk, D.J., J.E. Parrillo, and A. Kumar, *Sepsis and septic shock: a history*. Crit Care Clin, 2009. **25**(1): p. 83-101, viii.
7. Kreymann, G. and M. Wolf, *[History and definition of sepsis--do we need new terminology?]*. Anasthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther, 1996. **31**(1): p. 9-14.
8. *American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis*. Crit Care Med, 1992. **20**(6): p. 864-74.
9. Levy, M.M., et al., *2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference*. Crit Care Med, 2003. **31**(4): p. 1250-6.
10. Singer, M., et al., *The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)*. JAMA, 2016. **315**(8): p. 801-10.
11. Dabrowska, A.M. and R. Slotwinski, *The immune response to surgery and infection*. Cent Eur J Immunol, 2014. **39**(4): p. 532-7.
12. Balk, R.A., *Systemic inflammatory response syndrome (SIRS): where did it come from and is it still relevant today?* Virulence, 2014. **5**(1): p. 20-6.
13. Bone, R.C., *The pathogenesis of sepsis*. Ann Intern Med, 1991. **115**(6): p. 457-69.

Literaturverzeichnis

14. Rondina, M.T., A.S. Weyrich, and G.A. Zimmerman, *Platelets as cellular effectors of inflammation in vascular diseases*. *Circ Res*, 2013. **112**(11): p. 1506-19.
15. Steffens, S., F. Montecucco, and F. Mach, *The inflammatory response as a target to reduce myocardial ischaemia and reperfusion injury*. *Thromb Haemost*, 2009. **102**(2): p. 240-7.
16. Kishimoto, T., *IL-6: from its discovery to clinical applications*. *Int Immunol*, 2010. **22**(5): p. 347-52.
17. Partrick, D.A., et al., *Jack A. Barney Resident Research Award winner. The inflammatory profile of interleukin-6, interleukin-8, and soluble intercellular adhesion molecule-1 in postinjury multiple organ failure*. *Am J Surg*, 1996. **172**(5): p. 425-9; discussed 429-31.
18. Hol, J., L. Wilhelmsen, and G. Haraldsen, *The murine IL-8 homologues KC, MIP-2, and LIX are found in endothelial cytoplasmic granules but not in Weibel-Palade bodies*. *J Leukoc Biol*, 2010. **87**(3): p. 501-8.
19. Herter, J.M., J. Rossaint, and A. Zarbock, *Platelets in inflammation and immunity*. *J Thromb Haemost*, 2014. **12**(11): p. 1764-75.
20. Rossaint, J. and A. Zarbock, *Platelets in leucocyte recruitment and function*. *Cardiovasc Res*, 2015. **107**(3): p. 386-95.
21. Zarbock, A., R.K. Polanowska-Grabowska, and K. Ley, *Platelet-neutrophil-interactions: linking hemostasis and inflammation*. *Blood Rev*, 2007. **21**(2): p. 99-111.
22. Diacovo, T.G., et al., *Neutrophil rolling, arrest, and transmigration across activated, surface-adherent platelets via sequential action of P-selectin and the beta 2-integrin CD11b/CD18*. *Blood*, 1996. **88**(1): p. 146-57.
23. Alves-Filho, J.C., et al., *The role of neutrophils in severe sepsis*. *Shock*, 2008. **30 Suppl 1**: p. 3-9.
24. van Willigen, G. and J.W. Akkerman, *Protein kinase C and cyclic AMP regulate reversible exposure of binding sites for fibrinogen on the glycoprotein IIB-IIIA complex of human platelets*. *Biochem J*, 1991. **273**(Pt 1): p. 115-20.
25. Ma, Y.Q., J. Qin, and E.F. Plow, *Platelet integrin alpha(IIb)beta(3): activation mechanisms*. *J Thromb Haemost*, 2007. **5**(7): p. 1345-52.
26. Peters, M.J., et al., *Circulating platelet-neutrophil complexes represent a subpopulation of activated neutrophils primed for adhesion, phagocytosis and intracellular killing*. *Br J Haematol*, 1999. **106**(2): p. 391-9.

27. Patko, Z., et al., *Roles of Mac-1 and glycoprotein IIb/IIIa integrins in leukocyte-platelet aggregate formation: stabilization by Mac-1 and inhibition by GpIIb/IIIa blockers*. *Platelets*, 2012. **23**(5): p. 368-75.
28. Sreeramkumar, V., et al., *Neutrophils scan for activated platelets to initiate inflammation*. *Science*, 2014. **346**(6214): p. 1234-8.
29. Jones, R.M., *Desflurane and sevoflurane: inhalation anaesthetics for this decade?* *Br J Anaesth*, 1990. **65**(4): p. 527-36.
30. Joshi, G.P., *Inhalational techniques in ambulatory anesthesia*. *Anesthesiol Clin North America*, 2003. **21**(2): p. 263-72.
31. Dikmen, Y., et al., *Pulmonary mechanics during isoflurane, sevoflurane and desflurane anaesthesia*. *Anaesthesia*, 2003. **58**(8): p. 745-8.
32. De Hert, S.G., et al., *Cardioprotective properties of sevoflurane in patients undergoing coronary surgery with cardiopulmonary bypass are related to the modalities of its administration*. *Anesthesiology*, 2004. **101**(2): p. 299-310.
33. Kowalski, C., et al., *Halothane, isoflurane, and sevoflurane reduce postischemic adhesion of neutrophils in the coronary system*. *Anesthesiology*, 1997. **86**(1): p. 188-95.
34. Kidani, Y., et al., *Sevoflurane pretreatment inhibits endotoxin-induced shock in rats*. *Anesth Analg*, 2005. **101**(4): p. 1152-6.
35. Schmid, E., et al., *The volatile anesthetic sevoflurane inhibits activation of neutrophil granulocytes during simulated extracorporeal circulation*. *Int Immunopharmacol*, 2012. **14**(2): p. 202-8.
36. Yuki, K., et al., *Sevoflurane binds and allosterically blocks integrin lymphocyte function-associated antigen-1*. *Anesthesiology*, 2010. **113**(3): p. 600-9.
37. Yuki, K., et al., *Volatile anesthetics, not intravenous anesthetic propofol bind to and attenuate the activation of platelet receptor integrin alphaIIb beta3*. *PLoS One*, 2013. **8**(4): p. e60415.
38. Wacker, J., et al., *Delayed inhibition of agonist-induced granulocyte-platelet aggregation after low-dose sevoflurane inhalation in humans*. *Anesth Analg*, 2008. **106**(6): p. 1749-58.
39. Huang, G.S., et al., *Sevoflurane anesthesia attenuates adenosine diphosphate-induced P-selectin expression and platelet-leukocyte conjugate formation*. *Anesth Analg*, 2004. **99**(4): p. 1121-6, table of contents.

Literaturverzeichnis

40. Anderson, S.L., T. Duke-Novakovski, and B. Singh, *The immune response to anesthesia: part 1*. *Vet Anaesth Analg*, 2014. **41**(2): p. 113-26.
41. Nader, N.D., et al., *Anesthetic myocardial protection with sevoflurane*. *J Cardiothorac Vasc Anesth*, 2004. **18**(3): p. 269-74.
42. Bonney, S., K. Hughes, and T. Eckle, *Anesthetic cardioprotection: the role of adenosine*. *Curr Pharm Des*, 2014. **20**(36): p. 5690-5.
43. Chappell, D., et al., *Sevoflurane reduces leukocyte and platelet adhesion after ischemia-reperfusion by protecting the endothelial glycocalyx*. *Anesthesiology*, 2011. **115**(3): p. 483-91.
44. Zhou, S.P., et al., *Protective effect of sevoflurane on hepatic ischaemia/reperfusion injury in the rat: A dose-response study*. *Eur J Anaesthesiol*, 2013. **30**(10): p. 612-7.
45. Reutershan, J., et al., *Protective effects of isoflurane pretreatment in endotoxin-induced lung injury*. *Anesthesiology*, 2006. **104**(3): p. 511-7.
46. Herrmann, I.K., et al., *Volatile anesthetics improve survival after cecal ligation and puncture*. *Anesthesiology*, 2013. **119**(4): p. 901-6.
47. Drury, A.N. and A. Szent-Gyorgyi, *The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart*. *J Physiol*, 1929. **68**(3): p. 213-37.
48. Eltzschig, H.K., *Adenosine: an old drug newly discovered*. *Anesthesiology*, 2009. **111**(4): p. 904-15.
49. Hasko, G., et al., *Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases*. *Nat Rev Drug Discov*, 2008. **7**(9): p. 759-70.
50. Roberts, V., J. Stagg, and K.M. Dwyer, *The Role of Ectonucleotidases CD39 and CD73 and Adenosine Signaling in Solid Organ Transplantation*. *Front Immunol*, 2014. **5**: p. 64.
51. Iyu, D., et al., *Adenosine derived from ADP can contribute to inhibition of platelet aggregation in the presence of a P2Y12 antagonist*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011. **31**(2): p. 416-22.
52. Eltzschig, H.K., et al., *Endogenous adenosine produced during hypoxia attenuates neutrophil accumulation: coordination by extracellular nucleotide metabolism*. *Blood*, 2004. **104**(13): p. 3986-92.
53. Yang, D., et al., *A new role for the A2b adenosine receptor in regulating platelet function*. *J Thromb Haemost*, 2010. **8**(4): p. 817-27.

Literaturverzeichnis

54. Aherne, C.M., E.M. Kewley, and H.K. Eltzschig, *The resurgence of A2B adenosine receptor signaling*. *Biochim Biophys Acta*, 2011. **1808**(5): p. 1329-39.
55. Chouker, A., et al., *In vivo hypoxic preconditioning protects from warm liver ischemia-reperfusion injury through the adenosine A2B receptor*. *Transplantation*, 2012. **94**(9): p. 894-902.
56. Zimmerman, M.A., et al., *Signaling through hepatocellular A2B adenosine receptors dampens ischemia and reperfusion injury of the liver*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. **110**(29): p. 12012-7.
57. Gravlee, G.P., *Cardiopulmonary bypass : principles and practice*. 3rd ed. 2008, Philadelphia, PA: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins. xv, 783 p.
58. Pastuszko, P. and R.N. Edie, *John H. Gibbon, Jr., the inventor of the first successful heart-lung machine*. *J Card Surg*, 2004. **19**(1): p. 65-73.
59. Gibbon, J.H., Jr., *Application of a mechanical heart and lung apparatus to cardiac surgery*. *Minn Med*, 1954. **37**(3): p. 171-85; passim.
60. Baehner, T., et al., *[Cardiopulmonary bypass in cardiac surgery]*. *Anaesthesist*, 2012. **61**(10): p. 846-56.
61. Kraft, F., et al., *Inflammatory response and extracorporeal circulation*. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*, 2015. **29**(2): p. 113-23.
62. Straub, A., et al., *Evidence of platelet activation at medically used hypothermia and mechanistic data indicating ADP as a key mediator and therapeutic target*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011. **31**(7): p. 1607-16.
63. Rossaint, J., et al., *Cardiopulmonary bypass during cardiac surgery modulates systemic inflammation by affecting different steps of the leukocyte recruitment cascade*. *PLoS One*, 2012. **7**(9): p. e45738.
64. Zhai, Y., et al., *Ischaemia-reperfusion injury in liver transplantation--from bench to bedside*. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2013. **10**(2): p. 79-89.
65. Eltzschig, H.K. and T. Eckle, *Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation*. *Nat Med*, 2011. **17**(11): p. 1391-401.
66. Guan, L.Y., et al., *Mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and protective effects of nitric oxide*. *World J Gastrointest Surg*, 2014. **6**(7): p. 122-8.
67. Abu-Amara, M., et al., *Liver ischemia/reperfusion injury: processes in inflammatory networks--a review*. *Liver Transpl*, 2010. **16**(9): p. 1016-32.

Literaturverzeichnis

68. Lisman, T. and R.J. Porte, *The role of platelets in liver inflammation and regeneration*. Semin Thromb Hemost, 2010. **36**(2): p. 170-4.
69. Graham, M.D., *The Coulter principle: Imaginary origins*. Cytometry A, 2013. **83**(12): p. 1057-61.
70. Straub, A., et al., *Selective inhibition of the platelet phosphoinositide 3-kinase p110beta as promising new strategy for platelet protection during extracorporeal circulation*. Thromb Haemost, 2008. **99**(3): p. 609-15.
71. Murphy, G.S., E.A. Hessel, 2nd, and R.C. Groom, *Optimal perfusion during cardiopulmonary bypass: an evidence-based approach*. Anesth Analg, 2009. **108**(5): p. 1394-417.
72. Konrad, F.M., et al., *Protective effects of pentoxifylline in pulmonary inflammation are adenosine receptor A2A dependent*. FASEB J, 2013. **27**(9): p. 3524-35.
73. Granja, T., et al., *Using six-colour flow cytometry to analyse the activation and interaction of platelets and leukocytes--A new assay suitable for bench and bedside conditions*. Thromb Res, 2015. **136**(4): p. 786-96.
74. Gawaz, M.P., *Blood Platelets*. 2001, Stuttgart: Thieme.
75. Eckle, T., et al., *Cardioprotection by ecto-5'-nucleotidase (CD73) and A2B adenosine receptors*. Circulation, 2007. **115**(12): p. 1581-90.
76. Ledent, C., et al., *Aggressiveness, hypoalgesia and high blood pressure in mice lacking the adenosine A2a receptor*. Nature, 1997. **388**(6643): p. 674-8.
77. Hart, M.L., et al., *Use of a hanging-weight system for liver ischemic preconditioning in mice*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2008. **294**(6): p. G1431-40.
78. Fox, S.C., M.W. Behan, and S. Heptinstall, *Inhibition of ADP-induced intracellular Ca²⁺ responses and platelet aggregation by the P2Y₁₂ receptor antagonists AR-C6931MX and clopidogrel is enhanced by prostaglandin E₁*. Cell Calcium, 2004. **35**(1): p. 39-46.
79. Marquis, N.R., R.L. Vigdahl, and P.A. Tavormina, *Platelet aggregation. I. Regulation by cyclic AMP and prostaglandin E₁*. Biochem Biophys Res Commun, 1969. **36**(6): p. 965-72.
80. Kohler, D., et al., *Phosphorylation of vasodilator-stimulated phosphoprotein prevents platelet-neutrophil complex formation and dampens myocardial ischemia-reperfusion injury*. Circulation, 2011. **123**(22): p. 2579-90.

Literaturverzeichnis

81. Lee, H.T., et al., *Anti-inflammatory and antinecrotic effects of the volatile anesthetic sevoflurane in kidney proximal tubule cells*. Am J Physiol Renal Physiol, 2006. **291**(1): p. F67-78.
82. Hoegl, S., et al., *Alveolar Epithelial A2B Adenosine Receptors in Pulmonary Protection during Acute Lung Injury*. J Immunol, 2015. **195**(4): p. 1815-24.

7 Erklärung zum Eigenanteil

Diese Studie wurde von Prof. Dr. med. Peter Rosenberger und PD Dr. med. Andreas Straub ausgearbeitet. Zusätzliche Ideen zur Umsetzung dieses Projekts stammen von Dr. rer. nat. David Köhler und Dr. rer. nat. Tiago Granja.

Die beschriebenen Versuche wurden von mir mit Unterstützung und nach der Einarbeitung in die verwendeten Methoden durch Tiago Granja und Claudia Bernardo de Oliveira Franz durchgeführt. Die Operation im Tiermodell der Leber-Ischämie und Reperfusion in der Maus wurde von David Köhler durchgeführt. Zudem unterstützte ich in allen weiteren tierexperimentellen Versuchen Tiago Granja bei der Durchführung.

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte nach Anleitung von Tiago Granja und Andreas Straub.

Abschließend versichere ich, die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst zu haben. Zur Verfassung des Textes wurden die angegebenen Quellen verwendet. Darüber hinaus wurden keine weiteren Quellen benutzt.

Stuttgart, den 22.09.18

8 Veröffentlichungen

8.1 Publikationen

Granja T, Schad J, Schüssel P, Fischer C, Häberle H, Rosenberger P, Straub A: Using six-colour flow cytometry to analyse the activation and interaction of platelets and leukocytes - A new assay suitable for bench and bedside conditions. *Thromb Res* 2015, 136(4):786-796.

Tiago F. Granja, David Köhler; Jessica Schad; Claudia Bernardo de Oliveira Franz; Franziska Konrad, Michaela Hoch-Gutbrod; Ariane Streißenberger, Peter Rosenberger; Andreas Straub: The adenosine-receptor Adora2b plays a mechanistical role in the protective effect of the volatile anesthetic sevoflurane during liver ischemia/reperfusion. *Anesthesiology* 2016 Sep;125(3):547-60.

8.2 Poster und Vorträge

Jessica Schad, Tiago Granja, David Köhler, Peter Rosenberger, Andreas Straub (Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin, Eberhard-Karls Universität Tübingen): Einsatz der Anästhetika Sevofluran und Propofol zur Inhibition systemischer Inflammationsvorgänge. Posterpräsentation auf dem Forschungskolloquium der Medizinischen Fakultät am 9.10.2014, Tübingen, CRONA Klinikum Schnarrenberg.

Jessica Schad, Tiago Granja, David Köhler, Ariane Streißenberger, Peter Rosenberger, Andreas Straub (Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin, Eberhard-Karls Universität Tübingen): Der Adenosin-2B Rezeptor spielt eine wichtige mechanistische Rolle für den antiinflammatorischen Effekt von Sevofluran während Ischämie-Reperfusion der Leber.

1.Platz im wissenschaftlichen Vortragswettbewerb (grundlagenorientierte Forschung) auf dem Deutschen Anästhesie Kongress (07.05.2015, Düsseldorf).

9 Danksagung

Ich möchte mich sehr herzlich bei PD Dr. med. Andreas Straub für die exzellente Betreuung während der Planung und der Durchführung der Experimente für diese Studie, sowie für die Unterstützung bei der Ausarbeitung meiner Dissertation bedanken. Zudem gilt ebenfalls ein großer Dank Dr. rer. nat. Tiago Granja, welcher mich sehr gut in die verwendeten Methoden eingearbeitet hat und stets ein Ansprechpartner bei Fragen und Problemen vor Ort war. Ebenso möchte ich Dr. rer. nat. David Köhler danken, durch dessen große Expertise ich das Modell der Ischämie und Reperfusion in der Maus in meiner Studie verwenden konnte. Ein weiterer Dank gilt Ariane Streißenberger und Claudia Bernardo de Oliveira Franz, welche mich im Labor tatkräftig unterstützte.

Ich danke zudem Prof. Dr. med. Peter Rosenberger für die Hilfe während der Bewerbung für das IZKF Promotionskolleg und die umfassende Betreuung während der Anfertigung meiner Dissertation.

Ein Dank gilt ebenfalls dem IZKF Promotionskolleg der medizinischen Fakultät der Universität Tübingen, durch welches meine Arbeit von April 2014 bis April 2015 unterstützt wurde. Hier möchte ich besonders Prof. Dr. Marlies Knipper, Dr. Inka Montero und Pia-Sarah Henger für die freundliche Beratung während der Anfertigung meiner Arbeit danken.

Ein weiterer Dank gilt meinen Eltern und all meinen Freunden die mich während der Zeit tatkräftig unterstützt haben.