

Aus der Universitätsklinik für  
Anaesthesiologie und Intensivmedizin

**Die anti-inflammatorische Wirkung von Sevofluran in  
der Peritonitis-induzierten Sepsis und deren  
Abhängigkeit vom Adenosinrezeptor A2b**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**Fabian, Friederike Christine**

**2019**

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. J. Reutershan

2. Berichterstatter: Professor Dr. S. Wagner

Tag der Disputation: 08.02.2019

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>5</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>6</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>10</b>
1.1 Peritonitis . . . . .	10
1.2 Sepsis . . . . .	11
1.3 Neutrophile Granulozyten . . . . .	12
1.4 Adenosin und Inflammation . . . . .	15
1.5 Sevofluran . . . . .	17
1.6 Volatile Anästhetika und Adenosinrezeptoren . . . . .	18
1.7 Zymosan-induzierte Peritonitis . . . . .	19
1.8 Fragestellung . . . . .	20
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>22</b>
2.1 Material . . . . .	22
2.1.1 Antikörper . . . . .	22
2.1.2 Chemikalien . . . . .	23
2.1.3 Enzyme . . . . .	25
2.1.4 Geräte . . . . .	25
2.1.5 Verbrauchsmaterial . . . . .	27
2.1.6 Primer . . . . .	30
2.1.7 Medikamente . . . . .	30
2.1.8 Mäusestämme . . . . .	30
2.2 Methoden . . . . .	31
2.2.1 Induktion einer sterilen Peritonitis im Mausmodell . . . . .	31
2.2.2 Behandlung mit dem Inhalationsnarkotikum Sevofluran . . . . .	31
2.2.3 Quantifizierung der Einwanderung von PMNs in die verschiedenen Organe . . . . .	31
2.2.4 Analyse der Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle . . . . .	36
2.2.5 Myeloperoxidasebestimmung . . . . .	36

2.2.6	Proteinbestimmung nach BCA-Methode . . . . .	37
2.2.7	Histologie . . . . .	37
2.2.8	Real time q-PCR . . . . .	41
2.2.9	Western Blot . . . . .	42
2.2.10	Messung der Zytokin- und Chemokinkonzentration in der Peritoneallavage . . . . .	44
2.2.11	Knochenmarkstransplantation . . . . .	45
2.2.12	Fäzes-induzierte Peritonitis im Mausmodell . . . . .	46
2.2.13	Statistische Auswertung . . . . .	47
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>48</b>
3.1	Einfluss von Sevofluran auf die PMN-Migration bei Zymosan-induzierter Peritonitis . . . . .	48
3.1.1	Zeitpunkt der Sevofluran-Behandlung . . . . .	48
3.1.2	Zeitpunkt der PMN-Infiltration unter Zymosan ins Gewebe . . . . .	50
3.2	Veränderung des Migrationsverhaltens neutrophiler Granulozyten bei Wildtyp- und A2b-Knock-out Mäusen durch Sevofluran . . . . .	52
3.3	Immunhistochemie . . . . .	56
3.4	Real time quantitative Polymerase-Kettenreaktion (q-PCR) . . . . .	61
3.5	Proteinexpression des A2b-Rezeptors . . . . .	61
3.6	Einfluss von Sevofluran auf die Zytokinkonzentration . . . . .	62
3.7	Änderung der Expression von Adhäsionsmolekülen durch Sevofluran . . . . .	64
3.8	Migrationsverhalten neutrophiler Granulozyten bei Fäzes-induzierter Peritonitis . . . . .	68
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>70</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>82</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>84</b>
<b>7</b>	<b>Erklärung zum Eigenanteil</b>	<b>93</b>

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	PMN-Migration . . . . .	14
Abbildung 2:	Versuchsaufbau zur Sevofluran-Inhalation . . . . .	32
Abbildung 3:	Versuchsablauf . . . . .	32
Abbildung 4:	PMN-Migration bei verschiedenen Zeitpunkten der Sevofluran- Behandlung . . . . .	49
Abbildung 5:	MPO und Gesamtprotein bei verschiedenen Zeitpunkten der Sevofluran-Behandlung . . . . .	50
Abbildung 6:	PMN-Migration 4 und 24 Stunden nach Zymosan-Gabe . . . . .	51
Abbildung 7:	MPO und Gesamtprotein 4 und 24 Stunden nach Zymosan-Gabe	52
Abbildung 8:	PMN-Migration bei Wildtyp und A2b -/- Tieren mit und ohne Sevofluran-Behandlung . . . . .	53
Abbildung 9:	MPO und Gesamtprotein bei Wildtyp und A2b -/- Mäusen . . . . .	54
Abbildung 10:	PMN-Migration bei Wildtyp und A2b -/- Tieren im direkten Ver- gleich . . . . .	55
Abbildung 11:	PMN-Migration bei chimären Mäusen . . . . .	56
Abbildung 12:	Immunhistochemische Färbung der PMNs in der Lunge . . . . .	58
Abbildung 13:	Immunhistochemische Färbung der PMNs in der Leber . . . . .	59
Abbildung 14:	Immunhistochemische Färbung der PMNs im Darm . . . . .	60
Abbildung 15:	Transkription des A2b-R . . . . .	61
Abbildung 16:	Proteinexpression des A2b-R . . . . .	62
Abbildung 17:	Zytokin- und Chemokinkonzentrationen in der Peritoneallavage	63
Abbildung 18:	Expression der Adhäsionsmoleküle in der Peritoneallavage . . . . .	66
Abbildung 19:	Expression der Adhäsionsmoleküle im Blut . . . . .	66
Abbildung 20:	Expression der Adhäsionsmoleküle in der Leber . . . . .	67
Abbildung 21:	Expression der Adhäsionsmoleküle in der Lunge . . . . .	68
Abbildung 22:	PMN-Migration bei Fäzes-induzierter Peritonitis . . . . .	69
Abbildung 23:	MPO und Gesamtprotein bei Fäzes-induzierter Peritonitis . . . . .	69

# Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Übersicht zur Funktion der Adenosinrezeptoren . . . . .	16
Tabelle 2:	Zusammensetzung des Lysepuffers . . . . .	34
Tabelle 3:	Zusammensetzung des Antikörper-Mix . . . . .	35
Tabelle 4:	Verdünnung der Adhäsionsmoleküle . . . . .	36
Tabelle 5:	Gruppen zur Fertigung histologischer Präparate . . . . .	37
Tabelle 6:	Stationen des Einbettautomats . . . . .	38
Tabelle 7:	Zusammensetzung der Gele . . . . .	42
Tabelle 8:	Zusammensetzung Lower und Upper Buffer . . . . .	43
Tabelle 9:	Untersuchte Adhäsionsmoleküle (AM) . . . . .	64

# Abkürzungsverzeichnis

-/-	Knock-out
A-R	Adenosinrezeptoren
A2a-R	A2a-Rezeptor
A2b-R	A2b-Rezeptor
ADP	Adenosindiphosphat
Ak	Antikörper
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumperoxidsulfat
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchonininsäure
BSA	Bovines Serum Albumin
CAM	zelluläres Adhäsionsmolekül
cAMP	cyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	cyklische Desoxyribonukleinsäure
CLP	Cecal Puncture and Ligation
DAB	Diamino-benzidin 3,3'
DIC	disseminierte intravasale Gerinnung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECC	extrakorporale Zirkulation
ELISA	Enzym-linked Immunosorbent Assay
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
FIP	Fäzes-induzierte Peritonitis

FP	Färbepuffer
GZZ	Gesamtzellzahl
HFIP	Hexafluoroisopropanol
HIF-1	Hypoxie-induzierter Faktor 1
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
I/R	Ischämie und Reperfusion
ICAM-1	interzelluläres Adhäsionsmolekül 1
IL	Interleukin
KC	Keratinocyte-derived Chemokine
LFA-1	leukozytenfunktionsassoziiertes Antigen 1
LPS	Lipopolysaccharid
Mac-1	Makrophagen Antigen-1
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MIP-2	Macrophage Inflammatory Protein-2
MPO	Myeloperoxidase
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NFW	nukleasefreies Wasser
NO	Stickstoffmonoxid
NRS	Normal Rabbit Serum
PECAM-1	Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül 1
PFA	Paraformaldehyd
PMN	polymorphkerniger Leukozyt
PONV	postoperative Übelkeit und Erbrechen
PSGL-1	P-Selektin Glykoprotein Ligand-1



q-PCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
qSOFA	Quick-SOFA-Score
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SOFA-Score	Sepsis-related organ failure assessment score
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
ZZ	Zellzahl

# 1 Einleitung

## 1.1 Peritonitis

Die Peritonitis ist eine Inflammation des Peritoneums, ausgelöst durch eine in der Regel bakterielle Infektion im Bauchraum. Ätiologisch unterscheidet man zwischen der primären, sekundären und tertiären Peritonitis [1]. Bei der primären Peritonitis infiziert sich vorbestehende Flüssigkeit im Bauchraum, z.B. Aszites bei Leberzirrhose oder nach Peritonealdialyse. Sie wird auch als spontane bakterielle Peritonitis bezeichnet. Die sekundäre Peritonitis, die häufigste Form, tritt nach Verletzungen oder Entzündungen der im Bauchraum liegenden Organe auf. Hierfür gibt es verschiedene Ursachen. Dazu zählen Hohlorganperforationen, wie die Perforation eines Magengeschwürs, einer Appendizitis oder einer Sigmadivertikulitis. Außerdem gibt es die Durchwanderungsperitonitis bei Ileus oder Darmischämie, sowie die postoperative Peritonitis, die im Rahmen einer Anastomoseninsuffizienz oder Darmperforation auftreten kann [2]. Eine tertiäre Peritonitis liegt vor, wenn die Inflammation trotz saniertem Entzündungsfokus persistiert oder rezidiert [3].

Klinisch äußert sich die Peritonitis durch das typische Bild eines akuten Abdomens mit starken Bauchschmerzen. Im Röntgenbild des Abdomens kann sich bei Hohlorganperforation freie Luft zeigen. Während die primäre Peritonitis in der Regel konservativ behandelt werden kann, steht bei der sekundären Form die chirurgische Therapie im Vordergrund. Dabei ist entscheidend, dass die Infektionsquelle saniert und bestehendes Exsudat durch eine Peritoneallavage entfernt wird [3]. Des Weiteren sollte eine rasche und möglichst breit kalkulierte Antibiose erfolgen und beim Übergang in eine Sepsis diese adäquat intensivmedizinisch therapiert werden [3].

Pathophysiologisch kommt es bei der Peritonitis durch einen Infektionsstimulus zur

Aktivierung lokaler Entzündungszellen, darunter Mastzellen und Makrophagen. Die Sekretion von Entzündungsmediatoren und die Aktivierung des Komplementsystems führen zu einer Weitstellung der Gefäße und zur Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine wie Tumornekrosefaktor alpha (TNF- $\alpha$ ) und Interleukin (IL)-1. Diese wiederum führen zu einer Sekretion von Chemokinen und damit zu einer massiven Einwanderung neutrophiler Granulozyten am Ort des Entzündungsgeschehens [4]. Insbesondere durch die gesteigerte endotheliale Permeabilität der Gefäße und des Peritoneums gelangen inflammatorische Mediatoren in die Blutbahn und können so eine Sepsis auslösen [4].

## 1.2 Sepsis

Die Sepsis wird nach den neuen Kriterien der Sepsis-3-Konsensuskonferenz von 2016 als eine lebensbedrohliche Organdysfunktion definiert, bei der die Antwort des Körpers auf eine Infektion dysreguliert ist [5]. Ein lokaler Entzündungsreiz, wie z.B. die Peritonitis, führt zur Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine und Chemokine. Daraufhin werden Zellen des angeborenen Immunsystems, vor allem neutrophile Granulozyten und Makrophagen, rekrutiert. Diese sezernieren weitere pro-inflammatorische Zytokine, Chemokine und reaktive Sauerstoffradikale [6]. Das Zusammenspiel aus Zytokinen, Chemokinen und Zellen des angeborenen Immunsystems ist essentiell zur Elimination von Bakterien. Die dysregulierte Aktivierung außerhalb des Infektfokus schädigt aber gesunde Zellen und steigert die vaskuläre Permeabilität [6]. Letzteres wiederum führt zu einem Flüssigkeitsverlust ins Gewebe, woraus generalisierte Ödeme und eine systemische Hypovolämie resultieren. Eine exzessive Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) führt zu Vasodilatation und unterhält die Hypovolämie. Die vermehrte Freisetzung von Gewebefaktor und die Hemmung der Fibrinolyse fördern die Koagulation und bergen das Risiko einer disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC) [7].

Aktivierte Entzündungszellen setzen neben den pro-inflammatorischen auch anti-inflammatorische Mediatoren wie IL-10 frei [7]. Diese kompensatorische anti-inflammatorische Antwort hemmt unter anderem TNF- $\alpha$ , Immunglobuline und die Makrophagenfunktion. Sie soll damit als negativer Feedback-Mechanismus dienen, die Synthese pro-

inflammatorischer Mediatoren herunter regulieren und die Hämostase wiederherstellen [7]. Die bei der Sepsis fehlende Balance zwischen pro- und anti-inflammatorischen Antworten führt zu einem unkontrollierten exzessiven Entzündungsprozess [7]. Die Beeinträchtigung des Immunsystems, des Gerinnungssystems und der Herz-Kreislauf-Funktion resultieren in einem fortschreitenden Multi-Organ-Versagen [8].

Diagnostiziert wird die Sepsis klinisch durch eine Veränderung im Sepsis-related organ failure assessment score (SOFA-Score). Dabei handelt es sich um eine Maßzahl, welche das Organversagen im Rahmen der Sepsis beurteilt. Darin wird die aktuelle Funktion von Leber, Lunge und Nieren, Blutgerinnung, Herzkreislauf-System sowie die Bewusstseinslage berücksichtigt [9]. Als Screeningmaßnahme wird der Quick-SOFA-Score (qSOFA) verwendet, welcher die Bewusstseinslage anhand der Glasgow Coma Scale, den Blutdruck und die Atemfrequenz beinhaltet [9].

Die Mortalität der Sepsis liegt bei ca. 25 % und beim septischem Schock bei über 50 % [10, 11]. Eine adäquate und rasche Therapie ist folglich essentiell und beinhaltet in der Regel eine intensivmedizinische Behandlung. Dazu gehören die Sanierung des Infektfokus und der Beginn einer antimikrobiellen Therapie. Eine hämodynamische Stabilisierung kann durch Volumentherapie und der Gabe von Vasopressoren erreicht werden [9].

Aufgrund der hohen Mortalität und der großen Bedeutung der Sepsis im klinischen Alltag besitzt die Erforschung ihrer molekularen Grundlagen einen enormen Stellenwert in der aktuellen medizinischen Forschung [12]. Ziel ist es, über die Kenntniserweiterung der pathophysiologischen Hintergründe Therapiestrategien zu entwickeln, welche Patienten vor den lebensgefährlichen Auswirkungen einer Sepsis bewahren können.

### **1.3 Neutrophile Granulozyten**

Neutrophile Granulozyten sind als Untergruppe der Leukozyten ein wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems und dienen der Erstabwehr von Bakterien und Parasiten. Ihre neutral anfärbbaren Granula brachten ihnen den Namen Neutrophile Granulozyten ein, während die außergewöhnliche Segmentierung ihres Zellkerns zur Bezeichnung als polymorphkernige Leukozyten (PMNs) führte [13]. Beide Begriffe wer-

den synonym verwendet. PMNs repräsentieren ca. 70 % der Leukozyten im Menschen und 30 % in Mäusen. Sie gehören mit einer Lebenszeit von 6–8 h zu den am kürzesten lebenden Zellen des menschlichen Körpers [13]. Damit bei einer Infektion, wie Peritonitis oder Sepsis, die PMNs zum Ort des Entzündungsgeschehens gelangen und dort Erreger bekämpfen können, wird ein komplexer Ablauf vollzogen. Eine entscheidende Rolle spielen dabei Zytokine, Chemokine und Adhäsionsmoleküle.

### **Zytokine und Chemokine**

Durch einen inflammatorischen Stimulus setzen die umliegenden Zellen pro-inflammatorische Zytokine wie IL-6 oder TNF- $\alpha$  frei. IL-6 stimuliert in der Leber die Produktion von Akute-Phase-Proteinen, fördert im Knochenmark die vermehrte Reifung von PMNs und induziert Fieber. Es ist ein wichtiger Biomarker im Blut eines septischen Patienten und korreliert mit der Schwere einer Sepsis [14]. TNF- $\alpha$  induziert die Expression von Adhäsionsmolekülen auf dem Endothel und den PMNs, welche für die Migration aus dem Gefäß ins Gewebe essentiell sind [15]. Des Weiteren stimuliert er unter anderem Monozyten, Fibroblasten und weitere Zellen zur Produktion von Chemokinen [16]. Chemokine sind eine Gruppe kleiner Moleküle, welche unter anderem Immunzellen aus dem Knochenmark rekrutieren und diese aktivieren [15]. Die Chemokine der CXC-Familie sind dabei hauptsächlich für die Chemotaxis von PMNs verantwortlich [17]. Sie locken die PMNs zum Infektfokus, wo diese aus dem Gefäß entlang eines Chemokingradientens ins Gewebe übertreten. Dies nennt man die PMN-Migration oder Leukozyten-Rekrutierungs-Kaskade.

### **PMN-Migration**

Der erste Schritt der Leukozyten-Rekrutierungs-Kaskade in post-kapillären Venolen ist das Anbinden (Tethering) und Rollen der PMNs entlang des Endothels. Hauptverantwortlich dafür sind endotheliale Adhäsionsmoleküle wie P-Selektin und E-Selektin. Diese binden an ihren Liganden P-Selektin Glykoprotein Ligand-1 (PSGL-1) (auch bekannt als CD162), aber auch an andere Adhäsionsmoleküle wie CD44 auf PMNs. Die abwechselnde Bindung und Lösung dieser Verbindung ermöglicht das Rollen

der Leukozyten und reduziert dabei deren Geschwindigkeit im Blutfluss [18, 19]. Die Bindung von PSGL-1 an das auf PMNs exprimierte L-Selektin erlaubt eine Leukozyten-Leukozyten-Interaktionen und damit eine sekundäre Anbindung von PMNs [20]. Während des Rollens stimulieren Chemokine die vermehrte Expression und Aktivierung von Integrinen auf den Leukozyten. Mittels Inside-out Signalling der Integrine kommt es zur Änderung ihres Konformation-Status und die Affinität wird verstärkt [21, 22]. Durch die Bindung des leukozytenfunktionsassoziierten Antigen 1 (LFA-1), einem  $\beta_2$ -Integrin, an seinem Liganden interzelluläres Adhäsionsmolekül 1 (ICAM-1) auf dem Endothel kommt es zur festen Adhäsion der PMNs. Die Bindung des  $\beta_2$ -Integrins Makrophagen Antigen-1 (Mac-1) an ICAM-1 ermöglicht dann das weitere Kriechen (Crawling) entlang des Endothels bis zur optimalen Stelle zur Transmigration [23]. An der Transmigration sind Integrine und zelluläre Adhäsionsmoleküle (CAMs), so wie junctionale Proteine, wie das Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül 1 (PECAM-1) beteiligt. Die Passage erfolgt dabei bevorzugt parazellulär, zwischen zwei Zellen, aber auch transzellulär, durch Endothelzellen [23]. Die PMN-Migration ist in Abbildung 1 veranschaulicht.

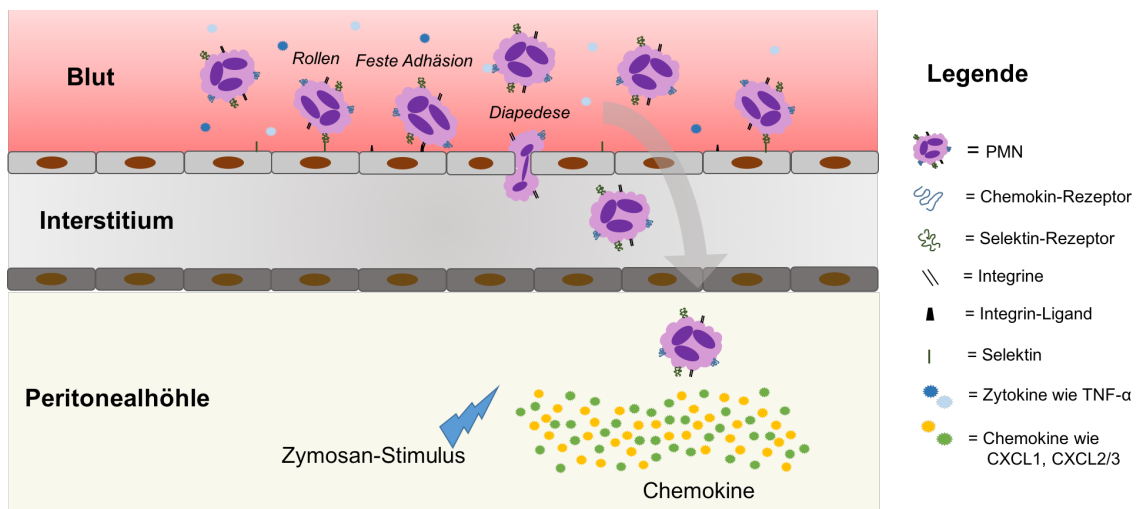


Abbildung 1: **Migration von PMNs zum Ort des Entzündungsgeschehens:** Dargestellt am Beispiel der Migration der PMNs aus dem Blut durch die Subserosa des Peritoneums in die Peritonealhöhle. Eigene Darstellung.

Am Ort des Entzündungsgeschehen reagieren PMNs auf Erreger durch die Ausschüttung ihrer Granula und reaktiver Sauerstoffspezies, sowie durch Phagozytose. Neutrophile Granulozyten spielen eine entscheidende Rolle bei der Immunantwort

auf eine Infektion durch Elimination bakterieller Erreger. Eine totale Elimination der PMNs führt zum Tode [24]. Es hat sich aber auch gezeigt, dass eine überschießende Migration und Aktivierung außerhalb des Infektfokus zu Organschäden und Multi-Organ-Versagen bei Sepsis führen kann [22, 25]. Die Modulation der Aktivität der PMNs kann somit einen wichtigen therapeutischen Angriffspunkt darstellen.

## 1.4 Adenosin und Inflammation

Adenosin ist ein Nukleosid mit einer sehr kurzen in vivo Halbwertszeit von 1,5 s [26]. Es spielt eine wichtige Rolle als Baustein in der Desoxyribonukleinsäure (DNA) und der Ribonukleinsäure (RNA) und in den energiereichen Verbindungen Adenosintriphosphat (ATP) und Adenosindiphosphat (ADP). Durch schnelle Aufnahme und Metabolisierung von Adenosin kann dessen niedrige Konzentration in der Umgebung von gesunden und stressfreien Zellen erhalten werden. Unter den pathophysiologischen Bedingungen einer Entzündung führen Zellstress, Zellzerstörung und Hypoxie zur vermehrten Hydrolyse von ATP, ADP und Adenosinmonophosphat (AMP) mittels der Enzyme Ectopyrase (CD39) und Ecto-5'-Nucleotidase (CD73) und damit zur vermehrten Freisetzung von Adenosin [27]. Daraus resultieren bis zu 100-fach höhere Konzentrationen von Adenosin während einer Inflammation [28]. Die systemische Bioverfügbarkeit wird durch rasche Wiederaufnahme über spezifische Nukleosidtransporter und dem intrazellulären Abbau zu Inosin oder der Rephosphorylierung durch Adenosinkinasen zu AMP auf wenige Sekunden limitiert [29].

Adenosin wirkt über spezifische Rezeptoren, die Adenosinrezeptoren (A-R), bei denen es sich um G-Protein-gekoppelte Rezeptoren handelt, welche auf fast allen Zellen exprimiert werden. Es werden vier Subtypen unterschieden: A1-, A2a-, A2b- und der A3-Rezeptor. Adenosin nimmt darüber Einfluss auf das Zentralnervensystem, Herz-Kreislauf-Funktionen sowie Immunreaktionen. Der durch Adenosin ausgelöste Effekt richtet sich nach dem auf der jeweiligen Zelle vorhandenen Expressionsmuster der Adenosinrezeptoren. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die Wirkmechanismen und Funktionen der vier Adenosinrezeptoren [29, 30].

Beim A1-R und A3-R handelt es sich um  $G_i$ -Rezeptoren, welche die Adenylatzyklase

Tabelle 1: Übersicht zur Funktion der Adenosinrezeptoren (in Anlehnung an [29, 30])

	A1-R	A2a-R	A2b-R	A3-R
<b>Adenosin-Konz.</b>	0,01–1 µmol	0,01–1 µmol	> 10 µmol	0,01–1 µmol
<b>Typ</b>	$G_i$ cAMP ↓	$G_s$ cAMP ↑	$G_s / G_q$ cAMP ↑ / $Ca^{2+}$ ↑	$G_i$ cAMP ↓
<b>Funkt.</b>	Bradykardie, Antinozizeption	arterielle Vasodilatation, Inhibition der Plättchenaktivierung	ischämische Präkonditionierung, vaskuläre Barrierefunktion	Mastzelldegranulation

hemmen und damit die Konzentration des Signalmoleküls cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) reduzieren. Der A2a-Rezeptor (A2a-R) und der A2b-Rezeptor (A2b-R) sind  $G_s$ -Rezeptoren. Sie wirken stimulierend auf die Adenylatzyklase und führen zur Steigerung von cAMP [30]. Der A2b-R besitzt eine besondere Bedeutung im Rahmen der Inflammation.

### A2b-Rezeptor

Der A2b-Rezeptor besitzt die geringste Affinität zu Adenosin [31]. Physiologische Konzentrationen von Adenosin unter 1 µmol reichen zur Aktivierung nicht aus [32]. Im Rahmen einer Entzündung, insbesondere bei Sepsis und septischen Schock, kommt es durch oxidativen Stress und Ischämie zu bis zu 100fach höheren Konzentrationen von Adenosin und damit ausreichend zur Aktivierung des A2b-R [28]. Die Rolle des A2b-R im Rahmen der Inflammation wird kontrovers diskutiert, da sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Effekte nachgewiesen werden konnten [33, 34]. Der jeweilige Effekt scheint sowohl davon abhängig zu sein, ob es sich um eine akute oder um eine chronische Inflammation handelt, als auch welche Zellen untersucht werden.

So ergab die Untersuchung der murinen Colitis in A2b Knock-out (-/-) Mäusen, dass diese weniger Symptome und Entzündungszeichen im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren aufwiesen [35]. Einen ebenfalls pro-inflammatorischen Effekt des A2b-R konnte bei intraperitonealer (i.p.) Injektion von Lipopolysaccharid (LPS) (einem Bestandteil der äußeren Membran gram-negativer Bakterien), sowie bei der Stimulation peri-



tonealer Makrophagen gezeigt werden [33]. Die Stimulation des A2b-R führte hier zu einer vermehrten Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine, darunter auch von IL-6. Des Weiteren konnte die Gabe eines A2b-R Antagonisten die Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine und Chemokine verringern und damit die Entzündung chronischer Lungenkrankheiten wie COPD und Asthma reduzieren [36].

Im Gegensatz dazu konnte mit Hilfe von Knock-out-Mäusen, welche den A2b-R nicht mehr exprimieren, auch eine anti-inflammatorische Rolle des A2b-R nachgewiesen werden. So zeigten diese bei LPS-induzierter Lungeninflammation erhöhte Level pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-6, sowie hochregulierte Adhäsionsmoleküle [34]. Der A2b-R schützt hier folglich vor einer verstärkten Entzündungsreaktion und vermehrter Adhäsion von PMNs am Endothel. Ähnliche Ergebnisse fanden sich bei der Untersuchung der Cecal Puncture and Ligation (CLP)-induzierten Sepsis [37]. Beim CLP-Modell wird das Zäkum mit einer Nadel perforiert, wodurch Stuhl kontrolliert in die Peritonealhöhle gelangt und dort eine Immunantwort auf einen polymikrobielle Infektion induziert, wie es auch bei einer Hohlorganperforation der Fall ist [38]. Neben den erhöhten pro-inflammatorischen Zytokinen war auch die Mortalität in den A2b -/- Mäusen erhöht. Die Blockade des A2b-R aggravierte die Entzündungsreaktion weiter. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass A2b-R unter hypoxischen Bedingungen protektiv wirkt. Zum einen stabilisiert er die vaskuläre Barrierefunktion [39], zum anderen schützt er vor Ischämie und Reperfusions (I/R)-Schaden in der Leber. Letzteres entsteht durch die Minderdurchblutung eines Organs nach einem Gefäßverschluss und die anschließende Wiederdurchblutung [40].

## 1.5 Sevofluran

Sevofluran ist ein Narkosegas aus der Gruppe der Flurane, welches zur Einleitung und Aufrechterhaltung einer Allgemeinanästhesie verwendet wird. Aufgrund seiner inhalativen Applikationsform zählt es zu den Inhalationsanästhetika, welche auch volatile Anästhetika genannt werden. Sevofluran wirkt hauptsächlich hypnotisch, aber auch leicht analgetisch und muskelrelaxierend. Durch schnelle An- und Abflutzeiten ist es sehr gut steuerbar. Ein weiterer Vorteil ist die geringe Reizung der Atemwege

im Gegensatz zu anderen volatilen Anästhetika [41]. Als Nachteil ist das häufigere Auftreten von postoperativer Übelkeit und Erbrechen (PONV), sowie Unruhe nach der Narkose zu nennen [42].

Neben seinen Fähigkeiten als Narkosegas wurden bei Sevofluran auch protektive Mechanismen bei Gewebeschäden, ausgelöst durch Hypoxie oder Endotoxine, nachgewiesen. Ein protektiver Effekt volatiler Anästhetika konnte z.B. bei I/R-Schaden in Herz, Leber und Niere sowohl in Tiermodellen und als auch im Menschen nachgewiesen werden [43–45]. Zunächst wurde dieser Effekt bei Inhalation der volatilen Anästhetika vor dem schädigenden Ereignis demonstriert. Das Gewebe wird dadurch sensibilisiert und ist resistenter gegen später entstehenden Zellschaden [46]. Dieses Vorgehen wird auch Präkonditionierung genannt. Da invalidierende Ereignisse häufig nicht vorausgesagt werden können, wird vermehrt die Postkonditionierung untersucht. Die Sevofluran-Inhalation findet hier erst nach einem schädigen Ereignis statt. So konnte gezeigt werden, dass Sevofluran zum Beispiel nach cerebralem I/R-Schaden die Apoptose und Nekrose neuronaler Zellen reduziert [47], bei LPS-induzierter Sepsis die inflammatorische Antwort durch niedrigere Konzentrationen von Zytokinen wie TNF- $\alpha$  und IL-6 verringert [48], sowie bei kardialem I/R-Schaden die Kontraktionsfähigkeit des Herzens verbessert [49]. Eine bessere Überlebensrate durch eine Sevofluran-Behandlung konnte in einer Studie mit dem murinen Sepsis-Modell CLP nachgewiesen werden [50]. Diese Ergebnisse unterstützen die Idee der Behandlung mit Sevofluran als potentiell therapeutisches Mittel zur Organprotektion.

## **1.6 Volatile Anästhetika und Adenosinrezeptoren**

Um die zugrundeliegenden Mechanismen der protektiven Wirkung volatiler Anästhetika besser zu verstehen, helfen Ergebnisse aus Untersuchungen der ischämischen Prä- und Postkonditionierung weiter. Kurze Perioden von Ischämie und Reperfusion vor einer längeren Ischämie-Periode bzw. zu Beginn der Reperfusion (ischämische Prä- bzw. Postkonditionierung) reduzieren die Infarktgröße und wirken damit auf ähnliche Weise gewebeprotektiv wie volatile Anästhetika [51, 52]. Mitverantwortlich dafür wurde das Signalmolekül Adenosin und der Signalweg über den A<sub>2b</sub>-R gemacht. Hierüber

konnte eine Barriereprotektion bei Bedingungen mit reduzierter Sauerstoffverfügbarkeit wie z.B. Hypoxie und Inflammation nachgewiesen werden [53, 54].

Untersuchungen im Rahmen des kardioprotektiven Effekts der ischämischen Präkonditionierung zeigten, dass diese in einer gesteigerten Expression von CD73 resultierte. Das Enzym CD73 hydrolysiert AMP zu Adenosin und führt damit zur vermehrten Freisetzung von Adenosin [55]. Eine weitere Untersuchung der vier A<sub>2b</sub>-R demonstrierte eine isolierte Rolle des A<sub>2b</sub>-R bei der kardioprotektiven Wirkung der ischämischen Präkonditionierung. In A<sub>2b</sub> <sup>-/-</sup> Mäusen war deren Effekt auf die Infarktgröße nicht mehr nachweisbar, wohingegen ein A<sub>2b</sub>-R Agonist die Infarktgröße noch weiter reduzieren konnte [55].

Eine Studie, welche die protektive Wirkung von Sevofluran und die Abhängigkeit vom A<sub>2b</sub>-R bei Leber-I/R-Schaden untersuchte, konnte bestätigen, dass dieser gleiche Mechanismus auch durch die Behandlung mit volatilen Anästhetika nachgewiesen werden kann [56]. Ob sich dies auch auf die Sepsis und die nachträgliche Behandlung mit Sevofluran übertragen lässt, ist Hauptfrage der vorliegenden Arbeit.

## 1.7 Zymosan-induzierte Peritonitis

Um die Situation einer Peritonitis standardisiert und reproduzierbar in einem Maus-Modell zu untersuchen, bietet sich das Verfahren der Zymosan-induzierten Peritonitis an. Bei Zymosan handelt es sich um ein Homoglykan, gewonnen aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Die Injektion induziert durch Bindung an den Toll-like Rezeptor-2 in der Maus zahlreiche inflammatorische Mediatoren. Dazu gehören unter anderem das Komplementsystem, Prostaglandine und Leukotriene, sowie TNF- $\alpha$  [57]. Es wird eine Kaskade der akuten Entzündung mit Aktivierung von Zytokinen und Chemokinen und folgender Einwanderung von neutrophilen Granulozyten in Gang gesetzt [57]. Dieser verläuft analog zu dem bereits beschriebenen Entzündungsvorgang der Sepsis. Da es sich bei Zymosan nicht um ein bakterielles Toxin handelt, kann der inflammatorische Prozess unter sterilen Bedingungen untersucht werden.

## 1.8 Fragestellung

Auf Grund der immer noch hohen Letalität von Peritonitis und Sepsis sind neue therapeutische Möglichkeiten von großem Interesse im klinischen Alltag und in der medizinischen Forschung. Die häufige Notwendigkeit einer chirurgischen Therapie und intensivmedizinischen Überwachung legen nahe, einen therapeutischen Ansatzpunkt in der Anästhesie zu suchen. Ein protektiver Effekt des volatilen Anästhetikums Sevofluran konnte bereits mehrfach gezeigt werden. Der genaue Mechanismus der anti-inflammatorischen Wirkung von Sevofluran bei Peritonitis und Sepsis, sowie die Rolle von Adenosin mit seinem A2b-R dabei sind noch immer unklar und Hauptfragen dieser Arbeit.

Folgende Fragen sollen geklärt werden:

- Beeinflusst die Behandlung mit Sevofluran die PMN-Migration bei Zymosan-induzierter Peritonitis?
- In welchem zeitlichen Abstand zur Peritonitis-Induktion zeigt die Sevofluran-Inhalation einen Einfluss auf die PMN-Migration?
- Welchen Einfluss hat Sevofluran auf die PMN-Migration in die verschiedenen Organe bei Sepsis? Zeigt sich dieser auch in A2b -/- Mäusen?
- Wirkt sich die Inhalation von Sevofluran auf die Expression von A2b-R aus?
- Beeinflusst Sevofluran die Zymosan-induzierte Steigerung der mikrovaskulären Permeabilität?
- Verändert sich die Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine und Chemokine durch Sevofluran?
- Kann Sevofluran die Expression migrationsrelevanter Adhäsionsmoleküle beeinflussen?
- Spielt bei oben genannten Elementen der Entzündung A2b-R eine Rolle?

- Wie zeigt sich der Einfluss von Sevofluran in einem zweiten zusätzlichen Peritonitis-Modell?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Antikörper

<b>Produktbezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
7/4 FITC (MCA771F)	AbD Serotec, Düsseldorf
Adenosine A2B-R (H-40) (sc28996)	Santa Cruz, Heidelberg
Biotinylated rabbit anti rat (BA-4001)	Vector Labs, Peterborough (UK)
CD11a PE (553121)	Becton Dickinson, Heidelberg
CD11b PE (553311)	Becton Dickinson, Heidelberg
CD31 PE (553373)	Becton Dickinson, Heidelberg
CD44 PE (553134)	Becton Dickinson, Heidelberg
CD45 PerCP (557235)	Becton Dickinson, Heidelberg
CD54 PE (A16333)	Molecular Probes, Darmstadt
CD162 PE (555306)	Becton Dickinson, Heidelberg
GAPDH FL-335 (sc-25778)	Santa Cruz, Heidelberg
Goat-anti-rabbit IgG-HRP (sc-2004)	Santa Cruz, Heidelberg
Gr1-633	Lymphocyte Culture, Charlottesville (USA)
IgG 2a FITC (553929)	Becton Dickinson, Heidelberg
IgG 2b APC (553991)	Becton Dickinson, Heidelberg
Magic Mark XP Western Standard (LC5602)	Invitrogen, Darmstadt
Normal rat IgG (sc-2026)	Santa Cruz, Heidelberg

<b>Produktbezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Normal Rabbit Serum (S-5000)	Vector Laboratories, Burlingame (CA)
Protein Marker VI (10-245)	AppliChem, Darmstadt
Rat anti mouse neutrophils (MCA771GA)	AbD Serotec, Düsseldorf

## 2.1.2 Chemikalien

<b>Produktbezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
2-Propanol (I9516)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
ABTS (A1888-2G)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Acrylamid (A3802,0500)	AppliChem, Darmstadt
Ammoniumperoxidsulfat (APS) (9592.3)	Carl Roth, Karlsruhe
Avidin Blocking Kit (SP-2001)	Vector Labs, Peterborough (UK)
BCA Protein Assay Kit (23225)	Thermo Scientific, Bonn
BD Cytometer Setup & Tracking Beads (641319)	Becton Dickinson, Heidelberg
BD FACS™Lysis Solution (349202)	Becton Dickinson, Heidelberg
Bluing Reagent (7301)	Thermo Scientific, Bonn
BSA (Bovine Serum Albumine) (A7906)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Chloroform (C2432)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Citronensäure (818707)	Merck, Darmstadt
DAB Chromogen (S3000)	Dako, Hamburg
D-Glucose Lösung 10% (G8644)	Sigma-Aldrich, Steinheim
DPBS without Mg <sup>2+</sup> /Ca <sup>2+</sup> (14190094)	Gibco, Invitrogen, Darmstadt
DuoSet ELISA IL-6 (DY 406)	R&D Systems, Wiesbaden
DuoSet ELISA KC (DY 453)	R&D Systems, Wiesbaden
DuoSet ELISA MIP-2 (DY 452)	R&D Systems, Wiesbaden
DuoSet ELISA TNF- $\alpha$ (DY 410)	R&D Systems, Wiesbaden
EDTA (ED4S)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethanol absolut (A3678)	AppliChem, Darmstadt

<b>Produktbezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Eukitt (03989)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Formalin 4 % (A3697)	AppliChem, Darmstadt
FSGO Gelatin (G7765)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
iScript cDNA Synthesis Kit (170-8891)	Bio-Rad Laboratories, München
iQ™SYBR Green Supermix (170-8882)	Bio-Rad Laboratories, München
Magermilch (A0830,0500)	AppliChem, Darmstadt
MayGrünwalds Eosin	Merck, Darmstadt
Methylenblaulösung (1.01424.2500)	
Mercaptoethanol (M-6250)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Methanol (106009)	Merck, Darmstadt
Na-Citrat (35801)	Carl Roth, Karlsruhe
NaCl (106404)	Merck, Darmstadt
NaHCO <sub>3</sub> (K10720529)	Merck, Darmstadt
NaN <sub>3</sub> (S8032-25G)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Nuklease freies Wasser (NFW) (A7398,0500)	AppliChem, Darmstadt
NH <sub>4</sub> Cl (A0988)	AppliChem, Darmstadt
Paraffin Rotiplast (6642.5)	Carl Roth, Karlsruhe
PBS (Phosphat buffered Saline) (D5652)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PBS <sup>-</sup> (without Mg <sup>2+</sup> /Ca <sup>2+</sup> ) (D8537)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PFA 4 % (Paraformaldehyd) (P6148)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Proteas and Phosphatase Inhibitor (78443)	Thermco Scientific, Bonn
Reagent Diluent (DY995)	R&D Systems, Wiesbaden
RNase-Away (7002)	Molecular BioProducts, San Diego (CA)
RPMI-1640 (R7509)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Sodium dodecyl sulfate (SDS) (L4390-100G)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Stop Solution (80-184)	Enzo Life Sciences, Hines Drive (USA)



<b>Produktbezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Streptavidin-HRP (893975.00)	R&D Systems, Wiesbaden
Substrat Solution (DY999)	R&D Systems, Wiesbaden
TEMED (2367.3)	Carl Roth, Karlsruhe
TriFast peqGOLD (30-2010)	peqlab, Erlangen
Tris-Base (A1086,100)	AppliChem, Darmstadt
Tris-Glycine Buffer 10x (161-0771)	Bio-Rad, München
Tris-Glycine-SDS-Buffer (161-0772)	Bio-Rad, München
Triton X-100 (A4975)	AppliChem, Darmstadt
Türk'sche Lösung (109277)	Merck, Darmstadt
Tween 20 (A4974)	AppliChem, Darmstadt
Unmasking Solution (H-3300)	Vector Labs, Peterborough (UK)
Vectastain ABC-KIT (PK-4004)	Vector Labs, Peterborough (UK)
Wasserstoffperoxid 30 % (108597)	Merck, Darmstadt
Western Blotting Luminol Reagent (sc-2048)	Santa Cruz, Heidelberg
Xylol (9713.3)	Carl Roth, Karlsruhe
Zymosan A (Z4250)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

### 2.1.3 Enzyme

<b>Produktbezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Collagenase XI (C7657)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DNAse (D4527)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Hyaluronidase (H3506)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

### 2.1.4 Geräte

<b>Produktbezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Dräger Vapor 2000	Drägerwerk, Lübeck
Dräger Vamos (6870750-30)	Dräger Medical Ag & Co KG, Lübeck

<b>Produktbezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Eismaschine AF-10	Scotsman, Sprockhoevel
Elektrophoresekammer Mini Cell	Novex,Life Technologies, Carlsbad
FACSCanto II Flow Cytometer	Becton Dickinson, Heidelberg
Fusion SL Viber Lourmat	peqlab, Erlangen
Histoembedder EG 11160	Leica biosystems, Nussloch
Gewebeinfiltrationsautomat TP 1020	Leica biosystems, Nussloch
Homogenisator Precellys 24	peqlab, Erlangen
Infinite 200 PRO series	Tecan, Crailsheim
Inkubationswasserbad Typ 1003	GFL, Burgwedel
Labor-pH-Meter 526	WTW, Weilheim
Magnetrührer RCT basic	IKA Labortechnik, Staufen
Mehrkanalpipette (3114000158)	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop: Leica DMIL	Leica, Wetzlar
Mikroskop: Leitz DM-IRB	Leica, Wetzlar
Mikrowelle Cookmate	DEAWOO, Butzbach
Multipette Plus (4981000.019)	Eppendorf, Hamburg
Nanodrop 2000 Spectrophotometer	Thermo Scientific, Bonn
Photometer GENios	Tecan, Crailsheim
Pinzetten (BD312R, BD311R)	Aesculap, Tuttlingen
PipetBoy acu (155000)	INTEGRA Bioscience, Nussloch
Pipetten (0,1–2500 µl)	Eppendorf, Hamburg
Plate washer Hydroflex ELISA (30045769)	Tecan, Crailsheim
Power Pac 200 und 3000	Bio-Rad Laboratories, München
Rotationsmikrotom RM 2235	Leica biosystems, Nussloch
Scheren (BC590R, BC060R)	Aesculap, Tuttlingen
Steril Bank Leimin-Air HB 2472	Hareaus, Hanau
Tailvein Restrainer (TV-150)	Braintree Scientific Inc., Braintree (USA)
Thermocycler Cyclone 25	PeqLab Biotechnologie, Erlangen
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg

<b>Produktbezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Thermoschüttler AK 82	INFORS AG, Bottmingen (CH)
Tischzentrifuge SPROUT	Heathrow Scientific LLC, Illinois (USA)
Überkopfschüttler REAX 2	Heidolph, Kelheim
Vortex K-55-GE	Bender und Hobein AG, Zürich (CH)
Waage HR-120-EC	A&D Instruments, Ltd., Ahrensburg
Waage Scout II	Ohaus, Kirchheim
Wärmeplatte HI 1220	Leica biosystems, Nussloch
Wasserbad HI 1210	Leica biosystems, Nussloch
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Megafuge 1.0 R	Heraeus, Hanau

## 2.1.5 Verbrauchsmaterial

<b>Produktbezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Atenschutzmaske 3M™ Aura™(1862+)	3M OH&ES, Berkshire (UK)
Cassettes 1 mm (131008-9)	Novex, Life Technologies, Carlsbad
Combitips advanced 5 ml (8.813.584)	Eppendorf, Hamburg
Combitips Plus 10 ml (0030069.269)	Eppendorf, Hamburg
Deckgläser (01-2460/1)	R. Langenbrinck, Emmendingen
Einbettkassetten Rotilapo (K.113.1)	Carl Roth, Karlsruhe
Einweg-Pasteurpipetten (EA70.1)	Carl, Roth, Karlsruhe
Entsorgungsbeutel (E706.1)	Carl, Roth, Karlsruhe
Färbeeinsatz (11-0002)	R.Langenbrinck, Emmendingen
Färbeküvette (11-0001)	R.Langenbrinck, Emmendingen
Filter Tip PP natrual 0–100 µl (07-642-8300)	Nerbe plus, Winsen/Luhe
Filter Tip PP natrual 0,5–10 µl (07-602-8300)	Nerbe plus, Winsen/Luhe
Filter Tip PP natrual 100–1000 µl (07-693-8300)	Nerbe plus, Winsen/Luhe

<b>Produktbezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Filter Tip PP natrual 200 µl (07-662-8300)	Nerbe plus, Winsen/Luhe
GAZIN Mullkompressen (18501)	Lohmann & Rauscher, Neuwied
GAZIN Mullkompressen steril (13620)	Lohmann & Rauscher, Emmendingen
Glasröhrchen No. 2775/6 75x12mm	Assistent, Sondheim
Handschuhe DermaClean (PFC4303971)	Ansell, München
ImmEdge Hydrophobic Barrier Pen (H-4000)	Vector Labs, Peterborough (UK)
Immun-Blot PVDF Membrane (162-0177)	Bio-Rad Laboratories, München
Kanülen Microlance 20 G (301300)	Becton Dickinson, Heidelberg
Kanülen Microlance 24 G (304100)	Becton Dickinson, Heidelberg
Kanülen Microlance 25 G (300400)	Becton Dickinson, Heidelberg
Kanülen Microlance 27 G (302200)	Becton Dickinson, Heidelberg
Kryoröhrchen 1,8 ml Nunc (368632)	Thermo Scientific, Bonn
Micro packaging vial closure (91-PCS-TC)	PEQLAB, Erlangen
Micro packaging vials, 2 ml (91-PCS-TV)	PEQLAB, Erlangen
Microseal 'B'seal (MSB1001)	Bio-Rad Laboratories, München
Mikrotiterplatte Mikroplate (655101)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Mikrotiterplatte Nunc Maxisorp (442404)	Thermo Scientific, Bonn
Mikrotomklinge S35	Feather, Tokio (J)
Multiplate PCR Plates 96-well, clear (MLL9601)	Bio-Rad Laboratories, München
Multi-SafeSeal Tubes (7083.1)	Carl Roth, Karlsruhe
Nähgarn Mercifil No 50 (M3541)	Amann und Söhne, Bönningheim
Objektträger (03-0004)	R.Langenbrinck, Emmendingen
Objektträger Superfrost Plus (03-0060)	R.Langenbrinck, Emmendingen

<b>Produktbezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Parafilm (PM-996)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
PCR-Platte Multi-Rigid Ultra Plates (N421.1)	Carl Roth, Karlsruhe
Petrischalen Cellstar	Greiner bio-one, Frickenhausen
Pipettenspitzen 10 µl (70.1115)	Sarstedt, Nürnberg
Pipettenspitzen 1000 µl (686290)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Pipettenspitzen 200 µl (0030.000.870)	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen 200 µl (70760002)	Sarstedt, Nürnberg
Pipettenspitzen 2000 µl (K315.1)	Carl Roth, Heidelberg
Polypropylenröhrchen 15 ml (188271)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Polypropylenröhrchen 50 ml (352070)	Becton Dickinson, Heidelberg
Polystyrenröhrchen 5 ml (352052)	Becton Dickinson, Heidelberg
Precellys Ceramic Beads 1,4 mm	peqlab, Erlangen
Reaction Tubes 1,5 ml (616201)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Safe-lock Tubes 0,5 ml (0030121023)	Eppendorf, Hamburg
Spritze 1 ml (300013)	Becton Dickinson, Heidelberg
Spritze Injekt 10 ml (4606108V)	Braun, Melsungen
Spritze Injekt 2 ml (4606027V)	Braun, Melsungen
Spritze Injekt 5 ml (4606051V)	Braun, Melsungen
Stripetten 10 ml (356551)	Becton Dickinson, Heidelberg
Stripetten 25 ml (356525)	Becton Dickinson, Heidelberg
Stripetten 5 ml (356543)	Becton Dickinson, Heidelberg
Venenkatheter Insyte 22 G (381223)	Becton Dickinson, Heidelberg
Zählkammer C-Chip (DHC-N01)	Digital Bio, Seoul (ROK)
Zellsiebe Cell Strainer 70 µl (352350)	Becton Dickinson, Heidelberg

## 2.1.6 Primer

Produkt- bezeichnung	Basenabfolge	Hersteller
Adenosine A2B receptor For	5'-gca tta cag acc ccc acc aa-3'	biomers.net GmbH, Ulm
Adenosine A2B receptor Rev	5'-ttt ata cct gag cgg gac gc-3'	biomers.net GmbH, Ulm
18s m/h for	5'-gta acc cgt tga acc cca tt-3'	biomers.net GmbH, Ulm
18s m/h rev	5'-cca tcc aat cgg tag tag cg-3'	biomers.net GmbH, Ulm

## 2.1.7 Medikamente

Produktbezeichnung	Hersteller
Cotrim E-ratiopharm 480 mg/5 ml Saft (N52348)	Ratiopharm, Ulm
Desinfektionsspray Softasept	Braun, Melsungen
Heparin-Natrium 25000 I.E./5 ml	Ratiopharm, Ulm
Ketamin 50 $\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$	Ratiopharm, Ulm
NaCl 0,9% 10 ml	Braun, Melsungen
Rompun 2% (25 ml Xylazin) 20 mg/ml	Bayer, Leverkusen
Sevofluran (F3023800)	AbbVie, Ludwigshafen

## 2.1.8 Mäusestämme

Die Wildtyp-Mäuse des Stammes C57 BL/6 wurden für die in-vivo-Versuche von Charles River, Sulzbach erworben. Die korrespondierenden Knock-out Mäuse (A2b -/-) wurden von der Boston University, School of Medicine Department of Biochemistry (Dr. Katya Ravid, Boston, USA) bezogen. Die Versuchstiere waren männlich und zwischen 8 und 12 Wochen alt. Die Genehmigung der Tierversuche erfolgte durch das Regierungspräsidium Tübingen im Genehmigungsantrag A1/14.

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Induktion einer sterilen Peritonitis im Mausmodell**

Die Peritonitis wurde durch Injektion von Zymosan induziert. Dafür wurde Zymosan abgewogen und in NaCl gelöst, so dass es in einer Konzentration von 1 mg/ml NaCl vorlag. Zum Versuchsbeginn wurde der Maus 1 ml davon i.p. injiziert und damit eine sterile Inflammation im Sinne einer Peritonitis ausgelöst. Die akute Peritonitis wurde durch Entnahme der Organe nach 4 h untersucht. Kontrolltiere erhielten 1 mL NaCl i.p..

### **2.2.2 Behandlung mit dem Inhalationsnarkotikum Sevofluran**

Die Behandlung mit Sevofluran erfolgte eine Stunde nach Induktion der sterilen Peritonitis. Dafür wurde ein System aufgebaut (siehe Abbildung 2), bestehend aus einer Sauerstoffflasche (1), einem Vaporisator (2) und einer Plexiglaskammer für zwei bis maximal acht Mäuse (3). Die Sauerstoffflasche wurde mit dem Vaporisator verbunden und dieser über einen Schlauch mit der Kammer konnektiert. Auf der anderen Seite der Kammer befand sich ein weiterer Schlauch, der durch Anschluss an einen aufgedrehten Wasserhahn (4) eine Sogwirkung herstellte. Eine kontinuierliche Sevofluran- (2,0 %) und Sauerstoffzufuhr (2 l/min) wurde so gewährleistet und die Mäuse für 30 min narkotisiert. Die jeweiligen Konzentrationen wurden mittels eines Gerätes (Vamos, Dräger) kontinuierlich gemessen. Nach Ablauf der Zeit wurde die Sevofluranzufuhr gestoppt und die Mäuse zurück in ihre Käfige gesetzt. Zweieinhalb Stunden später erfolgte die Organentnahme (siehe Abbildung 3).

### **2.2.3 Quantifizierung der Einwanderung von PMNs in die verschiedenen Organe**

Die Einwanderung von PMNs in die verschiedenen Organe wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie quantifiziert. Untersucht wurde dabei die PMN-Zahl in Peritoneallavage, Blut, Leber und Lunge.

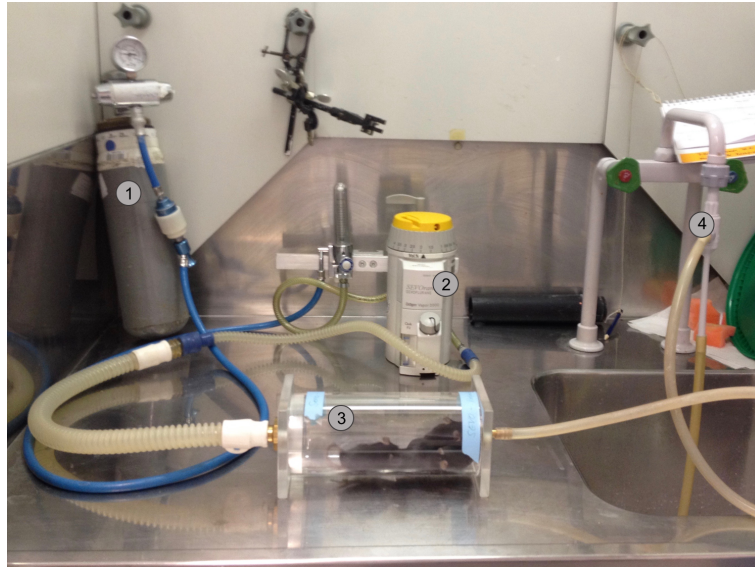


Abbildung 2: **Versuchsaufbau der Sevofluran-Inhalation:** Sauerstoffflasche (1), Vaporisator (2), Plexiglaskammer (3), Wasserhahn mit Sogwirkung (4) sind jeweils mit Schläuchen verbunden.

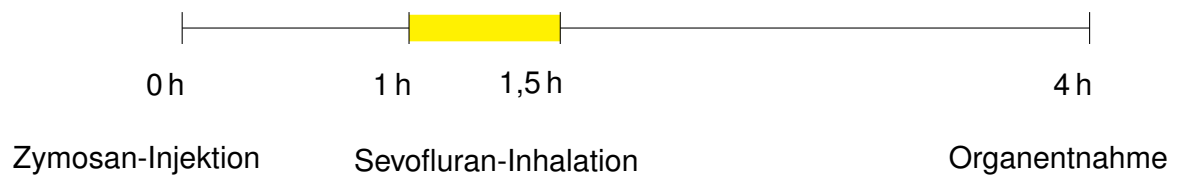


Abbildung 3: **Versuchsablauf:** Der Versuch wurde mit der Zymosan-Injektion gestartet. Nach einer Stunde erfolgte die 30-minütige Sevofluran-Inhalation. Nach vier Stunden wurde der Versuch durch die Organentnahme beendet.



## **Durchführung und Entnahme der Peritoneallavage**

4 h nach Induktion der Zymosan-induzierten Peritonitis bzw. zweieinhalb Stunden nach Behandlung mit Sevofluran wurde der Versuchsm Maus 300–350 µl Narkoselösung (1 ml Narkoselösung enthielt 750 µl NaCl, 200 µl Ketamin und 50 µl Rompun) i.p. injiziert.

Nach 5 min wurde die Maus fixiert, mit 70 %-igem Ethanol eingesprüht und abgewischt. Zur Entnahme der Peritoneallavage wurde zunächst ein kleiner Hautschnitt oberhalb der Harnblase gesetzt und durch das nun sichtbare Peritoneum 5 ml PBS<sup>-</sup> in die Peritonealhöhle injiziert. Nach kurzer Bauchmassage wurde die Haut abpräpariert und lateral am tiefsten Punkt ca. 3 ml der Peritoneallavage entnommen. Diese wurde in ein auf Eis gelagertes kleines Falcon (15 ml Gesamtvolumen) überführt und anschließend zentrifugiert (1300 rpm, 10 min, 4 °C). Der Überstand wurde zur späteren Verwendung aliquotiert und bei –80 °C eingefroren. Das Pellet wurde für die durchflusszytometrische Messung mit 0,9 ml Färbepuffer (FP) (bestehend aus 5 g Bovines Serum Albumin (BSA) und 2,5 ml NaN<sub>3</sub>-Lösung in 500 ml PBS<sup>-</sup>) resuspendiert.

## **Blutentnahme**

Nach Abnahme der Peritoneallavage wurden Abdomen und Thorax eröffnet und aus dem noch schlagenden Herzen mit einer heparinisierten Spritze 500–800 µl Blut entnommen, in ein Eppendorf-Cup überführt und auf Eis gelagert. Anschließend wurden Bauchorta und Vena cava inferior unterhalb der Nieren durchtrennt und der Blutkreislauf mit 3 ml PBS<sup>-</sup> gespült. 100 µl des entnommenen Blutes wurden in ein Polystyrenröhrchen überführt und daraus wiederum 10 µl zur Bestimmung der Zellzahl verwendet.

## **Entnahme der Organe**

Zur Untersuchung der PMN-Zahl in der Leber wurde der rechte obere Leberlappen entnommen, kurz in PBS<sup>-</sup> gespült, abgetupft und in 2,5 ml Enzymlösung (bestehend aus 2,5 ml PBS<sup>-</sup> und je 2,5 µl DNase, Hyaluronidase und Collagenase) in einer Petrischale zerkleinert und mit einer Einweg-Pasteurpipette in ein großes Falcon (50 ml Gesamtvolumen) überführt.

Für die Untersuchung der PMN-Zahl in der Lunge wurde das ganze Herz-Lungen-Paket entnommen und die drei Lappen des rechten Lungenflügels sauber abpräpariert, von Blut gereinigt und ebenfalls in Enzymlösung zerkleinert. Das zerkleinerte Gewebe wurde für 30 min bei 37 °C und 70 rpm auf dem Thermoschüttler inkubiert. Im Anschluss wurde das Gewebe mit Hilfe des Stempels einer 2 ml-Spritze durch ein Zellsieb gedrückt und mit 20 ml PBS<sup>-</sup> nachgespült. Nach anschließender Zentrifugation (1300 rpm, 10 min, 4 °C) wurde der Überstand verworfen, das Pellet mit 5 ml Lysepuffer (siehe Tabelle 2) resuspendiert und für 5 min inkubiert. Die Lyse wurde mit 20 ml PBS<sup>-</sup> und anschließender Zentrifugation (1300 rpm, 10 min, 4 °C) gestoppt. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 4,8 ml FP resuspendiert.

Tabelle 2: Zusammensetzung des Lysepuffers

NH <sub>4</sub> Cl	40,12 g
NaHCO <sub>3</sub>	4,2 g
EDTA	1,86 g
H <sub>2</sub> O	500 ml

### Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS)-Färbung

Um die für die Durchflusszytometrie notwendige Konzentration von  $2 \cdot 10^5$  Zellen/ $\mu$ l in den Zellsuspensionen zu erhalten, wurde zunächst die Zellzahl bestimmt. Dafür wurden 10  $\mu$ l der gewonnenen Proben aus Peritoneallavage, Blut, Leber und Lunge mit 90  $\mu$ l Türksche Lösung vermischt, 10  $\mu$ l davon auf eine Neubauer-Zählkammer aufgetragen und am Mikroskop ausgezählt. Die Zellsuspensionen wurden entsprechend verdünnt bzw. konzentriert.

Anschließend wurden 3  $\mu$ l eines Antikörper-Mix in ein jeweiliges Polystyrenröhrchen vorgelegt. Die Verdünnung der dafür verwendeten Antikörper (Ak) erfolgte wie in Tabelle 3 beschrieben. Dazu wurden je 100  $\mu$ l der Zellsuspensionen von Leber, Lunge bzw. Peritoneallavage pipettiert. Die Proben wurden anschließend bei 4 °C für 20 min inkubiert und zweimal mit je 2 ml FP gewaschen, zentrifugiert (1300 rpm, 5 min, 4 °C) und zum Schluss in 400  $\mu$ l Fixierlösung (bestehend aus 200  $\mu$ l FP und 200  $\mu$ l Paraformaldehyd (PFA) 4 %) resuspendiert.

Für die Isotypenkontrolle wurde eine Probe mit CD45 PerCP (0,02 mg/ml), IgG2a FITC (0,02 mg/ml) und IgG2b APC (0,05 mg/ml) gefärbt.

Tabelle 3: Zusammensetzung des Antikörper-Mix

Fluoreszenz-Antikörper	Ak (µl)	FP(µl)	Spezifität
7/4 FITC (0,1 mg/ml)	2	8	7/4 Klon neutrophiler Granulozyten
CD45 PerCP (0,2 mg/ml)	1	9	Leukozyten
Gr-1 APC (0,2 mg/ml)	1	9	Neutrophile Granulozyten

Zur Verarbeitung des Blutes wurden ebenfalls 3 µl des Antikörper-Mixes (siehe Tabelle 3) vorgelegt und 100 µl Blut hinzugefügt. Dieses wurde für 15 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und anschließend mit 2 ml Blutlyse (bestehend aus 1,8 ml destilliertes Wasser (Aqua dest.) und 0,2 ml BD FACTs Lysis Solution) resuspendiert. Die Lyse wurde nach 15 min durch Zentrifugation (1300 rpm, 10 min, 4 °C) gestoppt. Die Proben wurden im Anschluss einmal mit 2 ml FP gewaschen, zentrifugiert (1300 rpm, 10 min, 4 °C) und in 400 µl Fixierlösung resuspendiert.

### Analyse am Durchflusszytometer und Auswertung

In den zuvor aufbereiteten Proben von Peritoneallavage, Leber, Lunge und Blut wurde am Durchflusszytometer die Zahl der Leukozyten gemessen. Dafür wurde mit Hilfe der Software BD FACS Diva während der Analyse im Forward und Sideward Scatter ein Fenster um die Leukozyten-Population gesetzt und nach Zählung von 10 000 Zellen darin die Aufnahme gestoppt. Mit dem Programm FlowJo<sup>®</sup> wurden anschließend die Antikörper-Fluoreszenzen kompensiert und im Leukozyten-Fenster die Zahl der CD45 positiven Zellen dargestellt. Im Anschluss wurde darin der Anteil an FITC und Gr-1 positiven Zellen bestimmt und durch Abgleich mit einer Isotypenkontrolle Artefakte durch unspezifische Antikörperbindungen ausgeschlossen. Die vorher bestimmte Zellzahl und der entsprechende Anteil an CD45, FITC und Gr-1 positiven Zellen ergab die Anzahl an PMNs in Peritoneallavage, Blut, Leber und Lunge.

## 2.2.4 Analyse der Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle

Zur Analyse der Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle auf den PMNs wurden bei der Vorbereitung zur Durchflusszytometrie (siehe Abschnitt 2.2.3) zusätzlich zum Antikörper-Mix noch 1 µl des Antikörpers des zu untersuchenden Adhäsionsmoleküls hinzugegeben. Diese wurden entsprechend Tabelle 4 verdünnt.

Tabelle 4: Verdünnung der Adhäsionsmoleküle

Fluoreszenz-Antikörper	Verdünnung des Ak in FP
CD11a PE (0,2 mg/ml)	1:4
CD11b PE (0,2 mg/ml)	1:5
CD31 PE (0,2 mg/ml)	1:2
CD44 PE (0,2 mg/ml)	1:2
CD54 PE (0,2 mg/ml)	1:4
CD162 PE (0,2 mg/ml)	1:8

Die weitere Verarbeitung, Messung und Auswertung erfolgte wie in Abschnitt 2.2.3 beschrieben. Bei der Auswertung mittels FlowJo konnte nach Ermittlung der FITC und Gr-1 positiven Leukozyten, den PMNs, die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) des entsprechenden Adhäsionsmolekül-Antikörpers darauf bestimmt werden. Diese stellte die Expression des jeweiligen Adhäsionsmoleküls dar.

## 2.2.5 Myeloperoxidasebestimmung

Als Antwort auf einen inflammatorischen Reiz schütten PMNs ihre Granula aus, welche auch das Enzym Myeloperoxidase (MPO) enthalten. Die MPO-Aktivität korreliert mit der Anzahl migrierter PMNs ins Gewebe und spiegelt deren Aktivität wieder. Der fotometrische Nachweis erlaubt somit eine weitere Visualisierung der PMN-Migration und eine Bestätigung der mit der Durchflusszytometrie erhaltenen Ergebnisse [58]. Die Untersuchung erfolgte im Überstand der Peritoneallavage, die, wie in Abschnitt 2.2.3 beschrieben, entnommen wurde. Es wurden auf einer 96-Well-Platte 50 µl der Peritoneallavage-Probe, des Standards oder des Leerwerts in Duplikaten aufgetragen, 50 µl Citratpuffer und 100 µl ABTS-Reagent (50 ml Reagent enthielten 28 mg ABTS, 5 ml Citratpuffer und 45 ml Aqua dest.) hinzugegeben und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Absorption wurde mit Hilfe des Tecan Plattenlesegeräts bei 405 nm

gemessen. Der Standard wurde mit aus dem Knochenmark isolierten PMNs hergestellt (Vorgehensweise siehe Abschnitt 2.2.11), wobei 50 µl 200 000 Zellen enthielten. Als negative Kontrolle diente PBS<sup>-</sup>.

## 2.2.6 Proteinbestimmung nach BCA-Methode

Bei der Proteinbestimmung mit der BCA-Methode macht man sich zu nutzen, dass Protein in alkalischer Lösung einen Komplex mit Cu<sup>2+</sup>-Ionen bildet, die sogenannte Biuret-Reaktion. Im Fall von Bicinchonininsäure (BCA) entsteht dabei ein stabiler violetter Farbkomplex, der fotometrisch nachgewiesen werden kann. Untersucht wurde damit die Gesamtproteinmenge im Überstand der, wie in Abschnitt 2.2.3 beschrieben, entnommenen Peritoneallavage. Die Vorgehensweise erfolgte nach dem Pierce<sup>TM</sup>BCA Protein Assay Kit. Dafür wurde auf einer 96-Well-Platte 25 µl der Peritoneallavage-Probe, des Standards oder des Leerwerts in Duplikaten aufgetragen und 200 µl BCA Arbeitsreagent (bestehend aus Lösung A und Lösung B) hinzugegeben. Nach 30 min Inkubation bei 37 °C wurde die Absorption mit Hilfe des Tecan Plattenlesegeräts bei 562 nm gemessen.

## 2.2.7 Histologie

Zur Fertigung der histologischen Präparate wurden C57 BL/6 - und A2b -/- Mäuse in vier Gruppen aufgeteilt (siehe Tabelle 5). Die Induktion der Zymosan-induzierten Peritonitis und die Behandlung mit Sevofluran erfolgten wie in Abschnitt 2.2.1 und 2.2.2 beschrieben.

Tabelle 5: Gruppen zur Fertigung histologischer Präparate

Gruppe 1	NaCl
Gruppe 2	NaCl und Behandlung mit Sevofluran
Gruppe 3	Zymosan-induzierte Peritonitis
Gruppe 4	Zymosan-induzierte Peritonitis und Behandlung mit Sevofluran

## Organentnahme

Der narkotisierten Maus wurde die Haut vom Hals aus bis zum unteren Abdomen abpräpariert, Peritoneum und Thorax eröffnet und Herz und Blutkreislauf mit 3 ml PBS<sup>-</sup> gespült. Im Anschluss wurde der Maus ein Venenverweilkatheter in die Trachea gelegt und über diesen passiv Formalin 4 % über 12 min in die Lunge eingeführt. Um einen Überdruck auf die Lunge zu vermeiden, durfte der Formalinpegel sich nicht mehr als 20 cm über der Maus befinden. Im Anschluss wurde die Lunge entnommen, linke und rechte Lunge dabei geteilt und in Einbettkassetten für 24 h in Formalin 4 % aufbewahrt. Des Weiteren wurden der rechte obere Leberlappen lateral der Gallenblase, sowie die letzten 4 cm des Enddarms entnommen und ebenfalls in Einbettkassetten für 24 h in Formalin 4 % aufbewahrt.

## Einbettung der Organe

Nach 24 h wurde zunächst das Formalin abgekippt, die Proben mit 70 %-igem Ethanol abgewaschen und in einen Einbettautomaten gegeben. Der Automat durchlief 12 Stationen (siehe Tabelle 6).

Tabelle 6: Stationen des Einbettautomats

Station 1	70 % Ethanol	1,5 h
Station 2	70 % Ethanol	1 h
Station 3	96 % Ethanol	1,5 h
Station 4	96 % Ethanol	1 h
Station 5	100 % Ethanol	1,5 h
Station 6	100 % Ethanol	1 h
Station 7	100 % Ethanol	1 h
Station 8	Xylol	1,5 h
Station 9	Xylol	1,5 h
Station 10	Xylol	1 h
Station 11	Paraffin wax	1,5 h
Station 12	Paraffin wax	1,5 h

Nach Durchlauf aller Stationen wurden die Proben mit Hilfe eines Einbettgerätes in Paraffinblöcke gegossen und bei RT bis zur weiteren Verwendung gelagert.

## **Gewebeschnitte**

Mit dem Rotationsmikrotom wurden von den Paraffinblöcken 3 µm dicke Schnitte angefertigt und diese mit einem Pinsel von einem kühlen in ein warmes (37 °C) Wasserbecken und auf einen Objektträger übertragen. Die Objektträger wurden über Nacht auf einer Wärmeplatte (42 °C) getrocknet.

## **Immunhistochemische Färbung**

Für die immunhistochemische Färbung der Paraffinschnitte zur Darstellung der PMNs wurden diese zunächst zwei Mal für 5 min in Xylol und in absteigenden Ethanolkonzentrationen (100 %, 96 %, 70 %) entparaffiniert und anschließend zwei Mal für 5 min in Aqua dest. rehydriert. Im Anschluss wurden die Objektträger zur Blockierung der endogenen Peroxidase in 200 ml Methanol mit 3 ml 30 %-igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 30 min bei RT inkubiert, für 5 min in Aqua dest. gewaschen und 20 min bei 600 W in Unmasking Solution (320 ml Aqua dest. + 3 ml Unmasking Solution) in der Mikrowelle gekocht. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die Objektträger für 5 min in PBS<sup>-</sup> gespült, die Präparate mit einem Pap-Pen eingekreist und für 1 h mit Avidin Blocking Solution (1 ml enthielt 1 ml 0,5 % FSGO/PBS<sup>-</sup>, 100 µl Normal Rabbit Serum (NRS) und 4 Tropfen Avidin Blocking Solution) bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert.

Nach Abkippen und 5 min Spülen in PBS<sup>-</sup> folgte die Färbung mit dem Primärantikörper. Dazu wurde einer Biotin Blocking Solution (bestehend aus 1 ml 0,5 % FSGO/PBS<sup>-</sup>, 100 µl NRS und 4 Tropfen Biotin Blocking Solution) 1 µl des Primär-Antikörpers (Rat anti mouse neutrophils (7/4)) zur Färbung der PMNs oder 1 µl Normal IgG Rat zur IgG-Kontrolle hinzugefügt und die Schnittpräparate damit über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4 °C inkubiert. Die Negativkontrolle erfolgte ohne jeglichen Zusatz zur Biotin Blocking Solution.

Am nächsten Tag erfolgte nach Abkippen und 5 min Spülen der Objektträger in 0,5 % FSGO/PBS<sup>-</sup> die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (bestehend aus 1 ml 0,5 % FSGO/PBS<sup>-</sup>, 100 µl NRS und 10 µl Sekundärantikörper (Rabbit anti rat)) für 1 h bei RT in einer feuchten Kammer. Im Anschluss wurde abgekippt und 5 min in 0,5 % FSGO/PBS<sup>-</sup> gespült und die Präparate für 30 min bei RT in einer feuchten Kammer

mit ABC-Lösung (bestehend aus 1 ml PBS<sup>-</sup>, 20 µl Solution A und 20 µl Solution B aus dem Vectastain ABC-Kit) inkubiert. Der mit Peroxidase markierte Avidin-Biotin-Komplex konnte dabei an den Sekundärantikörper binden.

In der Zwischenzeit wurden die Diamino-benzidin 3,3' (DAB)-Tabletten aufgelöst (je eine DAB- und eine Urea-Hydrogen-Peroxid-Tablette in 1 ml Aqua dest.) und eine kleine Probe davon in die Restmenge der ABC-Lösung gegeben. Die an den Avidin-Biotin-Komplex gebundene Peroxidase reagierte mit Wasserstoffperoxid und das vorher farblose Chromogen DAB bildete ein braunes Endprodukt. Der erfolgreiche Farbumschlag bestätigte die Funktionsfähigkeit der Reagenzien. Nach Ablauf der Inkubation konnte die ABC-Lösung abgekippt werden, die Objekte für 5 min in 0,5 % FSGO/PBS<sup>-</sup> gespült und für 5 min mit der vorher hergestellten DAB-Lösung inkubiert werden. Dies führte wie oben beschrieben zur späteren Darstellung der PMNs in brauner Farbe. Anschließend wurden die Objektträger abgekippt und 5 min in Aqua dest. gespült um in May-Grünwalds Eosin-Methylenblaulösung 15 sec gegengefärbt zu werden. Nach 5 min Spülen unter laufendem Leitungswasser konnten die Objektträger zur optimalen farblichen Darstellung in Bluing Reagent für 1 min gebläut und anschließend für 3 min unter laufendem Leitungswasser gespült werden. Danach erfolgte die Dehydrierung der Schnittobjekte durch Inkubation je zwei Mal 3 min in Ethanol mit aufsteigender Konzentration (70 %, 96 %, 100 %) und Xylol. Zum Abschluss wurden die Schnittobjekte auf den Objektträgern mit Eukitt und darüber liegendem Deckglas eingedeckt und bis zur Betrachtung am Mikroskop bei RT aufbewahrt.

### **Mikroskopische Auswertung**

Die Betrachtung der immunhistochemisch gefärbten Schnittobjekte erfolgte am Mikroskop in 40-facher, 64-facher und 100-facher Vergrößerung. Mit Hilfe des Programms Axio Vision konnten Bilddateien aufgenommen und gespeichert werden. Die PMNs stellten sich dabei braun dar.



## 2.2.8 Real time q-PCR

### RNA-Isolation mit peqGold TriFast™

Für die Organentnahme erfolgte die Präparation der Maus wie in Abschnitt 2.2.3 beschrieben. Für die RNA-Isolation aus Lebergewebe wurde der rechte Leberlappen unterhalb des entnommenen Leberlappens zur durchflusszytometrischen Messung gewählt. Als Lungengewebe wurde die linke Lunge und als Darmgewebe die letzten 2 cm des distalen Colons entnommen. Die Organe wurden entnommen, kurz in PBS<sup>-</sup> von Blut gereinigt, in ein Kryoröhrchen überführt und bis zur weiteren Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Das Knochenmark wurde wie in Abschnitt 2.2.11 beschrieben isoliert und ebenfalls bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

Die Isolation der RNA erfolgte nach dem peqGOLD TriFast™-Protokoll. 50–100 mg des aufgetauten Gewebes wurden in 1 ml peqGOLD TriFast™ homogenisiert, 5 min bei RT inkubiert, zur Phasentrennung mit 0,2 ml Chloroform für 10 min (RT) inkubiert und anschließend zentrifugiert (5 min, 12.000 x g, RT). Die wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorfcup überführt und mit 0,5 ml Isopropanol für 15 min auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert (10 min, 12.000 x g,  $4^{\circ}\text{C}$ ). Zum Schluss wurde das RNA-Pellet zweimal mit 75 %-igem Ethanol gewaschen und zentrifugiert (10 min, 12.000 x g,  $4^{\circ}\text{C}$ ), der Überstand abgekippt, das Pellet an der Luft getrocknet und abschließend in 40  $\mu\text{l}$  nukleasefreies Wasser (NFW) resuspendiert.

### Konzentrationsbestimmung und cDNA-Umschrieb

Die Konzentrationsbestimmung der isolierten RNA erfolgte mit Hilfe des Nanodrop 2000 Spectrophotometer. Die Zielkonzentration lag bei 300–600 ng/ $\mu\text{l}$ , bei höheren Konzentrationen wurde die RNA verdünnt und die Konzentration neu bestimmt. Die  $\text{OD}_{260/280}$  Ratio lag bei 1,6–2,0. Der Umschrieb der RNA in cyclische Desoxyribonukleinsäure (cDNA) erfolgte mit dem iScript™ cDNA Synthesis Kit der Firma BIO-RAD. Damit wurde in ein 0,2 ml Eppendorfcup 4  $\mu\text{l}$  5x iScript reaction mix, 1  $\mu\text{l}$  iScript reverse transcriptase und 15  $\mu\text{l}$  RNA in NFW pipettiert, sodass darin 1  $\mu\text{g}$  RNA enthalten waren, die für 40 min im Thermocycler umgeschrieben wurden. Anschließend wurde jeder Probe 140  $\mu\text{l}$  NFW hinzugefügt.

## Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction

Zur quantitativen Bestimmung der umgeschriebenen cDNA wurden je 4 µl der Probe, der Verdünnungsreihe des Standards (1:2, 1:4, 1:8, 1:16) und des Leerwerts auf eine 96-Well-Platte aufgetragen. Die Auftragung erfolgte für das gesuchte Gen (dem A2b-R) in Triplikaten, für das Housekeeping-Gen 18S bei der Probe in Duplikaten, bei der Verdünnungsreihe in Triplikaten. Der Leerwert bestand aus NFW und wurde jeweils für den Primer und für das Housekeeping-Gen pipettiert. Jedem Well wurden 21 µl des PCR-Mix mit dem entsprechenden Primer (gesuchtes Gen oder Housekeeping-Gen) hinzugefügt. Der PCR-Mix bestand aus 12,5 µl SybrGreen, 7,5 µl NFW und 1 µl Primer-Mix (160 µl NFW, 20 µl Forward und 20 µl Reverse Primer des entsprechenden Gens). Zum Abschluss wurde die Platte mit einer luftdichten Folie verschlossen und die Real-time-PCR im iCycler des Bio-Rad CFX Manager gestartet. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Data Analysis von Bio-Rad CFX Manager.

### 2.2.9 Western Blot

#### Gelvorbereitung

Das Gel wurde entsprechend des molekularen Gewichts des Primär-Antikörpers (50–120 kDa) in einer Stärke von 10 % gegossen. Dazu wurde zunächst das Separating Gel (siehe Tabelle 7) zubereitet, in eine Gelkassette gefüllt, mit Wasser überdeckt und für 1 h zum Polymerisieren stehen gelassen. Im Anschluss wurde das Wasser abgekippt, die Kassette mit Stacking Gel (siehe Tabelle 7) aufgefüllt, ein Kamm der gewünschten Größe eingesetzt und für 1 h polymerisiert. Lower und Upper Buffer waren wie in Tabelle 8 beschrieben zusammengesetzt.

Tabelle 7: Zusammensetzung der Gele

Separating Gel (10 % Stärke)		Stacking Gel (5 % Stärke)	
13,3 ml	30 % Acrylamide	2,5 ml	30 % Acrylamide
10,8 ml	Lower Buffer	3,8 ml	Upper Buffer
15,9 ml	H <sub>2</sub> O	8,7 ml	H <sub>2</sub> O
200 µl	10 % APS	60 µl	10 % APS
80 µl	TEMED	20 µl	TEMED

Tabelle 8: Zusammensetzung Lower und Upper Buffer

Lower Buffer		Upper Buffer	
1,5 M	Tris-Base	0,5 M	Tris-Base
0,4 %	SDS	0,4 %	SDS
500 ml	Aqua dest.	500 ml	Aqua dest.
Einstellung auf pH 8,8		Einstellung auf pH 6,8	

### Vorbereitung des Proteins

Zur Proteingewinnung wurden Gewebeproben aus Leber, Lunge und Darm, die wie in Abschnitt 2.2.8 beschrieben entnommen wurden, aufgetaut und in Lysepuffer (bestehend aus Proteinase-Inhibitor 1:100 verdünnt in Ripa-Puffer) homogenisiert und für 20 min auf Eis gelagert. Anschließend wurde zentrifugiert (15 min, 12.000 x g, 4 °C) und der Überstand in ein neues Eppendorf-Cup überführt. Die anschließende Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit der BCA-Methode wie in Abschnitt 2.2.6 beschrieben. Anhand der Proteinkonzentration konnte die gewünschte Proteinmenge pro Tasche in µg ausgerechnet werden.

### Western Blot

Die entsprechende Proteinmenge wurde mit 4-fach konzentriertem Ladepuffer und Mercaptoethanol versetzt und für 10 min bei 70 °C gekocht. Das vorbereitete Gel wurde in die Blotting-Kammer gestellt, diese mit Laufpuffer (100 ml Tris-Glycine-SDS-Buffer 10x und 900 ml Aqua dest.) aufgefüllt und der Kamm im Gel vorsichtig entfernt, sodass Proteinmarker, Magic-Marker und die Proben in die Taschen pipettiert werden konnten. Anschließend lief das Gel für 90 min bei 110 V. Nach Beenden des Laufes wurde die Gelkassette aufgeknackt, das Gel zurecht geschnitten und auf eine PVDF-Membran in Transfer-Buffer (bestehend aus 400 ml Methanol, 200 ml Tris-Glycine 10x und 1400 ml Aqua dest.) aufgezogen und zwischen Filterpapieren in eine neue Gelkassette eingespannt. Der anschließende Blot lief für 90 min bei 110 V.

Die geblottete Membran wurde 60 min bei RT in Blockierlösung (2,5 g Magermilch mit TBST + 0,05 % Tween auf 50 ml auffüllen) geblockt und anschließend über Nacht mit dem in Blockierlösung verdünntem Primär-Antikörper des gesuchten Proteins bei 4 °C inkubiert. Die Verdünnung des Primär-Antikörpers erfolgte nach der Produkt-

beschreibung. Am nächsten Tag wurde die Membran drei Mal für 10 min in TBST + 0,1 % Tween gewaschen, um überschüssigen Antikörper zu entfernen, und für 60 min bei RT mit dem in Blockierlösung verdünnten Sekundär-Antikörper inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in TBST + 0,1 % Tween für 10 min wurde die Membran für 5 min in TBS pH 8,0 gewaschen und für 5 min im Entwicklungsreagenz (bestehend aus je 2 ml von Reagenz A und Reagenz B des Western Blotting Luminol Reagent) inkubiert. Die Messung erfolgte mit dem Chemilumineszenz-Dektor Lumi-Imager und der damit verbundenen Software Fusion, welche die Aufnahme und das Speichern der entstandenen Bilddatei ermöglichte. Die Membran wurde anschließend gewaschen, mit Blockierlösung geblockt und mit in Blockierlösung verdünnten Primär-Antikörper gegen das Housekeeping-Gen GAPDH für 1 h inkubiert. Anschließend erfolgte das oben beschriebene Prozedere mit Waschen, Inkubation mit dem Sekundär-Antikörper, Waschen und Messung am Lumi-Imager Fusion SL. Die Auswertung der fotografierten Membranen wurde mit dem Programm ImageJ durchgeführt.

### **2.2.10 Messung der Zytokin- und Chemokinkonzentration in der Peritoneallavage**

Zur Messung der Zytokin- und Chemokinkonzentrationen in der Peritoneallavage wurde ein Sandwich-Enzym-linked Immunosorbent Assay (ELISA) nach Protokoll des DuoSet<sup>®</sup> ELISA Development System der Firma R&D durchgeführt. Untersucht wurden die Chemokine CXCL1 (auch bekannt als Keratinocyte-derived Chemokine (KC)) und CXCL2/3 (auch bekannt als Macrophage Inflammatory Protein-2 (MIP-2)) sowie die Zytokine IL-6 und TNF- $\alpha$  im Überstand der Peritoneallavage. Die Entnahme dieser erfolgte wie in Abschnitt 2.2.3 beschrieben.

Zur Vorbereitung der 96-Well Platte wurde diese mit 100  $\mu$ l des entsprechenden Capture-Antikörper über Nacht gecoatet. Am nächsten Tag wurde die Platte mit 0,05 % Tween in PBS<sup>-</sup> gewaschen und anschließend die freien Proteinbindungsstellen mit Reagent Diluent für 1 h geblockt. Nach erneutem Waschen wurden Proben und Standard in Duplikaten pipettiert und für 2 h inkubiert. Freies Antigen wurde abgewaschen und die Platte für 2 h bei RT mit 100  $\mu$ l Detection-Antikörper inkubiert. Überschüssige

freie Antikörper wurden abgewaschen und die Platte für 20 min bei RT im Dunkeln mit 100 µl Streptavidin-HRP (Verdünnung 1:200) inkubiert. Nach Abwaschen des überschüssigen Enzyms wurde die Farbreaktion mit 100 µl Substrat-Solution gestartet und nach 20 min mit 50 µl Stop-Solution wieder beendet. Der dadurch stattgefundenen Farbumschlag konnte im Tecan Plattenlesegerät bei 450 nm und 540 nm photometrisch nachgewiesen werden. Die bekannten Konzentrationen der Standardreihe erlaubten einen Rückschluss auf die Konzentrationen der detektierten Zytokine und Chemokine in der Peritoneallavage.

## **2.2.11 Knochenmarkstransplantation zur Erzeugung chimärer Mäuse**

Zur Erzeugung chimärer Mäuse wurde bei C57 BL/6 Wildtyp-Tieren das Knochenmark durch Bestrahlung und folgende Transplantation des Knochenmarks von A2b<sup>-/-</sup>-Tieren ersetzt. A2b<sup>-/-</sup>-Tieren wurde in gleicher Weise Knochenmark von Wildtyp-Tieren transplantiert. Dies erlaubte die differenzierte Untersuchung der Rolle des A2b-R bei isolierter Expression auf Blut- bzw. Endothelzellen.

### **Isolation muriner Knochenmarkszellen**

Zur Isolation des Knochenmarks wurde die Maus narkotisiert, im Anschluss euthanasiert und mit 70 %-igem Ethanol abgewaschen.

Beginnend mit einem Schnitt am Bauch wurde die Haut gürtelförmig aufgeschnitten, vom Peritoneum getrennt und bis zur Freilegung der unteren Extremitäten abgelöst. Das Hüftgelenk wurde freigelegt und der Femur entgegen der physiologischen Bewegungsrichtung exartikuliert. Zur Freilegung von Femur und Tibia wurden die Muskeln am Sehnenansatz durchtrennt, Sprung- und Kniegelenk exartikuliert und weiteres Weichteilgewebe entfernt. Durch Entfernung der Epiphysen mit einer Schere wurde die Knochenmarkhöhle beidseitig zugänglich und das Knochenmark von beiden Seiten mit 0,9 %-NaCl-Lösung in eine Petrischale gespült (10 ml Spritze, Kanüle 27G). Durch mehrmaliges Auf- und Abziehen wurden die Zellen voneinander separiert und in ein großes Falcon überführt.

10 µl der Zellsuspension wurden zur Bestimmung der Zellzahl (ZZ) mit 90 µl Türkische Lösung vermischt, anschließend ausgezählt und daraus die Gesamtzellzahl (GZZ) berechnet (siehe Gleichung 2.1):

$$GZZ = ZZ \cdot 2,5 \cdot 10 \cdot 1000 \cdot 10 \quad (2.1)$$

Um die gewünschte Konzentration von  $5 \cdot 10^6$  Zellen in 250 µl zu erhalten, wurde die Zellsuspension entsprechend mit NaCl resuspendiert.

### **Bestrahlung der Mäuse**

Zur Zerstörung des Empfänger Knochenmarks wurden die Mäuse zweimal in einem Abstand von vier Stunden mit 6 Gy von einer Gammazelle bestrahlt.

### **Transplantation**

Nach der Bestrahlung wurden 250 µl des isolierten Knochenmarks der Spendertiere in die Schwanzvene der Empfängertiere injiziert.

Im Anschluss wurden die Mäuse in einer sterilen Abzugsvorrichtung untergebracht, jeder Käfig war mit einer Filterhaube versehen. Die ersten zwei bis drei Wochen erhielten die Mäuse mit Antibiotikum versehenes Trinkwasser (1 mg/ml, Cotrim E 480 mg/5 ml Saft), anschließend normales Leitungswasser.

Die Quantifizierung migrierter PMNs (siehe Abschnitt 2.2.3) konnte nach sechs bis acht Wochen durchgeführt werden.

### **2.2.12 Fäzes-induzierte Peritonitis im Mausmodell**

Bei der Fäzes-induzierten Peritonitis (FIP) erfolgte die Induktion der Peritonitis durch Injektion von gesammeltem Kot und induziert damit im Gegensatz zur sterilen Zymosan-induzierten Peritonitis eine polymikrobielle Inflammation. Sie ähnelte damit mehr der klinischen Situation einer sekundären Peritonitis nach Hohlorganperforation.

### **Herstellung der Fäzeslösung**

Zur Herstellung der Fäzeslösung wurden 15 g Kot aus den Käfigen der C57 BL/6 Mäuse gesammelt, in 1 %-iger Glukoselösung bei 37 °C im Überkopfschüttler aufgelöst und mehrfach durch Gaze gefiltert, sodass eine Endkonzentration von 80 mg/ml vorlag. Die Lösung wurde anschließend aliquotiert und bis zur Verwendung bei –20 °C gelagert.

### **Injektion der Fäzeslösung**

Zu Beginn des Versuches wurde ein eingefrorener Aliquot aufgetaut und davon 500 µl i.p. in die Maus injiziert und damit eine akute Peritonitis induziert. Die Quantifizierung migrierter PMNs in Peritoneallavage, Leber und Lunge erfolgte wie in Abschnitt 2.2.3 beschrieben.

### **2.2.13 Statistische Auswertung**

Die statische Auswertung erfolgte mit *GraphPad Prism 5.0*. Statistische Unterschiede wurden mittels ONE WAY ANOVA und folgendem Bonferroni's Multiple Comparison Test analysiert. Ein  $p < 0,05$  galt dabei als signifikant. Die Darstellung der Daten erfolgte als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung.

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Einfluss von Sevofluran auf die PMN-Migration bei Zymosan-induzierter Peritonitis**

#### **3.1.1 Zeitpunkt der Sevofluran-Behandlung**

Zunächst wurde ermittelt, welchen Einfluss die Behandlung mit Sevofluran auf die Migration der PMNs in die verschiedenen Kompartimente während einer akuten Peritonitis hat. Dazu wurde in den Kompartimenten Peritoneallavage, Blut, Leber und Lunge von Wildtyp-Mäusen die Anzahl migrierter PMNs mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Sevofluran-Inhalation wurde zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt: gleichzeitig mit, eine Stunde und drei Stunden nach Zymosan-Injektion. Die Ergebnisse wurden mit Kontrollgruppen, welche kein Sevofluran inhalierten, verglichen. Dabei wurden zwischen den Kontrolltieren ohne Zymosan, welche weder Zymosan noch Sevofluran erhielten, und den Kontrolltieren mit Zymosan, welche Zymosan injiziert bekamen, aber kein Sevofluran erhielten, unterschieden.

Die Behandlung mit Sevofluran ohne Vorliegen einer Zymosan-induzierten Peritonitis führte zu keinen signifikanten Unterschieden in der Anzahl migrierter PMNs in den verschiedenen Kompartimenten im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Zymosan (siehe Abbildung 4), sodass daraus geschlossen werden konnte, dass Sevofluran bei gesunden Tieren keinen Effekt auf die PMN-Migration besitzt. Bei den Kontrolltieren mit Zymosan zeigte sich eine signifikant höhere PMN-Zahl in allen Kompartimenten verglichen mit den Kontrolltieren ohne Zymosan, was als inflammatorische Antwort auf Zymosan gewertet wurde (siehe Abbildung 4).

Durch die Sevofluran-Inhalation bei akuter Peritonitis kam es zu einer reduzierten



Anzahl an migrierten PMNs verglichen mit den Kontrolltieren mit Zymosan. Die PMN-Zahl war signifikant niedriger bei Sevofluran-Inhalation eine Stunde nach Zymosan-Injektion in Peritoneallavage (a), Leber (c) und Lunge (d). Im Blut (b) war die PMN-Zahl bei gleichzeitiger Inhalation und eine Stunde nach Zymosan-Gabe signifikant niedriger.

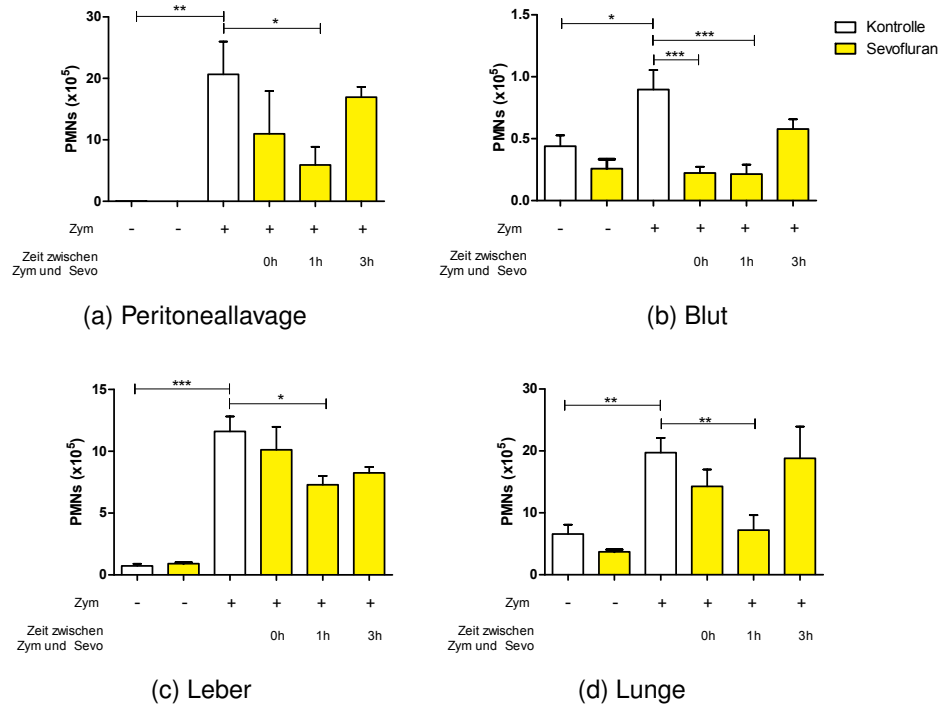


Abbildung 4: **PMN-Migration bei verschiedenen Zeitpunkten der Sevofluran-Behandlung:** PMN-Zahl in C57 BL/6 Wildtyp-Tieren in (a) Peritoneallavage, (b) Blut, (c) Leber und (d) Lunge in den Kontrollgruppen (weiße Balken) ohne und mit Injektion von Zymosan, sowie Behandlung mit Sevofluran 0 h, 1 h und 3 h nach Zymosan-Gabe (gelbe Balken). Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( $n \geq 6$ , \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , Zym: Zymosan, Sevo: Sevofluran).

PMNs bekämpfen Erreger am Ort des Entzündungsgeschehens durch Ausschüttung ihrer Granula, welche u.a. Myeloperoxidase (MPO) enthalten. Der Nachweis von MPO in der Peritoneallavage erlaubt somit Rückschlüsse auf die Aktivität und Anzahl migrierter PMNs. Eine Steigerung des Gesamtproteins in der Peritoneallavage ist ein Indikator für eine gesteigerte mikrovaskuläre Permeabilität und einem damit einhergehenden vermehrten Proteinverlust, wie es im Rahmen einer Entzündung vorliegt.

Im Rahmen der Inflammation, ausgelöst durch die Injektion von Zymosan, zeigt

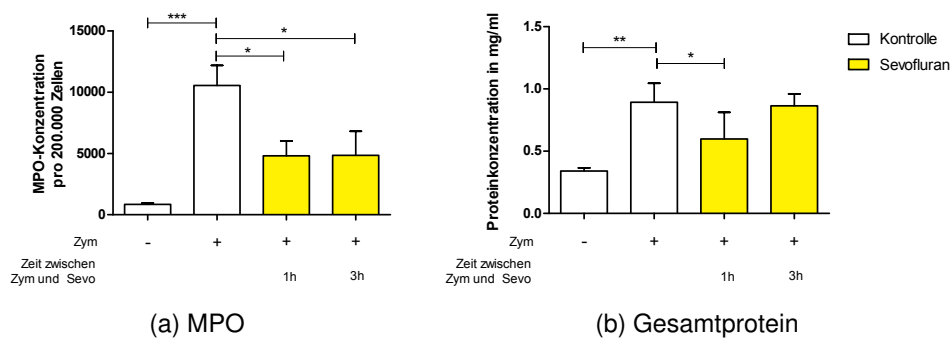


Abbildung 5: **MPO und Gesamtprotein bei verschiedenen Zeitpunkten der Sevofluran-Behandlung** (a) MPO und (b) Gesamtprotein in der Peritoneallavage bei Zymosan-Gabe ohne (weiße Balken) und mit Sevofluran 1 h und 3 h nach Zymosan-Injektion (gelbe Balken). Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( $n \geq 5$ , \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , Zym: Zymosan, Sevo: Sevofluran).

te sich in der Peritoneallavage der Kontrolltiere mit Zymosan der Myeloperoxidase- und Gesamtproteingehalt signifikant höher verglichen mit den Kontrolltieren ohne Zymosan (siehe Abbildung 5). Die Behandlung mit Sevofluran eine und drei Stunden nach Zymosan-Gabe führte zu einem signifikant niedrigerem Gehalt an Myeloperoxidase (siehe Abbildung 5 (a)) woraus auf eine reduzierte Aktivität und Migration von PMNs durch Sevofluran geschlossen werden kann. Dies bestätigte die Ergebnisse der Durchflusszytometrie. Der Gesamtproteingehalt (siehe Abbildung 5 (b)) war in der Peritoneallavage bei Sevofluran-Behandlung eine Stunde nach Zymosan signifikant niedriger verglichen mit den Kontrolltieren mit Zymosan. Daraus lässt sich schließen, dass Sevofluran die mikrovaskuläre Permeabilität reduziert, somit die endotheliale Barriere stabilisiert und einen erhöhten Proteinverlust verhindert.

Für die folgenden Versuche wurde deswegen die Behandlung mit Sevofluran eine Stunde nach Zymosan-Injektion festgelegt.

### 3.1.2 Zeitpunkt der PMN-Infiltration unter Zymosan ins Gewebe

Um den Höhepunkt der akuten Peritonitis, der Zeitpunkt zu dem am meisten PMNs ins Gewebe migrieren, zu ermitteln, wurde die Organentnahme und die durchflusszytometrische Bestimmung der PMN-Zahl 4 und 24 Stunden nach Zymosan-Injektion durchgeführt und verglichen.

Vier Stunden nach Zymosan-Gabe führte die Inhalation von Sevofluran zu einer signifikant geringeren PMN-Zahl in allen Kompartimenten im Vergleich zu den Kontrolltieren mit Zymosan (siehe Abbildung 6). Beim Vergleich der Kontrolltiere mit Zymosan nach 4 und 24 Stunden zeigte sich nach 24 Stunden eine geringere Anzahl migrierter PMNs in Lavage (a) und Blut (b), sowie eine signifikant niedrigere PMN-Anzahl in Leber (c) und Lunge (d). Nach 24 Stunden war die Anzahl an migrierenden PMNs insgesamt so gering, dass ein anti-inflammatorischer Effekt von Sevofluran nur noch im Blut (b) nachweisbar war. In den anderen Kompartimenten lag kein signifikanter Unterschied vor.

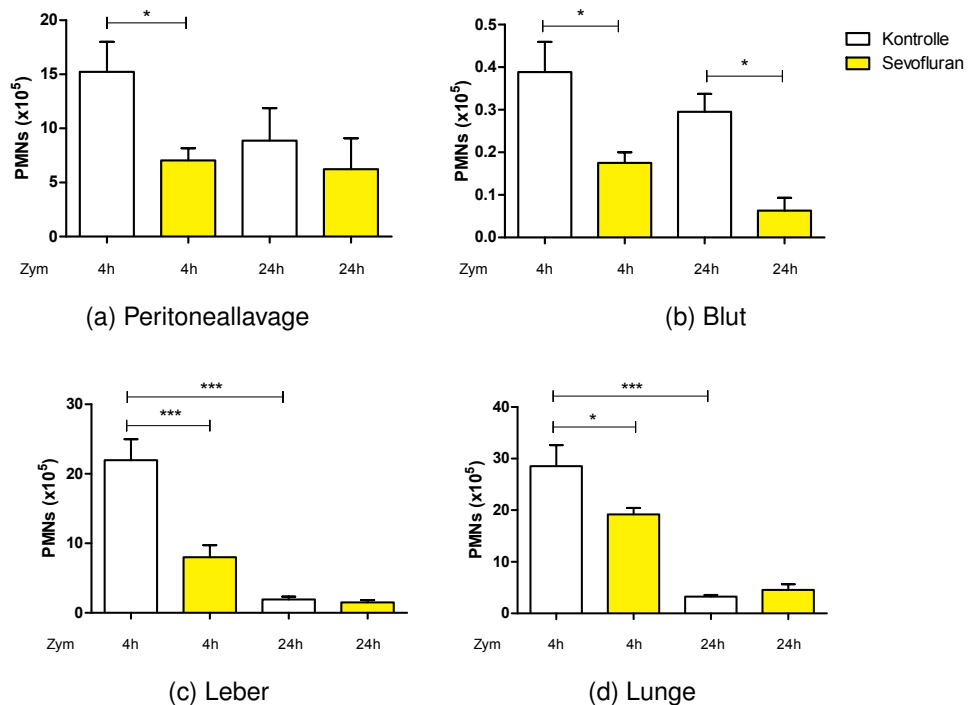


Abbildung 6: **PMN-Migration 4 und 24 Stunden nach Zymosan-Gabe:** PMN-Zahl in C57 BL/6 Wildtyp-Mäusen in (a) Peritoneallavage, (b) Blut, (c) Leber und (d) Lunge 4 h und 24 h nach Zymosan-Gabe (weiße Balken) und zusätzlicher Behandlung mit Sevofluran (gelbe Balken). Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( $n \geq 6$ , \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ , Zym: Zymosan).

Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie konnten durch die Messung des Myeloperoxidasegehalts in der Peritoneallavage bestätigt werden. Nach 4 Stunden zeigte sich durch Sevofluran-Inhalation eine signifikant niedrigere MPO-Konzentration in der Peritoneallavage im Vergleich zu den Kontrolltieren mit Zymosan (siehe Abbildung 7

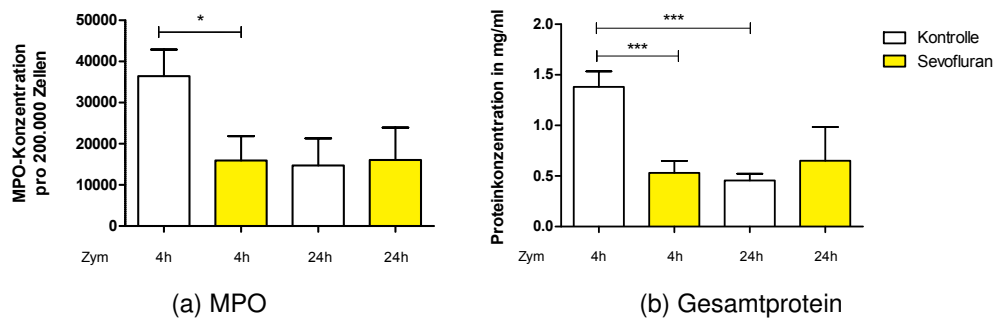


Abbildung 7: **MPO und Gesamtprotein 4 und 24 Stunden nach Zymosan-Gabe** (a) MPO und (b) Gesamtprotein in der Peritoneallavage bei Zymosan-Gabe für 4 h und 24 h ohne (weiße Balken) und mit Sevofluran (gelbe Balken). Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( $n \geq 5$ , \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ , Zym: Zymosan).

(a). Auch die Messung des Gesamtproteins zeigte, dass Sevofluran nach 4 Stunden die mikrovaskuläre Permeabilität positiv beeinflusst. Das Gesamtprotein war durch die Behandlung mit Sevofluran signifikant niedriger im Vergleich zu den Kontrollgruppen mit Zymosan (siehe Abbildung 7 (b)). Nach 24 Stunden waren bei den Kontrolltieren mit Zymosan der Gesamtproteingehalt (b) signifikant niedriger verglichen mit den Kontrolltieren mit Zymosan nach 4 Stunden, ein Zeichen, dass der akute Prozess bereits abgelaufen war. Die Behandlung mit Sevofluran führte zu keinem signifikanten Unterschied.

Nach 24 Stunden zeigte sich die PMN-Migration bereits rückläufig. Daraus ließ sich schließen, dass sich der Prozess der akuten Peritonitis nach 4 Stunden besser widerspiegelte und wurde deswegen in den weiteren Versuchen verwendet.

## 3.2 Veränderung des Migrationsverhaltens neutrophiler Granulozyten bei Wildtyp- und A2b-Knock-out Mäusen durch Sevofluran

Verschiedene Studien deuten an, dass die anti-inflammatorische Wirkung volatiler Anästhetika über den A2b-R vermittelt wird. Einen direkten Zusammenhang zwischen Sevofluran und dem A2b-R konnte bereits bei Ischämie und Reperfusions

(I/R)-Schaden der Leber gezeigt werden [56]. Um festzustellen, ob dieser Zusammenhang auch bei akuter Peritonitis besteht, wurde die Änderung des Migrationsverhaltens der PMNs durch Sevofluran bei Zymosan-induzierter Peritonitis in C57 BL/6 Wildtyp- und A2b <sup>-/-</sup> Mäusen mittels Durchflusszytometrie untersucht.

Auf den inflammatorischen Reiz durch Zymosan reagierten sowohl die Wildtyp- als auch die A2b <sup>-/-</sup> Mäuse mit einer signifikant höheren PMN-Zahl in Peritoneallavage, Blut, Leber und Lunge verglichen mit den Kontrolltieren ohne Zymosan (Abbildung 8). Die Behandlung mit Sevofluran konnte die Migration der PMNs in die verschiedenen Kompartimente der Wildtyptiere signifikant reduzieren. In den A2b <sup>-/-</sup> Mäusen blieb dieser Effekt aus (siehe Abbildung 10).

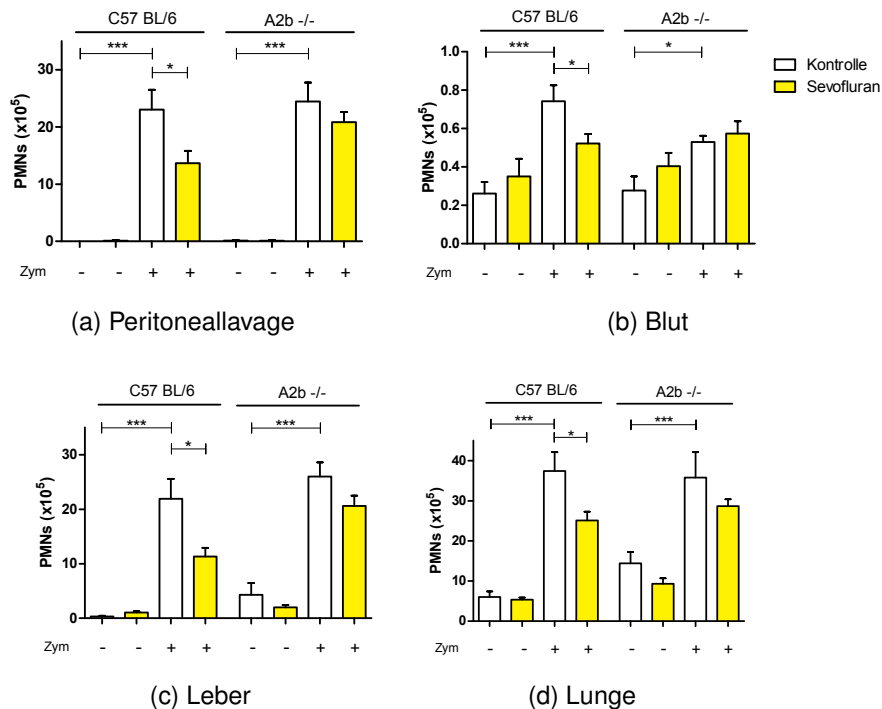


Abbildung 8: **PMN-Migration bei Wildtyp und A2b <sup>-/-</sup> Tieren mit und ohne Sevofluran-Behandlung:** Anzahl migrierter PMNs in (a) Peritoneallavage, (b) Blut, (c) Leber und (d) Lunge in den Kontrolltieren (weiße Balken) ohne und mit Zymosan und in den Gruppen mit zusätzlicher Sevofluran-Inhalation (gelbe Balken) jeweils bei C57 BL/6 Wildtyp- (links) und A2b <sup>-/-</sup> Mäusen (rechts). Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( $n \geq 9$  in Peritoneallavage,  $n \geq 8$  im Blut,  $n \geq 10$  in Leber und Lunge, \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ , Zym: Zymosan).

Auch die Analyse des Myeloperoxidase- und Gesamtproteingehalts in der Peritone-

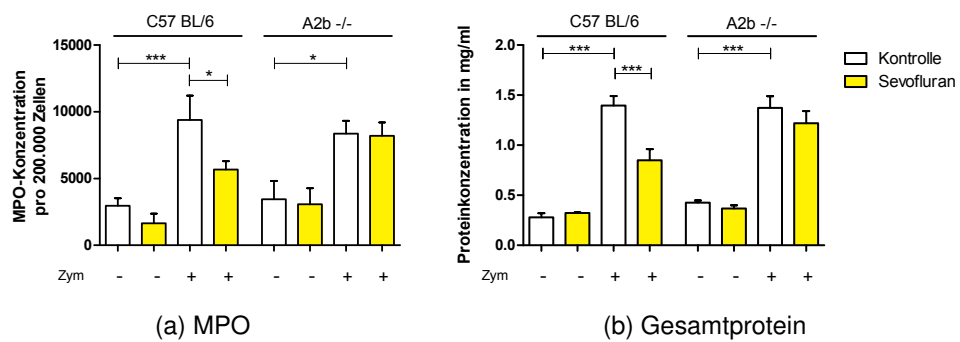


Abbildung 9: **MPO und Gesamtprotein bei Wildtyp und A2b -/- Mäusen:** (a) MPO und (b) Gesamtprotein in der Peritoneallavage ohne und mit Zymosan-Gabe, sowie ohne (weiße Balken) und mit Sevofluran (gelbe Balken) bei C57 BL/6 (links) und A2b -/- Mäusen (rechts). Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (MPO  $n \geq 7$ , Gesamtprotein BCA  $n \geq 6$  in Gruppen ohne Zymosan,  $n \geq 10$  in den restlichen Gruppen, \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ , Zym: Zymosan).

allavage bestätigte dieses Ergebnis. Hier gab es ausschließlich bei den Wildtyp-Tieren ein signifikant niedrigeres Gehalt nach Sevofluran-Behandlung, während die Konzentrationen in A2b -/- Tieren durch Sevofluran auf gleichem Niveau blieben wie die der Kontrolltiere mit Zymosan (siehe Abbildung 9).

Verschiedene Studien der akuten Inflammation weisen dem A2b-R einen anti-inflammatorischen Effekt nach. A2b -/- Mäuse zeigen erhöhte Entzündungszeichen, wie eine erhöhte PMN-Adhäsion und -Migration, die vermehrte Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine und die gesteigerte Expression von Adhäsionsmolekülen [34, 59]. Die vermehrte PMN-Anreicherung im Gewebe von A2b -/- Mäusen war in der vorliegenden Arbeit bei direktem Vergleich der KO-Tiere mit ihren Wildtyp-Counterparts zu sehen (siehe Abbildung 10). Da sich die Hauptfrage der vorliegenden Arbeit mit der Wirkung von Sevofluran auf die PMN-Migration beschäftigt, erfolgte die Untersuchung der Wildtyp-Tiere mit und ohne Sevofluran zu einem gemeinsamen Zeitpunkt und die der A2b -/- Tiere mit und ohne Sevofluran zu einem Späteren. Mögliche Schwankungen zwischen den Versuchstagen hatten auf diese Art keinen Einfluss auf die Hauptfrage, wie Sevofluran das Migrationsverhalten der PMNs jeweils in Wildtyp- und A2b -/- Mäusen verändert, da der entscheidende Vergleich unter exakt den gleichen Bedingungen untersucht wurde. A2b -/- Mäuse verzeichneten eine vermehrte

Anzahl migrierter PMNs ins Gewebe (siehe Abbildung 10).

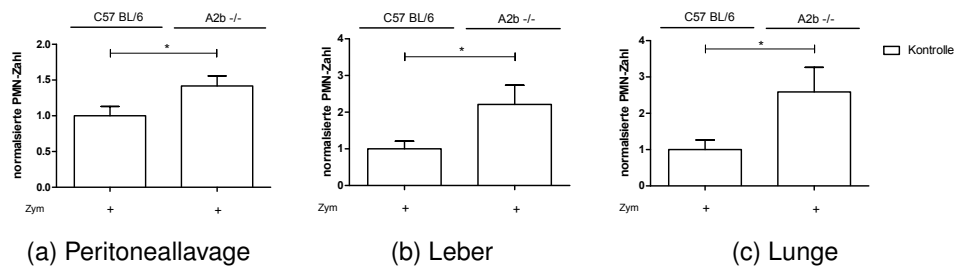


Abbildung 10: **PMN-Migration bei Wildtyp und A2b -/- Tieren im direkten Vergleich:** Anzahl migrierter PMNs in (a) Peritoneallavage, (b) Leber und (c) Lunge in den Kontrolltieren mit Zymosan im direkten Vergleich von C57 BL/6 Wildtyp (links) und A2b -/- Mäusen (rechts). Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( $n \geq 7$ , \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ \*, Zym: Zymosan)

### Migrationsverhalten neutrophiler Granulozyten bei chimären Mäusen

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass die Behandlung mit Sevofluran bei akuter Peritonitis zu einer signifikant niedrigeren Migration von PMNs in die verschiedenen Kompartimente führte. Da sich dieses Ergebnis nur in den Wildtyp-Tieren, allerdings nicht in den A2b -/- Tieren zeigte, kann dem A2b-R eine wichtige Rolle bei diesem Prozess zugesprochen werden. Die Frage, welche Bedeutung die Lokalisation des A2b-R dabei spielte, ob die Expression im Gewebe oder auf den Blutzellen wichtiger war, konnte durch Analyse des Migrationsverhalten von PMNs in chimären Mäusen untersucht werden.

Dafür wurden, wie in Abschnitt 2.2.11 beschrieben, C57 BL/6 Wildtyp-Mäusen Knochenmark von A2b -/- Mäusen injiziert, sodass diese folglich den A2b-R nur noch im Gewebe exprimierten, während A2b -/- Tiere Knochenmark der Wildtyp-Tiere erhielten und damit den A2b-R isoliert auf Blutzellen exprimierten.

Die Anzahl migrierter PMNs in Peritoneallavage, Blut, Leber und Lunge bei akuter Peritonitis und die Behandlung mit Sevofluran zeigte keine signifikanten Unterschiede verglichen zur Kontrollgruppe sowohl bei den Mäusen, welchen den A2b-R ausschließlich im Gewebe, als auch bei denen, welche den A2b-R nur auf Blutzellen exprimierten (siehe Abbildung 11). Zusammen mit den Ergebnissen des Migrations-

verhaltens bei Wildtyp- und A2b <sup>-/-</sup> Tieren konnte daraus geschlossen werden, dass eine Expression des A2b-R sowohl im Gewebe als auch auf Blutzellen für einen Migrations-reduzierenden Effekt von Sevofluran notwendig ist.

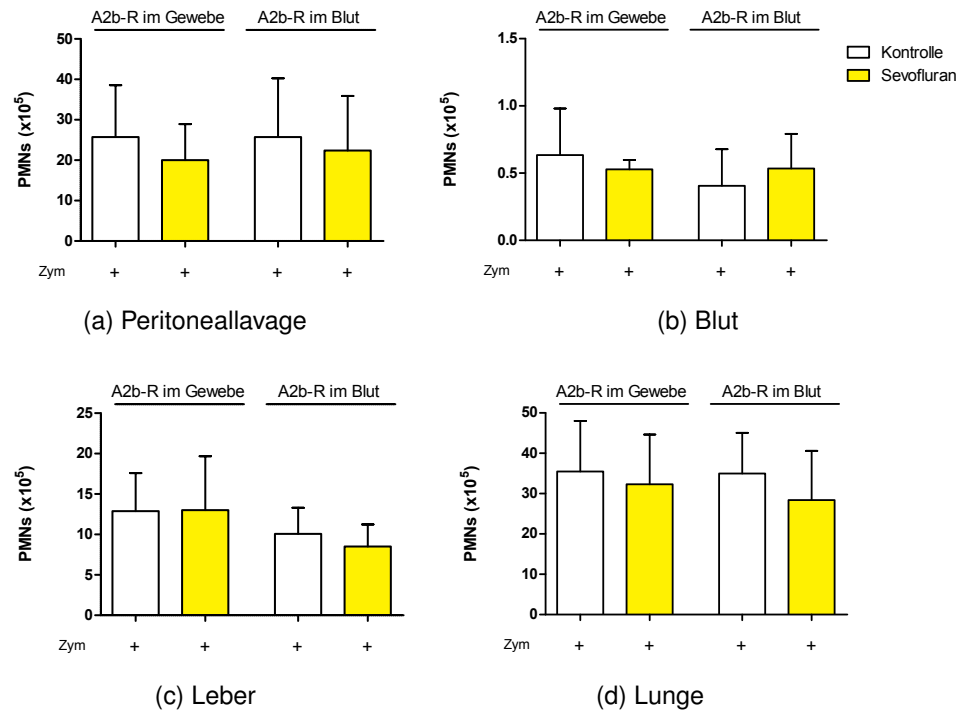


Abbildung 11: **PMN-Migration bei chimären Mäusen:** Anzahl migrierter PMNs in (a) Peritoneallavage, (b) Blut, (c) Leber und (d) Lunge bei akuter Peritonitis und Sevofluran-Behandlung (gelber Balken) verglichen mit der Kontrollgruppe (weiße Balken) jeweils bei Mäusen, die den A2b-R nur im Gewebe (links) und Mäusen, die den A2b-R nur auf Blutzellen exprimieren (rechts). Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( $n \geq 6$ , Zym: Zymosan).

### 3.3 Immunhistochemie

Zur Visualisierung der mittels Durchflusszytometrie erhaltenen Ergebnisse wurden histologische Bilder der Leber, Lunge und des Darmes von C57 BL/6 Wildtyp- und A2b <sup>-/-</sup> Tieren angefertigt und die PMNs immunhistochemisch braun angefärbt.

Die histologischen Bilder der Kontrollgruppen ohne Zymosan zeigten dabei nur vereinzelt PMNs und unterschieden sich in allen Organen nicht zwischen Wildtyp- und A2b <sup>-/-</sup> Tieren. Auch die Inhalation von Sevofluran ohne Zymosan führte zu keiner



vermehrten PMN-Anreicherung im Gewebe im Vergleich zu den Kontrolltieren ohne Zymosan. Die Histologiebilder der Wildtyp-Tiere ohne Zymosan sind jeweils in (a) und (b) in Abbildung 12, Abbildung 13 und Abbildung 14 dargestellt.

Bei akuter Peritonitis zeigte sich in der Lunge (Abbildung 12) der Wildtyp-Tiere zahlreiche PMNs (c), während bei der zusätzlichen Behandlung mit Sevofluran (d) deutlich weniger braun gefärbte PMNs zu sehen waren. Bei den A2b <sup>-/-</sup> Mäusen hingegen waren mit und ohne Inhalation von Sevofluran vergleichbar viele PMNs eingewandert (siehe (e)+(f)).

In der Leber (Abbildung 13) führte die Zymosan-induzierte Peritonitis zu einer vermehrten Anreicherung von PMNs im Gewebe der Wildtyp- (c) und A2b <sup>-/-</sup> Mäusen (e). Nach Sevofluran-Behandlung migrierten weniger PMNs in die Leber der Wildtyp-Tiere (d), nicht aber in die der A2b <sup>-/-</sup> Mäuse (f).

Auch im Darm (Abbildung 14) war die Anzahl migrierter PMNs in Wildtyp-Tieren, welche Sevofluran inhalierten (d), deutlich niedriger als in der Gruppe ohne Inhalation (c), während die Sevofluran-Behandlung bei den A2b <sup>-/-</sup> Tieren zu keiner unterschiedlichen PMN-Anreicherung führte (siehe (e)+(f)).

Die Ergebnisse der Immunhistochemie bestätigen damit die Ergebnisse der Durchflusszytometrie.

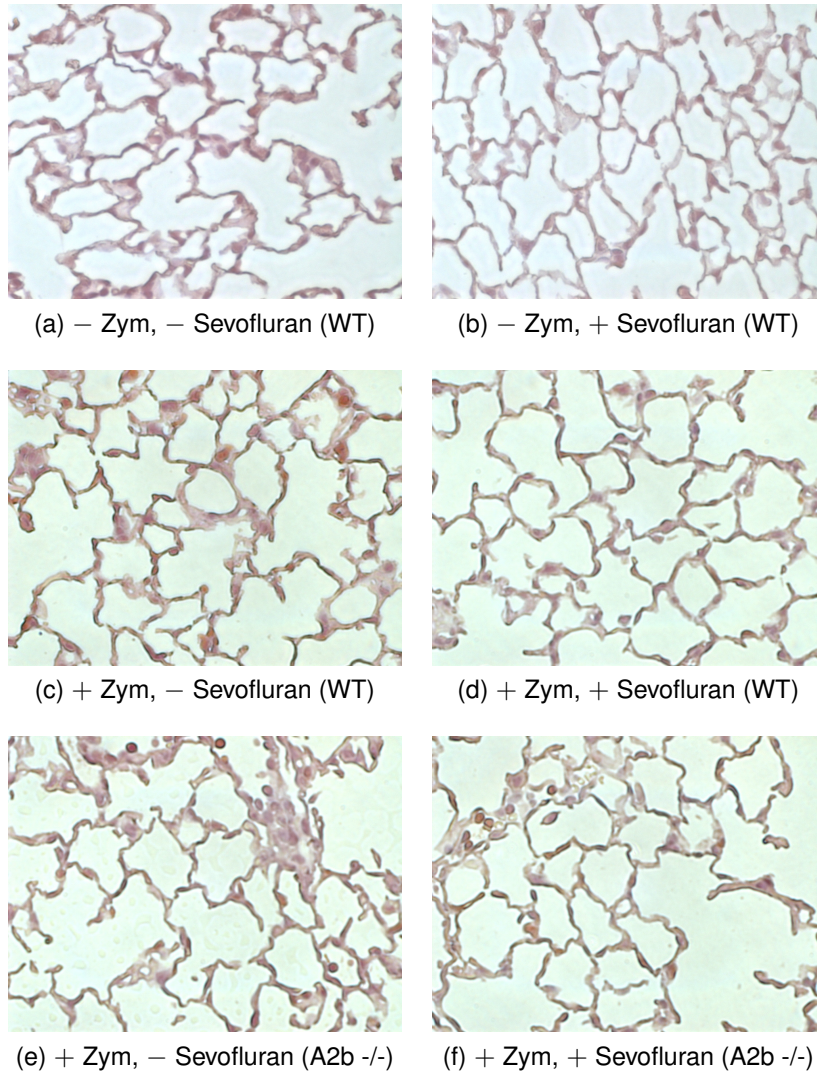


Abbildung 12: **Immunhistochemische Färbung der PMNs in der Lunge:**

Immunhistochemische Braunfärbung von PMNs von C57 BL/6 Wildtyp-Tieren ohne Zymosan (a) ohne und (b) mit Sevofluran-Behandlung und bei Zymosan-induzierter Peritonitis (c) ohne und (d) mit Sevofluran-Behandlung, sowie von A2b <sup>-/-</sup> Tieren bei Zymosan-induzierter Peritonitis (e) ohne und (f) mit Sevofluran-Behandlung in 64facher Vergrößerung ( $n = 2$ , Zym: Zymosan, WT: Wildtyp).

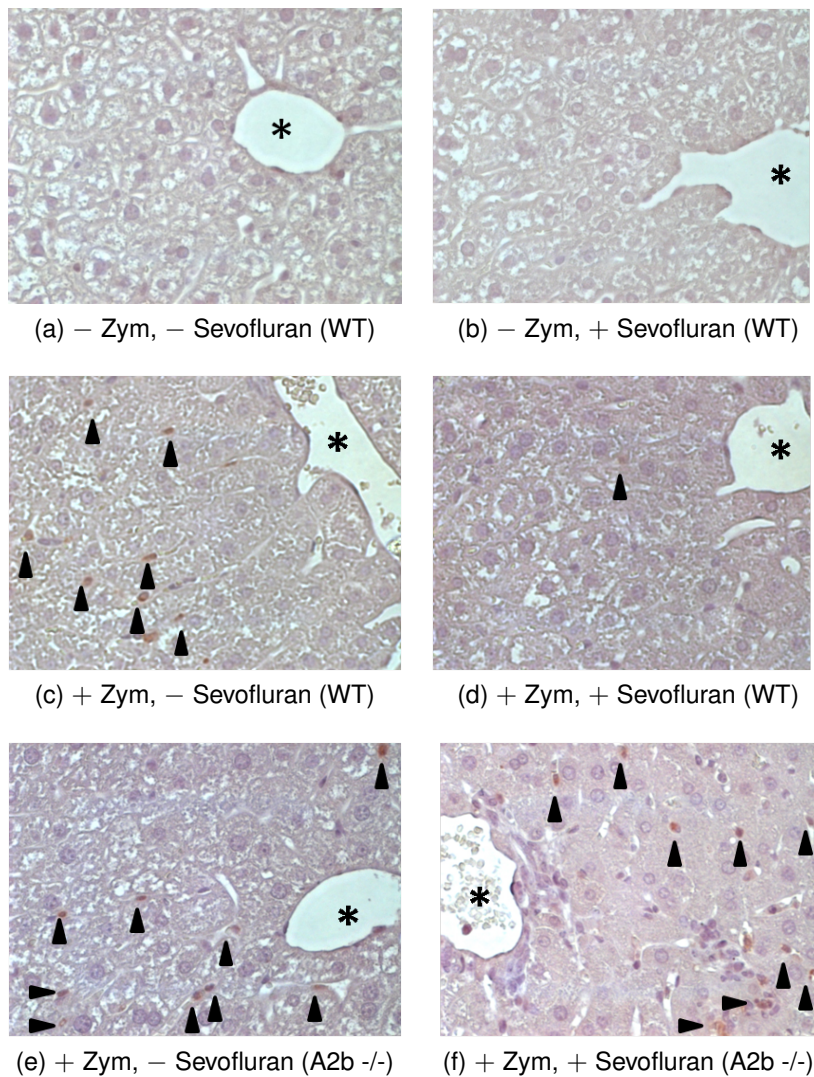


Abbildung 13: **Immunhistochemische Färbung der PMNs in der Leber:**

Immunhistochemische Braunfärbung von PMNs (Pfeil) von C57 BL/6 Wildtyp-Tieren ohne Zymosan (a) ohne und (b) mit Sevofluran-Behandlung und bei Zymosan-Injektion (c) ohne und (d) mit Sevofluran-Behandlung, sowie von A2b <sup>-/-</sup> Tieren bei Zymosan-induzierter Peritonitis (e) ohne und (f) mit Sevofluran-Behandlung in 64facher Vergrößerung ( $n = 2$ , Pfeil: PMNs, \*: Zentralvene, Zym: Zymosan, WT: Wildtyp).

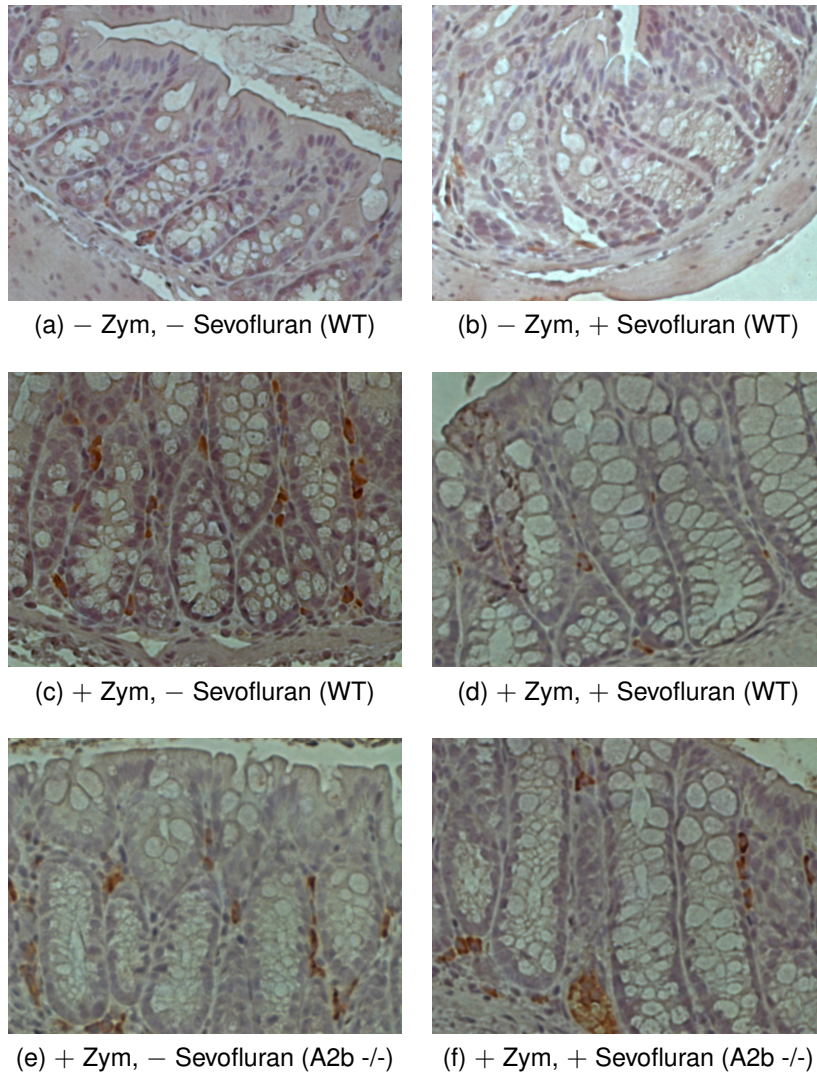


Abbildung 14: **Immunhistochemische Färbung der PMNs im Darm:**

Immunhistochemische Braunfärbung von PMNs in den Darm-Krypten der C57 BL/6 Wildtyp-Tiere ohne Zymosan (a) ohne und (b) mit Sevofluran-Behandlung und bei Zymosan-induzierter Peritonitis (c) ohne und (d) mit Sevofluran-Behandlung, sowie von A2b <sup>-/-</sup> Tieren bei Zymosan-induzierter Peritonitis (e) ohne und (f) mit Sevofluran-Behandlung in 64facher Vergrößerung (*n* = 2, Zym: Zymosan, WT: Wildtyp).

### 3.4 Real time q-PCR

Nachdem ein Zusammenhang zwischen dem anti-inflammatorischen Effekt von Sevofluran und dem Vorhandensein des A2b-R gezeigt werden konnte, wurde evaluiert, ob und wie Sevofluran die Genexpression des A2b-R verändert. In Leber, Lunge und Darm wurde dafür die Transkription der A2b-R messenger Ribonukleinsäure (mRNA) bei Zyosan-induzierter Peritonitis mit und ohne Sevofluran-Inhalation mittels q-PCR in C57 BL/6-Wildtyp-Tieren untersucht.

Die Behandlung mit Sevofluran bei akuter Peritonitis führte dabei zu einem signifikant höheren Transkriptionslevel des A2b-R in Leber, Lunge und Darm verglichen mit den Kontrolltieren mit Zyosan (siehe Abbildung 15).

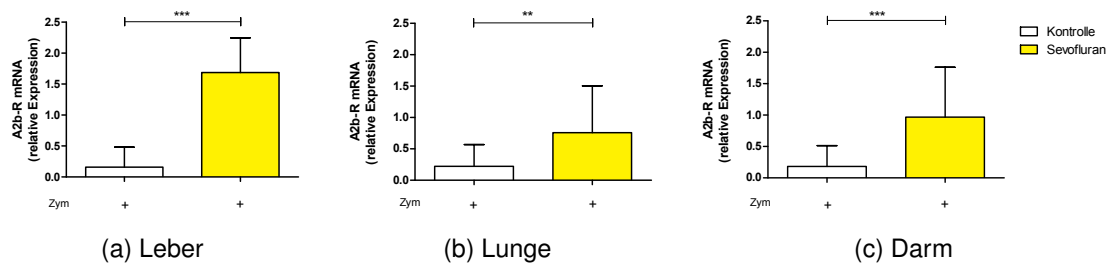


Abbildung 15: **Transkription des A2b-R:** Transkription des A2b-R bei akuter Peritonitis ohne (weiße Balken) und mit Sevofluran-Behandlung (gelbe Balken) in (a) Leber, (b) Lunge und (c) Darm von C57 BL/6 Mäusen. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( $n \geq 8$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , Zym: Zyosan)

### 3.5 Proteinexpression des A2b-Rezeptors

Auf Proteinebene wurde die Expression des A2b-R via Western Blot bei Zyosan-induzierter Peritonitis mit und ohne Sevofluran-Behandlung in C57 BL/6-Wildtyp-Tieren quantifiziert.

Im Western Blot stellten sich die Banden der mit Sevofluran behandelten Mäuse signifikant breiter dar als die der Kontrolltiere mit Zyosan (siehe Abbildung 16). Dies entspricht einer erhöhten Proteinmenge des A2b-R nach der Inhalation von Sevofluran.

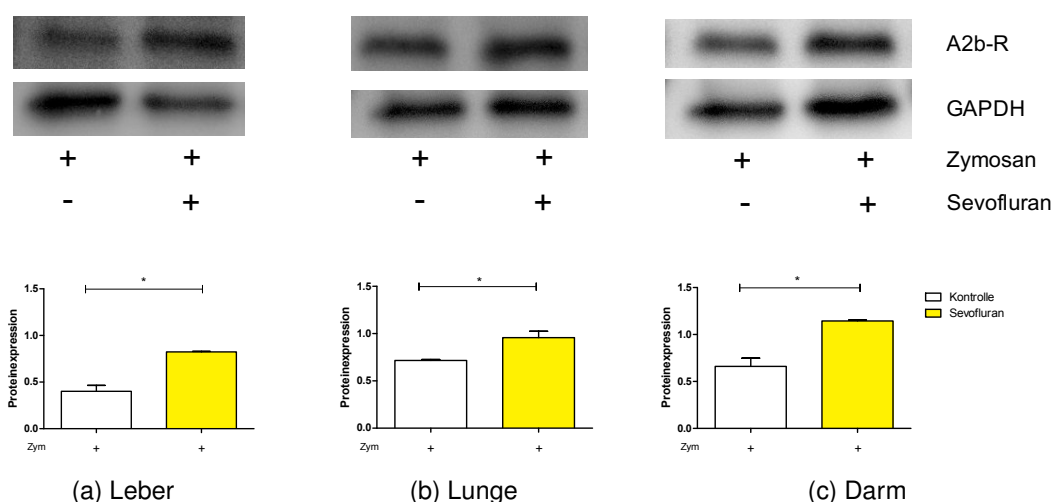


Abbildung 16: **Proteinexpression des A2b-R in C57 BL/6 Wildtyp-Tieren:** Repräsentativer Western Blot in (a) Leber, (b) Lunge und (c) Darm bei Zymosan-induzierter Peritonitis mit und ohne Sevofluran-Behandlung. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( $n = 2$ ,  $*p < 0,05$ , Zym: Zymosan).

### 3.6 Einfluss von Sevofluran auf die Zytokinkonzentration

In der Peritoneallavage wurden die Konzentrationen der murinen Chemokine CXCL1 und CXCL2/3, welche dem humanen IL-8 entsprechen, und der Zytokine IL-6 und TNF- $\alpha$  in C57 BL/6-Wildtyp- und A2b  $-/-$  Tieren mittels ELISA gemessen.

Sowohl bei den Wildtyp- als auch bei den A2b  $-/-$  Tieren führte die Induktion einer Zymosan-induzierten Peritonitis zu einem signifikanten Anstieg der Konzentrationen aller gemessenen Chemokine und Zytokine im Vergleich zu den Kontrolltieren ohne Zymosan (siehe Abbildung 17). Die Behandlung mit Sevofluran ohne Induktion einer Peritonitis führte zu keinem signifikantem Unterschied.

Übereinstimmend mit den Ergebnissen der PMN-Migration zeigten sich bei den Wildtyp-Tieren durch Sevofluran-Behandlung bei akuter Peritonitis signifikant niedrigere Werte von CXCL1, CXCL2/3, IL-6 und TNF- $\alpha$  als ohne Sevofluran, während bei den A2b  $-/-$  Tieren keine signifikante Änderung der Konzentrationen zu erkennen war. Beim Vergleich zwischen Wildtyp- und A2b  $-/-$  Tieren in der Kontrollgruppe mit Zymosan waren die Konzentration von CXCL2/3 (b) signifikant höher bei den A2b  $-/-$  Tieren.

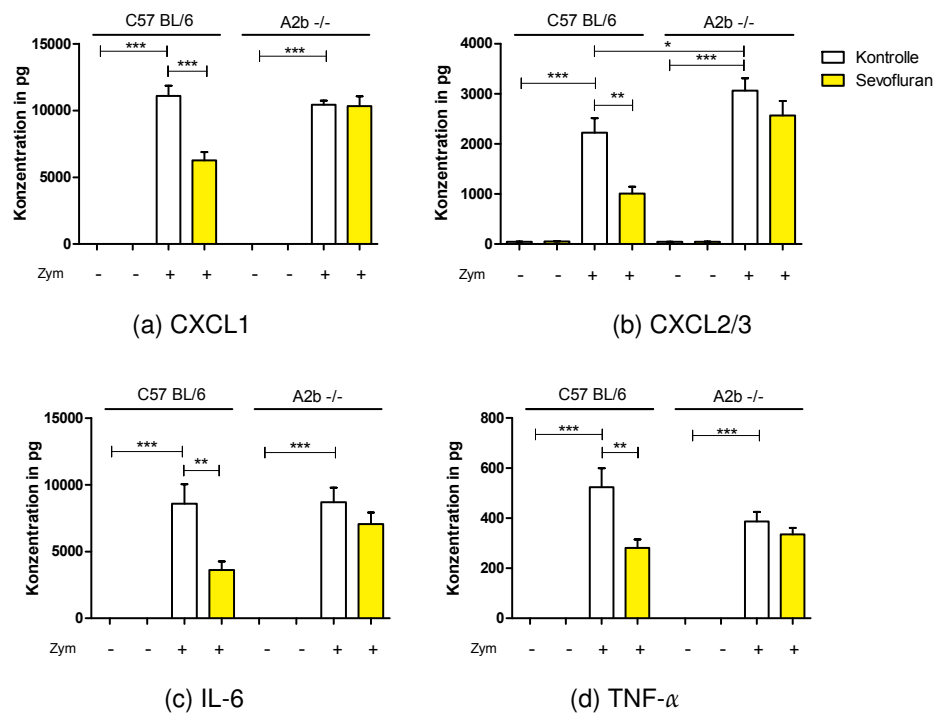


Abbildung 17: **Zytokin- und Chemokinkonzentrationen in der Peritoneallavage:** Konzentrationen der Chemokine (a) CXCL1 und (b) CXCL2/3, sowie der Zytokine (c) IL-6 und (d) TNF- $\alpha$  in den Kontrollgruppen ohne und mit Zymosan (weiße Balken), sowie bei zusätzlicher Behandlung mit Sevofluran (gelbe Balken) jeweils in der Peritoneallavage bei C57 BL/6 Wildtyp- (links) und A2b -/- Mäusen (rechts). Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( $n = 4$  in Gruppen ohne Zymosan,  $n \geq 8$  in Gruppen mit Zymosan, \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , Zym: Zymosan).

### 3.7 Änderung der Expression von Adhäsionsmolekülen durch Sevofluran

Adhäsionsmoleküle spielen eine entscheidende Rolle bei der Migration von PMNs zum Ort des Entzündungsgeschehens. Um zu evaluieren, welchen Einfluss Sevofluran auf diesen Schritt der Inflammation nimmt, wurden einige relevante Adhäsionsmoleküle untersucht. Einen Überblick über die ausgewählten Adhäsionsmoleküle und deren Funktion bei der Migration gibt Tabelle 9.

Die Expression der Adhäsionsmoleküle auf den PMNs wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie bei Zymosan-induzierter Peritonitis mit und ohne Sevofluran-Behandlung in Peritoneallavage, Blut, Leber und Lunge in C57 BL/6 Wildtyp- und A2b -/- Tieren gemessen.

Tabelle 9: Untersuchte Adhäsionsmoleküle (AM)

AM	alternativer Name	Funktion bei der Migration
CD162	PSGL-1	erstes Anheften und Rollen durch Bindung an P-Selektin
CD44	-	erstes Anheften, Rollen
CD11a	$\beta$ -Integrin; bildet mit CD18 LFA-1	feste Adhäsion, Crawling, Diapedese
CD11b	$\beta$ -Integrin; bildet mit CD18 Mac-1	feste Adhäsion, Crawling, Diapedese
CD31	PECAM-1	Diapedese und Transmigration
CD54	ICAM-1	Ligand von LFA-1 und Mac-1, ermöglicht PMN-PMN Adhäsion und Aggregation

Bei akuter Peritonitis zeigte sich auf den PMNs in der Peritoneallavage (Abbildung 18) bei den mit Sevofluran behandelten Wildtyp-Mäusen die Expression von CD162 (a), CD44 (b), CD31 (c) und CD54 (d) signifikant niedriger als bei den Kontrolltieren mit Zymosan. Die Expression von CD11a und CD11b wurde durch die Sevofluran-Behandlung nicht verändert (aus Übersichtsgründen nicht dargestellt).

Im Blut (Abbildung 19) der Wildtyp-Tiere führte die Behandlung mit Sevofluran bei Zymosan-induzierter Peritonitis zu einer signifikant niedrigeren Expression der Adhäsions-



onsmoleküle CD44 (a) und CD31 (b) auf den PMNs. Die Adhäsionsmoleküle CD162, CD11a, CD11b und CD54 auf PMNs im Blut unterschieden sich nicht signifikant in ihrer Expression durch Sevofluran (zur besseren Übersicht nicht dargestellt).

Auf PMNs, welche im Prozess der akuten Peritonitis in die Leber der Wildtypiere migrierten, führte die Behandlung mit Sevofluran zu einer signifikant niedrigeren Expression der Adhäsionsmoleküle CD162 (a), CD44 (b), CD11a (c), CD11b (d), CD31 (e) und CD54 (f) im Vergleich zur Kontrollgruppe (siehe Abbildung 20).

Bei akuter Peritonitis zeigten PMNs der C57 BL/6 Wildtyp-Tiere, welche unter der Behandlung von Sevofluran in die Lunge migrierten (Abbildung 21), eine signifikant niedrigere Expression der  $\beta_2$ -Integrine CD11a (a) und CD11b (b) im Gegensatz zur Kontrollgruppe mit Zymosan. Die restlichen Adhäsionsmoleküle auf PMNs in der Lunge zeigten keine veränderte Expression durch Sevofluran.

Die Ergebnisse zeigen, dass Sevofluran die Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle auf PMNs in den unterschiedlichen Organen reduziert. Zur Evaluation der Rolle des A2b-R hierbei, wurde die Expression dieser Adhäsionsmoleküle auch in A2b  $-/-$  Mäusen untersucht. Die Expression von CD162, CD44, CD11a, CD11b, CD31 und CD54 auf PMNs änderte sich in den Organen der A2b  $-/-$  Tiere nicht durch die Behandlung mit Sevofluran bei akuter Peritonitis. Folglich kann man davon ausgehen, dass der A2b-R an der reduzierten Expression beteiligt ist.

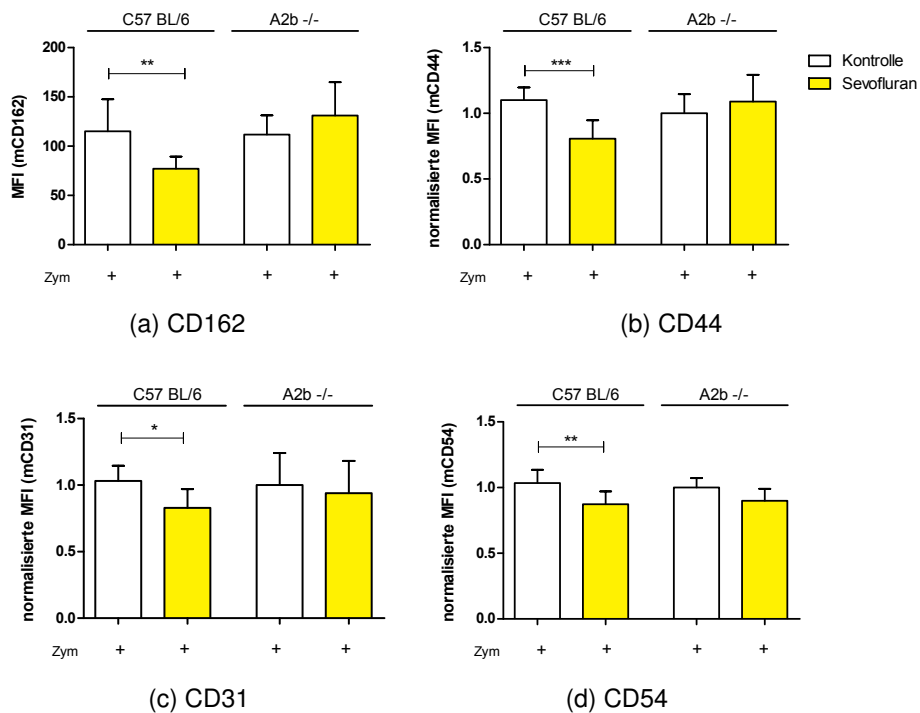


Abbildung 18: **Expression der Adhäsionsmoleküle in der Peritoneallavage:** MFI der Adhäsionsmoleküle (a) CD162, (b) CD44, (c) CD31 und (d) CD54 auf den PMNs in der Peritoneallavage bei akuter Peritonitis ohne (weiße Balken) und mit Sevofluran (gelbe Balken) bei C57 BL/6 Wildtyp-Tieren (links) und A2b -/- Tieren (rechts). Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( $n \geq 7$ , \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$ , Zym: Zymosan, MFI: mittlere Fluoreszenzintensität)

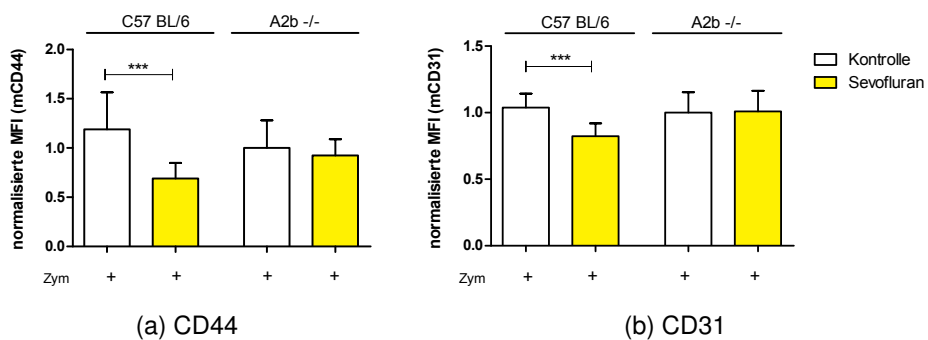


Abbildung 19: **Expression der Adhäsionsmoleküle im Blut:** MFI der Adhäsionsmoleküle (a) CD44 und (b) CD31 auf den PMNs bei akuter Peritonitis ohne (weiße Balken) und mit Sevofluran (gelbe Balken) bei C57 BL/6 Wildtyp-Tieren (links) und A2b -/- Tieren (rechts). Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( $n \geq 8$ , \*\*\* $p < 0,001$ , Zym: Zymosan, MFI: mittlere Fluoreszenzintensität).

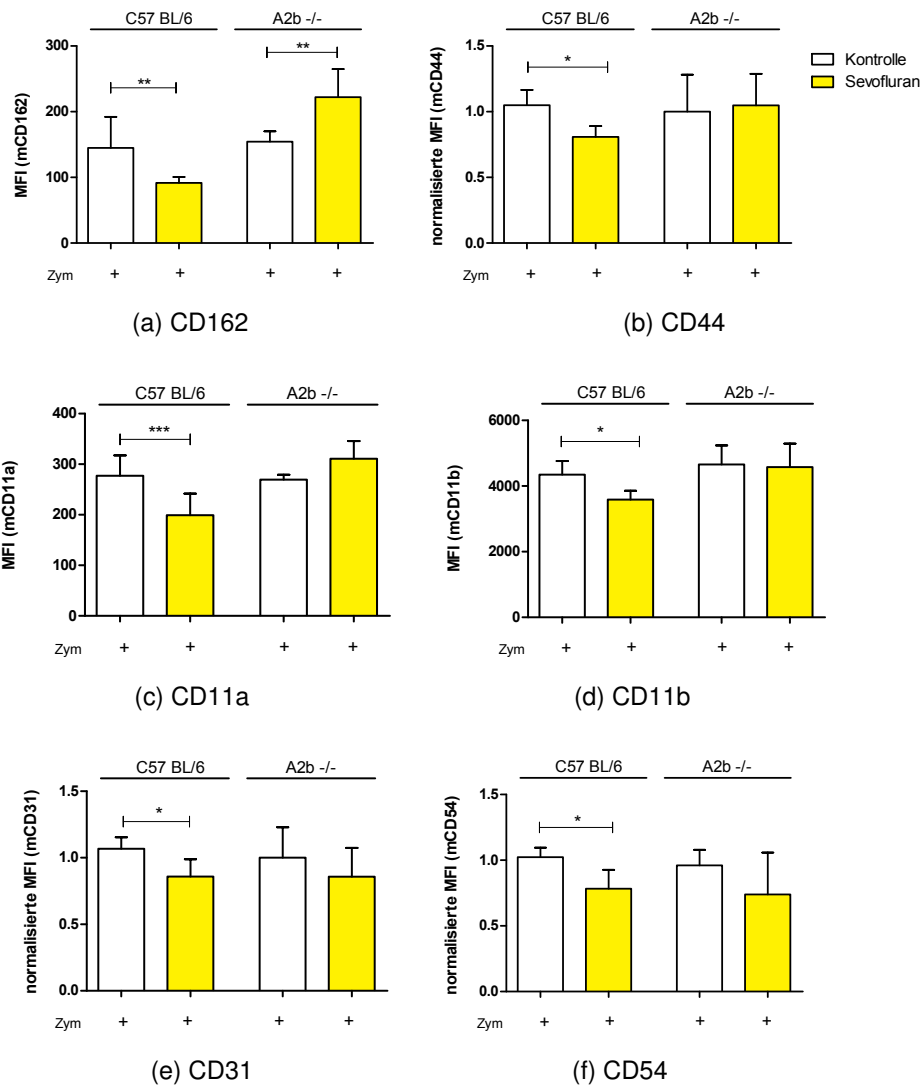


Abbildung 20: **Expression der Adhäsionsmoleküle in der Leber:** MFI der Adhäsionsmoleküle (a) CD162, (b) CD44, (c) CD11a, (d) CD11b, (e) CD31 und (f) CD54 auf den PMNs in der Peritoneallavage bei akuter Peritonitis ohne (weiße Balken) und mit Sevofluran (gelbe Balken) bei C57 BL/6 Wildtyp-Tieren (links) und A2b -/- Tieren (rechts). Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( $n \geq 7$ , \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$ , Zym: Zymosan, MFI: mittlere Fluoreszenzintensität).

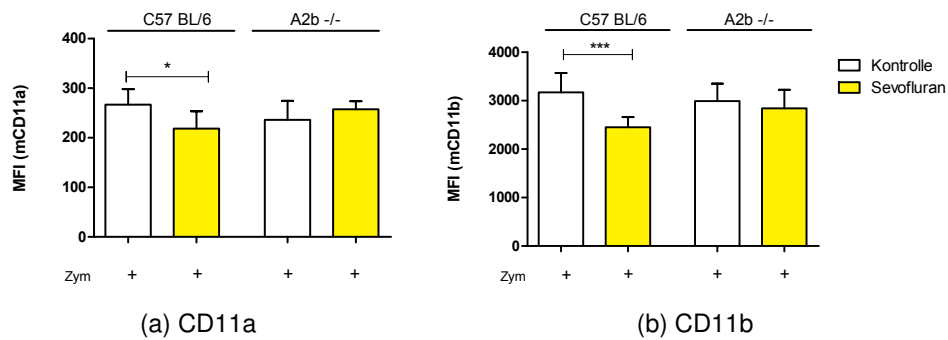


Abbildung 21: **Expression der Adhäsionsmoleküle in der Lunge:** MFI der Adhäsionsmoleküle (a) CD11a und (b) CD11b auf den PMNs bei Zymosan-induzierter Peritonitis ohne (weiße Balken) und mit Sevofluran (gelbe Balken) bei C57 BL/6 Wildtyp-Tieren (links) und A2b <sup>-/-</sup> Tieren (rechts). Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( $n \geq 7$ , \* $p < 0,5$  \*\*\* $p < 0,001$ , Zym: Zymosan, MFI: mittlere Fluoreszenzintensität).

### 3.8 Migrationsverhalten neutrophiler Granulozyten bei Fäzes-induzierter Peritonitis

Bei der Zymosan-induzierten Peritonitis handelt es sich um die Induktion einer sterilen Inflammation. Die FIP ist hingegen eine Reaktion auf eine Infektion durch i.p.-injizierten Kot und simuliert die Situation einer bakteriellen Peritonitis, z.B. nach Hohlorganperforation, wie sie in der Klinik häufig vorliegt. Nach Induktion der FIP bei C57 BL/6 Wildtyp-Tieren wurde das Migrationsverhalten der PMNs unter Sevofluran mittels Durchflusszytometrie in Peritoneallavage, Leber und Lunge untersucht.

Die Anzahl migrierter PMNs in Lavage (a), Leber (b) und Lunge (c) der zusätzlich mit Sevofluran behandelten Tiere war signifikant niedriger im Vergleich zu den Kontrolltieren mit FIP (siehe Abbildung 22). Dass die Fäzes-induzierte Peritonitis eine stärkere Entzündungsreaktion auslöste, veranschaulichte sich bei der Messung des Myeloperoxidase- und Gesamtproteingehalts im Vergleich zu den Mäusen mit Zymosan-induzierter Peritonitis. Die Konzentrationen zeigten in den FIP-behandelten Tieren bis zu doppelt so hohe Werte. Die Behandlung mit Sevofluran konnte auch bei der FIP die Konzentrationen von MPO und Gesamtprotein signifikant reduzieren verglichen mit den Kontrolltieren (siehe Abbildung 23).

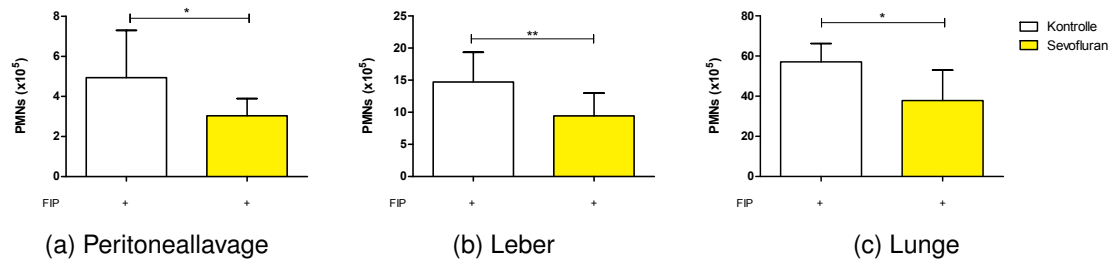


Abbildung 22: **PMN-Migration bei FIP**: Anzahl migrierter PMNs in (a) Peritoneallavage, (b) Leber und (c) Lunge 4 h nach FIP und Sevofluran-Behandlung (gelbe Balken) verglichen mit der Kontrollgruppe mit FIP (weiße Balken) jeweils bei C57 BL/6 Wildtyp Mäusen. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( $n \geq 6$ , \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , FIP: Fäzes-induzierte Peritonitis).

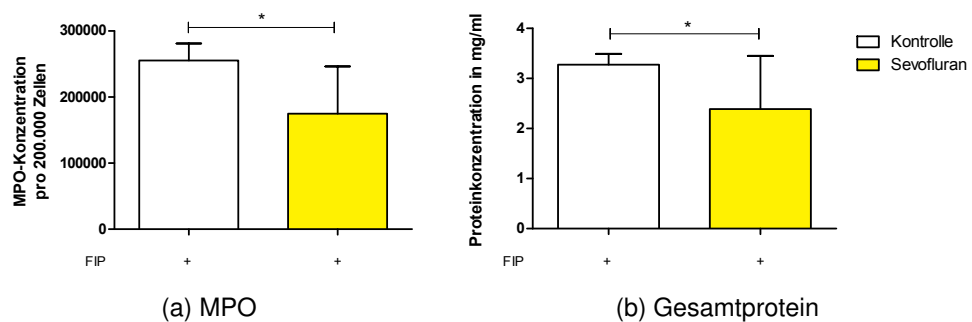


Abbildung 23: **MPO und Gesamtprotein bei FIP**: (a) MPO und (b) Gesamtprotein in der Peritoneallavage bei FIP ohne (weiße Balken) und mit Sevofluran (gelbe Balken) in C57 BL/6 Wildtyp-Mäusen. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( $n \geq 8$ , \* $p < 0,05$ , FIP: Fäzes-induzierte Peritonitis).

## 4 Diskussion

Die Sepsis ist eine lebensbedrohliche Organdysfunktion aufgrund einer dysregulierten Immunantwort des Körpers auf eine Infektion [5]. Sie ist trotz intensivmedizinischer Therapie mit einer Mortalität von 25 % vergesellschaftet [10]. Die Verbesserung der therapeutischen Möglichkeiten ist daher von großem klinischen und wissenschaftlichen Interesse. Volatile Anästhetika könnten hierbei einen möglichen Ansatzpunkt darstellen [60].

Aufgrund des fortschreitenden Organversagens bei der Sepsis ist in der Regel eine Anästhesie notwendig. Diese erfolgt entweder im Rahmen der chirurgischen Fokussierung oder bei intensivmedizinischer Betreuung beatmeter Patienten. Da die früher häufig genutzten Benzodiazepine vermehrt unerwünschte Nebenwirkungen aufwiesen, wird heute die Sedierung auf der Intensivstation in den meisten Fällen mit Propofol aufrecht erhalten [61]. Bei Propofol handelt es sich um ein intravenös (i.v.)-appliziertes Anästhetikum. Eine kürzlich veröffentlichte Studie demonstrierte eine Überlegenheit in der Beeinflussung der Inflammation bei der Sedierung mit volatilen Anästhetika im Vergleich zu Propofol [62]. Die Behandlung mit Sevofluran, Isofluran oder Desfluran konnte bei dem Sepsis-Modell Cecal Puncture and Ligation (CLP) in Ratten die Überlebensrate verbessern und die systemische Inflammation reduzieren. Ein positiver Effekt volatiler Anästhetika auf die Ausprägung der systemischen Inflammation und die Schwere der Organschäden konnte bereits mehrfach sowohl in Tieren [52, 63–65] als auch im Menschen [43, 44, 66, 67] nachgewiesen werden.

Die vorliegende Arbeit konnte den positiven Effekt von Sevofluran bei der Sepsis bestätigen. Wesentliche Merkmale einer Entzündungsreaktion werden durch das volatile Anästhetikum reduziert. Darüber hinaus konnte zu neuen Erkenntnissen der Wirkweise von Sevofluran beigetragen werden.

In dieser Arbeit wurden wesentliche pathophysiologische Merkmale der Peritonitis-induzierten Sepsis untersucht. Die überschießende Migration und Aktivierung der PMNs außerhalb des Infektfokus gilt als mitverantwortlich für die Organschäden bei Sepsis [22, 25]. Farmer et. al konnten zeigen, dass eine Hemmung der PMN-Migration in weniger Gewebeschäden und einer besseren Überlebensrate resultierte [68]. Eine komplette Elimination der PMNs wiederum führt zum Tode [24]. Eine Reduzierung, nicht aber eine komplette Depletion der PMNs ist deswegen wünschenswert. Eine Erhöhung der mikrovaskulären Permeabilität, eine vermehrte Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und Chemokine, sowie eine gesteigerte Expression migrationsrelevanter Adhäsionsmoleküle stellen weitere pathophysiologische Merkmale der Peritonitis-induzierten Sepsis dar [7]. Sie können für eine vermehrte PMN-Migration ursächlich sein. Die vorliegende Arbeit untersuchte, welchen Einfluss Sevofluran auf diese Merkmale nehmen kann.

Bedirli et al. demonstrierten bereits, dass Sevofluran die PMN-Migration bei Peritonitis-induzierter Sepsis beeinflussen kann. Die Arbeitsgruppe untersuchte den Einfluss der Präkonditionierung mit Sevofluran auf die Entzündungsreaktion der Lunge mit dem Sepsis-Modell CLP [69]. Dabei fiel auf, dass sich zum einen das histologische Bild des Lungenschadens unter Sevofluran deutlich verbesserte. Zum anderen zeigte sich eine reduzierte Myeloperoxidase (MPO)-Aktivität in der Lunge. Die vorliegende Arbeit konnte bestätigen, dass die durch Sevofluran erreichte Besserung des Lungenschadens auch bei der Inhalation nach Induktion der Sepsis zu sehen ist. Darüber hinaus konnte eine reduzierte PMN-Migration in Lunge, Leber und Peritonealhöhle mittels Durchflusszytometrie quantifiziert werden. Die immunhistochemische Darstellung von Leber, Lunge und Darm ergab eine weitere qualitative Bestätigung, dass die Behandlung mit Sevofluran die PMN-Migration bei Sepsis reduziert. Auch die Messung eines reduzierten Myeloperoxidase-Gehalts in der Peritoneallavage nach Sevofluran-Behandlung unterstützt dieses Ergebnis. Bei der Myeloperoxidase handelt es sich um ein Enzym, welches von PMNs ausgeschüttet wird um pathogene Keime zu bekämpfen und damit deren Aktivität widerspiegelt [58].

Um die Wirkweise von Sevofluran besser zu verstehen erfolgte die Untersuchung der PMN-Migration auch in A2b -/- Mäusen. Der A2b-R ist ein niedrig-affiner Adenosinrezeptor. Er wird in erster Linie unter pathophysiologischen Bedingungen aktiviert und ist an inflammatorischen Prozessen beteiligt [31]. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass ein Fehlen des A2b-R während einer Inflammation zu einer vermehrten Anreicherung von PMNs im Gewebe führt [34, 59]. Auch die Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen ist erhöht [34]. Die Induktion des A2b-R mittels eines Agonisten kann diese Entzündungszeichen lindern [59]. Des Weiteren kann die Stimulation des A2b-R durch Adenosin oder einen spezifischen A2b-R Agonisten die transendotheliale Migration reduzieren [70].

Ein Zusammenhang zwischen volatilen Anästhetika und Adenosin mit seinem A2b-R ergibt sich aus Untersuchungen zur ischämischen Prä- und Postkonditionierung. Durch kurzzeitige Phasen von Ischämie und anschließender Reperfusion vor einer längeren Ischämie-Phase wird eine Sensibilisierung des Gewebes erreicht [51, 52]. Dies schützt in ähnlicher Weise vor ischämischen Schäden, wie es durch volatile Anästhetika zu sehen ist. Das Signalmolekül Adenosin und der Signalweg über den A2b-R konnten hier für die Barriereprotektion bei Bedingungen mit reduzierter Sauerstoffverfügbarkeit wie z.B. Inflammation und Hypoxie verantwortlich gemacht werden [53, 54]. Eine kürzlich veröffentlichte Studie konnte diesen Mechanismus auch bei Inhalation eines volatilen Anästhetikums nachweisen [56]. Sie untersuchte die protektive Wirkung von Sevofluran bei Ischämie und Reperfusions (I/R)-Schaden der Leber. Der A2b-R war entscheidend an der Organprotektion beteiligt.

Da Sevofluran die Einwanderung von PMNs im Rahmen der Sepsis in Peritonealhöhle, Leber und Lunge, sowie deren Anzahl im Blut reduzieren konnte, stellt sich die Frage, welche Rolle der A2b-R hierbei spielt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit demonstrieren, dass der reduzierende Effekt von Sevofluran auf die PMN-Migration bei der Peritonitis-induzierten Sepsis über den A2b-R vermittelt wird. In A2b -/- Mäusen führt die Behandlung mit Sevofluran zu keinem Unterschied in der Anzahl migrierter PMNs.



Die Steigerung der mikrovaskulären Permeabilität stellt einen wichtigen Pathomechanismus für Organschäden bei Sepsis dar [6]. Die Aktivierung von Endothelzellen durch pro-inflammatorische Mediatoren führt zur Lockerung ihrer zellulären Verbindungen, den sogenannten Tight junctions [71]. Diese Auflockerung des Kapillarendothels erhöht die Gefäßpermeabilität. Dies erlaubt zum einen die vermehrte Extravasation von PMNs, zum anderen erfolgt darüber ein erhöhter Proteinverlust [8]. Die daraus resultierenden generalisierten Ödeme schädigen die Organe und führen zu einer systemischen Hypovolämie [72]. Auch in dieser Arbeit konnte bei der Zymosan-induzierten Sepsis ein vermehrter Proteinverlust in die Peritonealhöhle beobachtet werden. Die Inhalation von Sevofluran konnte die mikrovaskuläre Permeabilität reduzieren und so einen übermäßigen Proteinverlust verhindern. Ein protektiver Effekt von Sevofluran auf die mikrovaskuläre Permeabilität wurde bereits mehrfach beschrieben. Zum einen zeigte sich dies bei der Sevofluran-Behandlung von pulmonalen Endothelzellen, welche anschließend mit LPS stimuliert wurden [73]. Zum anderen auch durch die Inhalation von Sevofluran bei Leber-I/R-Schaden in Ratten [74].

Eckle et al. konnten bei der Untersuchung der verschiedenen Adenosinrezeptoren dem A2b-R eine protektive Wirkung auf die endotheliale Barriere nachweisen [39]. Bei A2b -/- Mäusen wurde die endotheliale Barriere unter hypoxischen Bedingungen stärker geschädigt. In Knock-out-Mäusen der restlichen Adenosinrezeptoren hingegen zeigte sich kein Unterschied im Vergleich zu den Wildtypen. Des Weiteren schädigte die Gabe des A2b-R Antagonisten PSB1115 die endotheliale Barriere und steigerte so die vaskuläre Permeabilität. Die Gabe des A2b-R Agonist BAY 60-6583 wiederum stabilisierte diese deutlich [39].

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass der stabilisierende Effekt von Sevofluran auf die mikrovaskuläre Permeabilität über den A2b-R vermittelt wird. Sevofluran konnte den Sepsis-bedingten Proteinverlust in A2b -/- Mäusen nicht reduzieren.

Die bisherigen Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen, dass der A2b-R eine wichtige Rolle bei der protektiven Wirkung von Sevofluran spielt. Die hierauf aufbauende Fragestellung, ob die isolierte Expression des A2b-R auf hämatopoetischen oder

auf endothelialen Zellen für seinen anti-inflammatorischen Effekt verantwortlich ist, konnte durch die Untersuchung der PMN-Migration in chimären Mäusen analysiert werden.

Sevofluran konnte die PMN-Migration in chimären Mäusen nicht beeinflussen, weder in Wildtyp Mäusen, welche nach der Knochenmarktransplantation den A2b-R nur im Gewebe exprimierten, noch in A2b <sup>-/-</sup> Mäusen, welche durch die Transplantation den A2b-R auf Blutzellen exprimierten. Somit scheint ein Zusammenspiel aus hämatopoetischer und nicht-hämatopoetischer Expression des A2b-R in dem Modell der Zymosan-induzierten Peritonitis für den A2b-R-vermittelten protektiven Effekt von Sevofluran verantwortlich zu sein.

Die Ergebnisse verschiedener Studien zeigen, dass zur Beantwortung der Frage, ob der protektive Effekt des A2b-R durch seine hämatopoetische oder seine endotheliale Expression vermittelt wird, die Art der Inflammation, aber auch das untersuchte Organ entscheidend sind. In einem Sepsis-Modell mit i.p.-Injektion von LPS konnte der Signalweg über den A2b-R auf Blutzellen vor einer vermehrten Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine und einer gesteigerten Expression von Adhäsionsmolekülen schützen [34]. Die Injektion von LPS stimuliert eine Immunantwort auf einen infektiösen Reiz, wie er von gram-negativen Bakterien ausgelöst wird. Im Gegensatz dazu konnte mit dem Sepsis-Modell CLP dem A2b-R auf Gewebezellen eine protektive Rolle zugeschrieben werden [37]. Das CLP-Modell löst eine polymikrobielle Infektion aus, welche neben gram-negativen auch gram-positive Bakterien enthält und ein breites Spektrum an Aerobier und Anaerobier abdeckt [75]. Das Fehlen des A2b-R auf den Gewebezellen war hier für die gestiegenen Entzündungszeichen in septischen A2b <sup>-/-</sup> Mäusen verantwortlich. Eckle et al. wiederum wiesen dem A2b-R auf Gewebezellen, zum Teil aber auch dem auf Blutzellen exprimierten A2b-R einen protektiven Effekt auf die mikrovaskuläre Permeabilität in einem Modell mit hypoxisch bedingtem Gefäßschaden nach [39]. Der A2b-R auf Gewebezellen schützte vor vaskulären Schäden in Lunge und Nieren. Dahingegen konnte die mikrovaskuläre Permeabilität des Colons mit Hilfe des Signalwegs über den A2b-R auf hämatopoetischen Zellen stabilisiert werden. Dies verdeutlicht die Komplexität einer Entzündungsreaktion und welche wichtige Rolle der A2b-R dabei spielt.

Um zu evaluieren, welchen Einfluss Sevofluran auf den A2b-R nimmt, erfolgte die Analyse seiner Gen- und Proteinexpression. Diese zeigte, dass Sevofluran sowohl die mRNA als auch die Proteinmenge des A2b-R in Leber, Lunge und Darm steigert. Diese Organe waren im Rahmen der Sepsis von einer vermehrten PMN-Migration betroffen. Gleichwertige Ergebnisse erzielten Granja et al. bei der Untersuchung des Einflusses von Sevofluran auf den A2b-R bei Leber-I/R-Schaden [56]. In der geschädigten Leber kam es zu einem signifikanten Anstieg der Gen- und Proteinexpression des A2b-R. Auch die ischämische Präkonditionierung, welche in ähnlichen Mechanismen wirkt wie volatile Anästhetika, führte zu einer gesteigerten mRNA- und Proteinmenge des A2b-R [55].

Hypoxie verursacht ähnliche pathophysiologische Mechanismen wie sie bei einer Inflammation zu sehen sind. Dazu zählen die vermehrte Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine, die Steigerung des vaskulären Proteinverlustes, sowie die vermehrte Akkumulation inflammatorischer Zellen in zahlreichen Organen [76]. Untersuchungen zu Hypoxie-bedingten Schäden können helfen inflammatorische Prozesse besser zu verstehen. Um die Frage zu beantworten, wie Sevofluran die Expression des A2b-R steigert, könnte der Hypoxie-induzierter Faktor 1 (HIF-1) ein möglicher Ansatzpunkt sein. Der A2b-R besitzt eine Bindestelle für HIF-1, welcher damit einen wichtigen Transkriptionsfaktor für den A2b-R darstellt [77]. Außerdem konnte in verschiedenen Tiermodellen mit I/R-Schaden demonstriert werden, dass Sevofluran die Expression des HIF-1 steigert [78, 79]. Auch die Inhibition von HIF-1 konnte die positiven Effekte von Sevofluran auslöschen [80]. Vollständig erklären lässt sich die molekulargenetische Wirkweise von Sevofluran dadurch aber noch nicht und bleibt damit Frage weiterführender Forschung.

Zytokine und Chemokine spielen eine wichtige Rolle bei der Anlockung, Aktivierung und Migration von PMNs [81]. Eine verminderte Ausschüttung kann in einer reduzierten PMN-Migration resultieren und damit Gewebe vor den Schäden der massiven Einwanderung schützen [22].

In dieser Arbeit erfolgte die Untersuchung der Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-6. Auf einen

inflammatorischen Reiz steigt die Plasma-Konzentration von TNF- $\alpha$  sehr stark an [82]. TNF- $\alpha$  wird hauptsächlich von Monozyten, aber auch von Endothelzellen, Mastzellen und Leukozyten produziert [15]. Er gilt als ein Hauptaktivator der Entzündungskaskade und wird auch als therapeutischer Angriffspunkt im Rahmen der Sepsis diskutiert [83]. So konnten z.B. Therapien mit Anti-TNF- $\alpha$  Antikörpern die Mortalitätsrate bei Sepsis sowohl in Mäusen als auch in Patienten senken [84, 85]. Bei IL-6 handelt es sich um einen wichtigen und sensitiven Marker der Inflammation. Es korreliert mit der Schwere einer Sepsis [14]. Außerdem führt es in der Leber zur Produktion von Akute-Phase-Proteinen und induziert Fieber.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit verdeutlichen, dass sich Sevofluran in Bezug auf eine reduzierte Zytokin-Ausschüttung als therapeutisches Agens eignen könnte. Die Injektion von Zymosan führte zu dem erwarteten deutlichen Anstieg von TNF- $\alpha$  und IL-6 in der Peritoneallavage. Durch die Behandlung mit Sevofluran konnte dieser Anstieg signifikant reduziert werden. Diese Sevofluran-induzierte Verminderung pro-inflammatorischer Zytokine bestätigt die Ergebnisse anderer Studien, welche ebenfalls den Einfluss von Sevofluran bei inflammatorischen Prozessen untersuchten. In einem Modell mit I/R-Schaden der Niere wurden kultivierte proximale Tubuluszellen mit TNF- $\alpha$  stimuliert. Die gleichzeitige Behandlung mit Sevofluran konnte den Anstieg der TNF- $\alpha$  mRNA in den Nierenzellen reduzieren [45]. Auch bei der Stimulation von Alveolarmakrophagen führte die Postkonditionierung mit Sevofluran zu einer reduzierten Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine und Chemokine wie TNF- $\alpha$  und CXCL2/3 [86]. Dies hatte außerdem eine reduzierte Anlockung von PMNs zur Folge. In einem Sepsis-Modell in Ratten sanken die Plasmakonzentrationen von TNF- $\alpha$  und weiteren pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-1 $\beta$  durch die Behandlung mit Sevofluran [63]. Die Sepsis wurde hier durch die i.v.-Injektion des Endotoxin LPS induziert.

Eine weitere Studie, welche mit dem Sepsis-Modell CLP in Ratten arbeitete, konnte durch Präkonditionierung mit Sevofluran eine signifikante Reduktion von TNF- $\alpha$  und IL-6 nach 4 Stunden zeigen [69]. Herrmann et al. führten eine zweistündige Behandlung mit Sevofluran bei Sepsis-Induktion mittels CLP in Mäusen durch. Hier änderte sich die IL-6 Konzentration nicht signifikant durch die Sevofluran-Inhalation [50]. Al-

lerdings erfolgte die Messung der Konzentration hier nach 24 Stunden. Auch in der vorliegenden Arbeit ließ sich nach 24 Stunden der positive Effekt von Sevofluran auf die PMN-Migration nicht mehr nachweisen. Dies wirft die Frage auf, ob der Effekt von Sevofluran mit der Zeit abnimmt und stellt einen Forschungsansatz für weiterführende Experimente dar.

Neben den Zytokinen erfolgte auch die Untersuchung der Chemokine CXCL1 (KC) und CXCL2/3 (MIP-2). Sie gehören zur Familie der CXC-Chemokine, welche hauptsächlich für die Chemotaxis von PMNs verantwortlich sind [17]. Es konnte demonstriert werden, dass eine Blockade dieser Chemokine die Migration von PMNs in die Peritonealhöhle deutlich reduziert [87]. Eine Studie, welche CXCL1 -/- Mäuse im Sepsis-Modell CLP untersuchte, verdeutlicht die Bedeutung dieses Chemokins bei der Inflammation [88]. Die Knock-out-Tiere wiesen eine erhöhte Mortalität und eine vermehrte Anzahl an Bakterien in der Peritonealhöhle auf. Die Autoren führten dies auf eine mangelnde bakterielle Clearance zurück. Salkowski et al. demonstrierten zum einen, dass die mRNA von CXCL1 und CXCL2/3 in Leber und Lunge bei Sepsis stark ansteigen. Zum anderen ist dies mit einer verstärkten PMN-Infiltration in diese Organe assoziiert [89].

Auch in der vorliegenden Arbeit stiegen die Konzentrationen von CXCL1 und CXCL2/3 durch einen inflammatorischen Stimulus deutlich an. Die Behandlung mit Sevofluran wiederum konnte diesen Anstieg reduzieren. Die Ergebnisse werden gestützt durch Studien, welche ebenfalls anti-inflammatorische Eigenschaften von Sevofluran untersuchten. So konnte durch die Behandlung mit Sevofluran und anschließender LPS-Stimulation von Alveolarepithelzellen reduzierte Konzentrationen an Chemokinen, darunter auch CXCL2/3 nachgewiesen werden [90]. Dies war außerdem mit einer verminderten Migration von PMNs vergesellschaftet. Auch die Postkonditionierung mit Sevofluran verringerte den Anstieg der CXCL2/3- und TNF- $\alpha$ -Konzentrationen in mit LPS stimulierten Alveolarmakrophagen [86].

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen, dass Sevofluran den Anstieg pro-inflammatorischer Zytokine und Chemokine auf einen Entzündungsreiz reduzieren

kann. Die Untersuchung der Zytokin- und Chemokin-Ausschüttung in A2b <sup>-/-</sup> Mäusen konnte des Weiteren demonstrieren, dass deren Reduktion über den A2b-R vermittelt wird. Der Zusammenhang zwischen der Fähigkeit von Sevofluran, die Zytokin- und Chemokin-Ausschüttung auf einen Entzündungsreiz abzuschwächen, und dem A2b-R konnte auch in einem Modell mit Leber-I/R-Schaden dargestellt werden [56]. Sevofluran konnte hier die Konzentration von IL-6 in Wildtyp-Tieren senken, während es in den A2b <sup>-/-</sup> Mäusen keinen Einfluss auf die Konzentration nehmen konnte.

Eine Beteiligung des A2b-R an der Zytokin- und Chemokinregulation während der Inflammation konnte bereits mehrfach gezeigt werden. In einem Sepsis-Modell wiesen zum einen A2b <sup>-/-</sup> Mäuse erhöhte Konzentration von TNF- $\alpha$ , IL-6 und CXCL2/3 im Plasma und in der Peritoneallavage auf. Zum anderen stiegen die Konzentrationen bei pharmakologischer Blockade des A2b-R vermehrt an [37]. Auch in verschiedenen Modellen der akuten Lungeninflammation wiesen A2b <sup>-/-</sup> Mäuse erhöhte Level an pro-inflammatorischen Zytokinen auf [34, 91, 92].

Ein weiterer Pathomechanismus der Sepsis ist die gesteigerte Expression von Adhäsionsmolekülen [93]. Die durch einen Entzündungsreiz aktivierten Makrophagen sezernieren pro-inflammatorische Zytokine, darunter auch TNF- $\alpha$ . Dieser wiederum stimuliert PMNs und Endothelzellen zur Expression von Adhäsionsmolekülen und initiiert damit die Extravasation der PMNs [18]. Endotheliale Selektine sind für das erste Anbinden der PMNs am Endothel verantwortlich. Die abwechselnde Lösung und Bindung der Selektine mit ihren auf PMNs exprimierten Liganden führt zum Rollen der Leukozyten entlang des Endothels und zur Reduktion ihrer Geschwindigkeit im Blutfluss [19]. Die Geschwindigkeit wird durch immer festere Adhäsion mit Hilfe von Integrinen weiter reduziert, bis die PMNs trans- oder parazellulär das Gefäß verlassen können [23]. Ohne diese Migrations-Kaskade gelangen PMNs nicht zum Infektfokus. Dieser essentielle Schritt der Inflammation stellt somit einen weiteren möglichen therapeutischen Angriffspunkt dar, um die massive Infiltration ins Gewebe und die damit einhergehenden Schäden durch PMNs zu reduzieren.

Eine durch Sevofluran induzierte, verminderte Adhäsion von PMNs am Endothel wurde bereits mehrfach beschrieben [94, 95]. Verschiedene Studien zeigen dabei,

dass Sevofluran die Expression nicht-hämatopoetischer Adhäsionsmoleküle verändert. Dazu zählen P-Selektin und ICAM-1, der Ligand für die Integrine Mac-1 und LFA-1 [69, 96]. In der vorliegenden Arbeit lag der Fokus auf Adhäsionsmolekülen, welche auf der Oberfläche von PMNs exprimiert werden. Dabei wurde deutlich, dass Sevofluran die Expression einer Vielzahl am Migrationsprozess beteiligten Adhäsionsmoleküle reduziert. Nämlich den Selektin-Ligand CD162, CD44, die  $\beta_2$ -Integrine CD11a und CD11b, sowie CD31 (PECAM-1) und CD54 (ICAM-1).

Sevofluran hatte nicht auf alle PMNs den gleichen Einfluss. So ließen sich z.B. auf PMNs, welche im septischen Geschehen in die Lunge migrierten, nur die  $\beta_2$ -Integrine CD11a und CD11b durch Sevofluran beeinflussen. Eine reduzierte PMN-Zahl in der Lunge ist damit trotzdem vereinbar. CD11a und CD11b gelten als hauptverantwortlich für die PMN-Adhäsion und Migration in Arteriolen, Venolen und Kapillaren der Lunge [97]. Eine Inhibition der beiden führte in einer Studie zur reduzierten Adhäsion der PMNs an der Gefäßwand [97]. Die Roll- und Adhäsionseigenschaften von PMNs bei CLP-induzierter Sepsis wurden hier mittels intravitale Fluoreszenz-Mikroskopie untersucht.

Das  $\beta_2$ -Integrin CD11b bildet zusammen mit CD18 das Adhäsionsmolekül Mac-1. Dieses ist für die feste Adhäsion von PMNs am Endothel, sowie die anschließende Migration verantwortlich. Es spielt damit eine wichtige Rolle bei der Inflammation. Da die Expression von CD11b bei Entzündung ansteigt wird es außerdem als Aktivitätsmarker von PMNs diskutiert [98, 99]. Dass Sevofluran diese entzündungsbedingte Hochregulation reduzieren kann, wurde bereits mehrfach beschrieben. Die Behandlung mit Sevofluran bei kardialem I/R-Schaden reduzierte die CD11b-Expression [100]. Auch bei Stimulation von humanen Endothelzellen (HUVEC) [101], sowie bei extrakorporaler Zirkulation (ECC) [102] konnte Sevofluran die Hochregulation von CD11b auf PMNs verhindern. Müller-Edenborn et al. stellten einen Zusammenhang zwischen der reduzierten CD11b-Expression durch Sevofluran und dem CXCR2, dem Rezeptor für die Chemokine CXCL1 und CXCL2/3, fest [103]. Die Blockade dieses Rezeptors konnte den Effekt von Sevofluran auf die CD11b-Expression neutralisieren. Die in der vorliegenden Arbeit durch Sevofluran erniedrigten Chemokinlevel könnten somit eine Ursache der reduzierten Expression von CD11b sein. Eine genaue Erforschung

des kausalen Zusammenhanges würde weitere Aufschlüsse über die Wirkweise von Sevofluran geben.

In der vorliegenden Arbeit bleibt unklar, warum sich die Wirkung von Sevofluran auf die Expression der Adhäsionsmoleküle unterscheidet, je nachdem in welchem Organ die migrierten PMNs untersucht wurden. Da die Zusammensetzung der endothelialen Gefäßbarriere sich nicht nur je nach Gefäß (Arterie, Arteriole, Kapillare, Venole oder Vene), sondern auch je nach Organ unterscheidet, äußert sich der septische Schaden auch nicht in jedem Organ gleich [104]. Dies könnte folglich zu einer je nach Organ unterschiedlichen Ausschüttung von Chemokinen/Zytokinen, sowie zu verschiedenen Expressionsmuster an notwendigen Rezeptoren und Adhäsionsmolekülen führen. Dies wäre eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche Wirkweise von Sevofluran.

Weitere Ergebnisse der vorliegenden Arbeit veranschaulichen, dass der Effekt von Sevofluran auf die verschiedenen Adhäsionsmoleküle ebenfalls über den A2b-R vermittelt wird. Sevofluran konnte die Expression der Adhäsionsmoleküle in A2b  $-/-$  Mäuse nicht beeinflussen. Wakai et al. demonstrierten bereits, dass die Stimulation des A2b-R die transendotheliale Migration von PMNs reduziert [70]. Des Weiteren wurde in A2b  $-/-$  Mäusen eine erhöhte Expression der endothelialen Adhäsionsmoleküle E-Selektin, P-Selektin und ICAM-1 nachgewiesen [34]. Weitere Untersuchungen zeigten außerdem eine reduzierte Fließgeschwindigkeit der Leukozyten im Gefäß, sowie eine vermehrte Adhäsion an der Gefäßwand im Vergleich zu den Wildtyp Tieren. Yang et al. macht die vermehrte Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine in A2b  $-/-$  Mäusen für die gesteigerte Expression von Adhäsionsmolekülen und die vermehrte Adhäsion von PMNs am Endothel verantwortlich [34].

Die vorliegende Arbeit demonstriert über die bisherigen Ergebnisse von Yang et al. hinaus, dass über den A2b-R auch mehrere auf PMNs exprimierte Adhäsionsmoleküle beeinflusst werden.

Um die erzielten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zu validieren, erfolgte die Untersuchung der Wirkung von Sevofluran noch in einem alternativen murinen Peritonitis-Modell. Das Modell der Zymosan-induzierten Peritonitis ist ein sehr standardisiertes Verfahren, welches sich gut eignet um reproduzierbare Ergebnisse zu erzeugen. Es



handelt sich dabei um eine sterile Inflammation, bei der die Entzündungskaskade ohne Vorliegen eines Erregers in Gang gesetzt wird. Dies hat den Nachteil, dass die komplexe Reaktion der Sepsis auf einen meist bakteriellen Fokus auf einen Bruchteil reduziert wird [4]. Das Modell der Fäzes-induzierten Peritonitis (FIP) arbeitet mit Injektion von gesammeltem Kot und folglich mit Keimen der mauseigenen Darmflora [105, 106]. Der Vorteil der FIP gegenüber anderen Modellen wie CLP ist, dass die injizierte Dosis standardisiert ist. Eine gute Vergleichbarkeit ist damit weiterhin möglich. Die Inhalation von Sevofluran führte auch in diesem Modell zu einer reduzierten Migration von PMNs ins Gewebe und einer stabilisierten endothelialen Barriere. Ob sich dies auch auf den Menschen übertragen lässt, bleibt zu untersuchen.

Zusammenfassend bietet das Zusammenspiel aus reduzierten Zytokinen, Chemokinen und Adhäsionsmolekülen eine Erklärung für die reduzierte Migration der PMNs ins Gewebe nach der Behandlung mit Sevofluran bei Peritonitis-induzierter Sepsis. Herrmann et al. konnten demonstrieren, dass Sevofluran die Überlebensrate bei CLP-induzierter Sepsis steigert [50]. Dafür konnten sie außerdem den i.v.-applizierbaren Sevofluran-Metabolit Hexafluoroisopropanol (HFIP) verantwortlich machen [107]. Ob dies ein breiteres therapeutisches Spektrum ermöglicht, in dem der Sevofluran-Metabolit ohne gleichzeitige Sedierung verwendet wird, gilt zu untersuchen. Die vorliegende Arbeit konnte darüber hinaus zeigen, dass die anti-inflammatorische Wirkung von Sevofluran über die Expressionssteigerung des A2b-R erfolgt. Der dafür zugrundeliegende Mechanismus bleibt Frage weiterführender Forschung.

Die immer noch hohe Mortalitätsrate von Peritonitis und Sepsis erfordern die stetige Erforschung neuer therapeutischer Möglichkeiten. Die vorliegende Arbeit kann zur Verbesserung der Therapiestrategien bei der Sepsis beitragen. Der bevorzugte Einsatz von Sevofluran als Mittel der Wahl bei einer notwendigen Sedierung nicht nur als Sedativum, sondern auch als anti-inflammatorisches Therapeutikum könnte ein wichtiger Schritt sein.

Für eine weitere Validierung der in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse und deren Umsetzbarkeit in den Menschen, sind noch weiterführende Experimente und klinische Studien notwendig.

## 5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit konnte den protektiven Effekt von Sevofluran bei der Sepsis bestätigen und zu neuen Erkenntnissen der Wirkweise beitragen. Der A2b-R spielt dabei eine entscheidende Rolle.

Das volatile Anästhetikum Sevofluran nimmt Einfluss auf wesentliche Merkmale der Entzündungsreaktion. Die Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine und Chemokine und die Hochregulation wichtiger Adhäsionsmoleküle wird durch die Behandlung mit Sevofluran reduziert und die mikrovaskuläre Permeabilität stabilisiert. Der Eingriff in diese wichtigen Schritte der Entzündungskaskade resultiert in einer verringerten Migration neutrophiler Granulozyten ins Gewebe und verhindert dadurch entstehende Schäden.

Sevofluran vermittelt diese Wirkung über den A2b-R. In A2b  $-/-$  Mäusen ist der positive Effekt von Sevofluran nicht mehr nachweisbar. Der niedrig-affine Adenosinrezeptor wird in erster Linie unter pathophysiologischen Bedingungen aktiviert, da nur hier die notwendigen Konzentrationen an Adenosin erreicht werden. Auch wenn seine Rolle bei der Inflammation nicht immer eindeutig ist, so zeigt sich der A2b-R im Zusammenhang mit Sevofluran bei Peritonitis-induzierter Sepsis klar anti-inflammatorisch. Sevofluran steigert die Expression des A2b-R, die dafür zugrundeliegenden Mechanismen sind allerdings noch nicht ausreichend geklärt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit geben weitere mögliche therapeutische Ansatzpunkte für die Erkrankungen Peritonitis und Sepsis. Ein Einsatz von Sevofluran bei der Sedierung beatmeter Patienten auf der Intensivstation und während der chirurgischen Fokussanierung nicht nur als Anästhetikum sondern auch als Therapeutikum, könnte die Ausprägung der Entzündungsreaktion lindern und möglicherweise die heutzutage immer noch hohe Mortalitätsrate der Peritonitis und Sepsis senken.

Eine Übertragbarkeit der hier erzielten Ergebnisse in den Menschen und den klinischen Alltag bleibt noch zu untersuchen.

## 6 Literaturverzeichnis

- [1] Wittmann DH, Schein M und Condon RE. Management of secondary peritonitis. In: *Annals of surgery* 224.1 (Juli 1996), 10–18.
- [2] Doklestić SK, Bajec DD, Djukić RV, Bumbaširević V, Detanac AD, Detanac SD *et al.* Secondary peritonitis - evaluation of 204 cases and literature review. In: *Journal of medicine and life* 7.2 (Juni 2014), 132–138.
- [3] Strobel O, Werner J und Büchler MW. [Surgical therapy of peritonitis]. In: *Der Chirurg; Zeitschrift für alle Gebiete der operativen Medizin* 82.3 (März 2011), 242–248.
- [4] Beyer K, Menges P, Keßler W und Heidecke CD. [Pathophysiology of peritonitis]. In: *Der Chirurg; Zeitschrift für alle Gebiete der operativen Medizin* 87.1 (Jan. 2016), 5–12.
- [5] Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M *et al.* “The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3).” In: *JAMA*. Bloomsbury Institute of Intensive Care Medicine, University College London, London, United Kingdom. Feb. 2016, S. 801–810.
- [6] Bhan C, Dipankar P, Chakraborty P und Sarangi PP. Role of cellular events in the pathophysiology of sepsis. In: *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]* 65.11 (Nov. 2016), 853–868.
- [7] Sagy M, Al-Qaqaa Y und Kim P. Definitions and pathophysiology of sepsis. In: *Current problems in pediatric and adolescent health care* 43.10 (Nov. 2013), 260–263.
- [8] Uhle F, Lichtenstern C, Brenner T und Weigand MA. [Pathophysiology of sepsis]. In: *Anesthesiologie, Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie : AINS* 50.2 (Feb. 2015), 114–122.
- [9] Schlegel N. [Updated definition of sepsis : Implications for diagnostics and therapy principles]. In: *Der Chirurg; Zeitschrift für alle Gebiete der operativen Medizin* 88.1 (Jan. 2017), 81–92.
- [10] Neri A, Marrelli D, Scheiterle M, Di Mare G, Sforza S und Roviello F. Re-evaluation of Mannheim prognostic index in perforative peritonitis: prognostic role of advanced age. A prospective cohort study. In: *International journal of surgery (London, England)* 13 (Jan. 2015), 54–59.
- [11] Theunissen C, Cherifi S und Karmali R. Management and outcome of high-risk peritonitis: a retrospective survey 2005-2009. In: *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases* 15.11 (Nov. 2011), e769–73.

- [12] Fleischmann C, Scherag A, Adhikari NKJ, Hartog CS, Tsaganos T, Schlattmann P *et al.* Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations. In: *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 193.3 (Feb. 2016), 259–272.
- [13] Amulic B, Cazalet C, Hayes GL, Metzler KD und Zychlinsky A. Neutrophil function: from mechanisms to disease. In: *Annual review of immunology* 30.1 (2012), 459–489.
- [14] Faix JD. Biomarkers of sepsis. In: *Critical reviews in clinical laboratory sciences* 50.1 (Jan. 2013), 23–36.
- [15] Borish LC und Steinke JW. 2. Cytokines and chemokines. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 111.2 Suppl (Feb. 2003), S460–75.
- [16] Keane MP und Strieter RM. Chemokine signaling in inflammation. In: *Critical care medicine* 28.4 Suppl (Apr. 2000), N13–26.
- [17] Palomino DCT und Marti LC. Chemokines and immunity. In: *Einstein (Sao Paulo, Brazil)* 13.3 (Juli 2015), 469–473.
- [18] Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI und Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. In: *Nature Reviews Immunology* 7.9 (Sep. 2007), 678–689.
- [19] Kolaczowska E und Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. In: *Nature Reviews Immunology* 13.3 (März 2013), 159–175.
- [20] Eriksson EE, Xie X, Werr J, Thoren P und Lindbom L. Importance of primary capture and L-selectin-dependent secondary capture in leukocyte accumulation in inflammation and atherosclerosis in vivo. In: *The Journal of experimental medicine* 194.2 (Juli 2001), 205–218.
- [21] Campbell JJ, Hedrick J, Zlotnik A, Siani MA, Thompson DA und Butcher EC. Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. In: *Science (New York, N.Y.)* 279.5349 (Jan. 1998), 381–384.
- [22] Brown KA, Brain SD, Pearson JD, Edgeworth JD, Lewis SM und Treacher DF. Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. In: *Lancet (London, England)* 368.9530 (Juli 2006), 157–169.
- [23] Phillipson M, Heit B, Colarusso P, Liu L, Ballantyne CM und Kubes P. Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. In: *The Journal of experimental medicine* 203.12 (Nov. 2006), 2569–2575.
- [24] Phillipson M und Kubes P. The neutrophil in vascular inflammation. In: *Nature medicine* 17.11 (Nov. 2011), 1381–1390.
- [25] Malkin AD, Sheehan RP, Mathew S, Federspiel WJ, Redl H und Clermont G. A Neutrophil Phenotype Model for Extracorporeal Treatment of Sepsis. In: *PLoS computational biology* 11.10 (Okt. 2015), e1004314.
- [26] Möser GH, Schrader J und Deussen A. Turnover of adenosine in plasma of human and dog blood. In: *The American journal of physiology* 256.4 Pt 1 (Apr. 1989), C799–806.

- [27] Kumar V und Sharma A. Adenosine: an endogenous modulator of innate immune system with therapeutic potential. In: *European journal of pharmacology* 616.1-3 (Aug. 2009), 7–15.
- [28] Latini S, Bordoni F, Pedata F und Corradetti R. Extracellular adenosine concentrations during in vitro ischaemia in rat hippocampal slices. In: *British journal of pharmacology* 127.3 (Juni 1999), 729–739.
- [29] Eltzschig HK. Adenosine: an old drug newly discovered. In: *Anesthesiology* 111.4 (Okt. 2009), 904–915.
- [30] Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN und Linden J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. In: *Pharmacological reviews* 53.4 (Dez. 2001), 527–552.
- [31] Bruns RF, Lu GH und Pugsley TA. Characterization of the A<sub>2</sub> adenosine receptor labeled by [3H]NECA in rat striatal membranes. In: *Molecular pharmacology* 29.4 (Apr. 1986), 331–346.
- [32] Martin C, Leone M, Viviani X, Ayem ML und Guieu R. High adenosine plasma concentration as a prognostic index for outcome in patients with septic shock. In: *Critical care medicine* 28.9 (Sep. 2000), 3198–3202.
- [33] Ryzhov S, Zaynagetdinov R, Goldstein AE, Novitskiy SV, Blackburn MR, Biagioni I *et al.* Effect of A<sub>2B</sub> adenosine receptor gene ablation on adenosine-dependent regulation of proinflammatory cytokines. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 324.2 (Feb. 2008), 694–700.
- [34] Yang D, Zhang Y, Nguyen HG, Koupenova M, Chauhan AK, Makitalo M *et al.* The A<sub>2B</sub> adenosine receptor protects against inflammation and excessive vascular adhesion. In: *Journal of Clinical Investigation* 116.7 (Juli 2006), 1913–1923.
- [35] Kolachala VL, Vijay-Kumar M, Dalmaso G, Yang D, Linden J, Wang L *et al.* A<sub>2B</sub> adenosine receptor gene deletion attenuates murine colitis. In: *Gastroenterology* 135.3 (Sep. 2008), 861–870.
- [36] Sun CX, Zhong H, Mohsenin A, Morschl E, Chunn JL, Molina JG *et al.* Role of A<sub>2B</sub> adenosine receptor signaling in adenosine-dependent pulmonary inflammation and injury. In: *Journal of Clinical Investigation* 116.8 (Aug. 2006), 2173–2182.
- [37] Csóka B, Németh ZH, Rosenberger P, Eltzschig HK, Spolarics Z, Pacher P *et al.* A<sub>2B</sub> adenosine receptors protect against sepsis-induced mortality by dampening excessive inflammation. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 185.1 (Juli 2010), 542–550.
- [38] Toscano MG, Ganea D und Gamero AM. Cecal ligation puncture procedure. In: *Journal of visualized experiments : JoVE* 51 (Mai 2011), e2860–e2860.
- [39] Eckle T, Faigle M, Grenz A, Laucher S, Thompson LF und Eltzschig HK. A<sub>2B</sub> adenosine receptor dampens hypoxia-induced vascular leak. In: *Blood* 111.4 (Feb. 2008), 2024–2035.

- [40] Zimmerman MA, Grenz A, Tak E, Kaplan M, Ridyard D, Brodsky KS *et al.* Signaling through hepatocellular A2B adenosine receptors dampens ischemia and reperfusion injury of the liver. In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 110.29 (Juli 2013), 12012–12017.
- [41] Doi M und Ikeda K. Airway irritation produced by volatile anaesthetics during brief inhalation: comparison of halothane, enflurane, isoflurane and sevoflurane. In: Canadian journal of anaesthesia = Journal canadien d'anesthésie 40.2 (Feb. 1993), 122–126.
- [42] Kumar G, Stendall C, Mistry R, Gurusamy K und Walker D. A comparison of total intravenous anaesthesia using propofol with sevoflurane or desflurane in ambulatory surgery: systematic review and meta-analysis. In: Anaesthesia 69.10 (Okt. 2014), 1138–1150.
- [43] De Hert SG, Turani F, Mathur S und Stowe DF. Cardioprotection with volatile anesthetics: mechanisms and clinical implications. In: Anesthesia and analgesia 100.6 (Juni 2005), 1584–1593.
- [44] Beck-Schimmer B, Breitenstein S, Urech S, De Conno E, Wittlinger M, Puhan M *et al.* A randomized controlled trial on pharmacological preconditioning in liver surgery using a volatile anesthetic. In: Annals of surgery 248.6 (Dez. 2008), 909–918.
- [45] Lee HT, Kim M, Jan M und Emala CW. Anti-inflammatory and antinecrotic effects of the volatile anesthetic sevoflurane in kidney proximal tubule cells. In: American journal of physiology. Renal physiology 291.1 (Juli 2006), F67–78.
- [46] Kidani Y, Taniguchi T, Kanakura H, Takemoto Y, Tsuda K und Yamamoto K. Sevoflurane pretreatment inhibits endotoxin-induced shock in rats. In: Anesthesia and analgesia 101.4 (Okt. 2005), 1152–1156.
- [47] Kim HC, Kim E, Bae JI, Lee KH, Jeon YT, Hwang JW *et al.* Sevoflurane Postconditioning Reduces Apoptosis by Activating the JAK-STAT Pathway After Transient Global Cerebral Ischemia in Rats. In: Journal of neurosurgical anesthesiology 29.1 (Jan. 2017), 37–45.
- [48] Rodríguez-González R, Baluja A, Veiras Del Río S, Rodríguez A, Rodríguez J, Taboada M *et al.* Effects of sevoflurane postconditioning on cell death, inflammation and TLR expression in human endothelial cells exposed to LPS. In: Journal of translational medicine 11.1 (Apr. 2013), 87.
- [49] Knapp J, Bergmann G, Bruckner T, Russ N, Böttiger BW und Popp E. Pre- and postconditioning effect of Sevoflurane on myocardial dysfunction after cardiopulmonary resuscitation in rats. In: Resuscitation 84.10 (Okt. 2013), 1450–1455.
- [50] Herrmann IK, Castellon M, Schwartz DE, Hasler M, Urner M, Hu G *et al.* Volatile anesthetics improve survival after cecal ligation and puncture. In: Anesthesiology 119.4 (Okt. 2013), 901–906.
- [51] Bonney S, Hughes K und Eckle T. Anesthetic cardioprotection: the role of adenosine. In: Current pharmaceutical design 20.36 (2014), 5690–5695.

- [52] Cope DK, Impastato WK, Cohen MV und Downey JM. Volatile anesthetics protect the ischemic rabbit myocardium from infarction. In: *Anesthesiology* 86.3 (März 1997), 699–709.
- [53] Eltzschig HK, Ibla JC, Furuta GT, Leonard MO, Jacobson KA, Enyoloji K *et al.* Coordinated adenosine nucleotide phosphohydrolysis and nucleoside signaling in posthypoxic endothelium: role of ectonucleotidases and adenosine A2B receptors. In: *The Journal of experimental medicine* 198.5 (Sep. 2003), 783–796.
- [54] Lennon PF, Taylor CT, Stahl GL und Colgan SP. Neutrophil-derived 5'-adenosine monophosphate promotes endothelial barrier function via CD73-mediated conversion to adenosine and endothelial A2B receptor activation. In: *The Journal of experimental medicine* 188.8 (Okt. 1998), 1433–1443.
- [55] Eckle T, Krahn T, Grenz A, Köhler D, Mittelbronn M, Ledent C *et al.* Cardio-protection by ecto-5'-nucleotidase (CD73) and A2B adenosine receptors. In: *Circulation* 115.12 (März 2007), 1581–1590.
- [56] Granja TF, Köhler D, Schad J, Oliveira CB de, Konrad F, Hoch-Gutbrod M *et al.* Adenosine Receptor Adora2b Plays a Mechanistic Role in the Protective Effect of the Volatile Anesthetic Sevoflurane during Liver Ischemia/Reperfusion. In: *Anesthesiology* 125.3 (Sep. 2016), 547–560.
- [57] Volman TJH, Hendriks T und Goris RJA. Zymosan-induced generalized inflammation: experimental studies into mechanisms leading to multiple organ dysfunction syndrome. In: *Shock* 23.4 (Apr. 2005), 291–297.
- [58] Pulli B, Ali M, Forghani R, Schob S, Hsieh KLC, Wojtkiewicz G *et al.* Measuring myeloperoxidase activity in biological samples. In: *PloS one* 8.7 (2013), e67976.
- [59] Konrad FM, Witte E, Vollmer I, Stark S und Reutershan J. Adenosine receptor A2b on hematopoietic cells mediates LPS-induced migration of PMNs into the lung interstitium. In: *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 303.5 (Sep. 2012), L425–38.
- [60] Yuki K und Murakami N. Sepsis pathophysiology and anesthetic consideration. In: *Cardiovascular & hematological disorders drug targets* 15.1 (2015), 57–69.
- [61] Patel SB und Kress JP. Sedation and analgesia in the mechanically ventilated patient. In: *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 185.5 (März 2012), 486–497.
- [62] Schläpfer M, Piegeler T, Dull RO, Schwartz DE, Mao M, Bonini MG *et al.* Propofol increases morbidity and mortality in a rat model of sepsis. In: *Critical Care* 19.1 (Feb. 2015), 45.
- [63] Hofstetter C, Boost KA, Flondor M, Basagan-Mogol E, Betz C, Homann M *et al.* Anti-inflammatory effects of sevoflurane and mild hypothermia in endotoxemic rats. In: *Acta anaesthesiologica Scandinavica* 51.7 (Aug. 2007), 893–899.
- [64] Lee HT, Kim M, Kim M, Kim N, Billings FT, D'Agati VD *et al.* Isoflurane protects against renal ischemia and reperfusion injury and modulates leukocyte infiltration in mice. In: *American journal of physiology. Renal physiology* 293.3 (Sep. 2007), F713–22.



- [65] Reutershan J, Chang D, Hayes JK und Ley K. Protective effects of isoflurane pretreatment in endotoxin-induced lung injury. In: *Anesthesiology* 104.3 (März 2006), 511–517.
- [66] Head BP und Patel P. Anesthetics and brain protection. In: *Current opinion in anaesthesiology* 20.5 (Okt. 2007), 395–399.
- [67] Julier K, Silva R da, Garcia C, Bestmann L, Frascarolo P, Zollinger A *et al.* Preconditioning by sevoflurane decreases biochemical markers for myocardial and renal dysfunction in coronary artery bypass graft surgery: a double-blinded, placebo-controlled, multicenter study. In: *Anesthesiology* 98.6 (Juni 2003), 1315–1327.
- [68] Farmer DG, Anselmo D, Da Shen X, Ke B, Carmody IC, Gao F *et al.* Disruption of P-selectin signaling modulates cell trafficking and results in improved outcomes after mouse warm intestinal ischemia and reperfusion injury. In: *Transplantation* 80.6 (Sep. 2005), 828–835.
- [69] Bedirli N, Demirtas CY, Akkaya T, Salman B, Alper M, Bedirli A *et al.* Volatile anesthetic preconditioning attenuated sepsis induced lung inflammation. In: *The Journal of surgical research* 178.1 (Nov. 2012), e17–23.
- [70] Wakai A, Wang JH, Winter DC, Street JT, O’Sullivan RG und Redmond HP. Adenosine inhibits neutrophil vascular endothelial growth factor release and transendothelial migration via A2B receptor activation. In: *Shock* 15.4 (Apr. 2001), 297–301.
- [71] Li Q, Zhang Q, Wang C, Liu X, Li N und Li J. Disruption of tight junctions during polymicrobial sepsis in vivo. In: *The Journal of pathology* 218.2 (Juni 2009), 210–221.
- [72] Dhillon SS, Mahadevan K, Bandi V, Zheng Z, Smith CW und Rumbaut RE. Neutrophils, nitric oxide, and microvascular permeability in severe sepsis. In: *Chest* 128.3 (Sep. 2005), 1706–1712.
- [73] Sun SX, Ge BX und Miao CH. Effects of preconditioning with sevoflurane on TNF- $\alpha$ -induced permeability and activation of p38 MAPK in rat pulmonary microvascular endothelial cells. In: *Cell biochemistry and biophysics* 61.1 (Sep. 2011), 123–129.
- [74] Cavalcante FP, Coelho AMM, Machado MCC, Sampietre SN, Patzina RA, Diniz MA *et al.* Mechanisms of the beneficial effect of sevoflurane in liver ischemia/reperfusion injury. In: *Acta cirurgica brasileira* 30.11 (Nov. 2015), 749–755.
- [75] Cuenca AG, Delano MJ, Kelly-Scumpia KM, Moldawer LL und Efron PA. Cecal ligation and puncture. In: *Current protocols in immunology* Chapter 19 (Nov. 2010), Unit 19.13–19.13.11.
- [76] Eltzschig HK und Carmeliet P. Hypoxia and inflammation. In: *The New England journal of medicine* 364.7 (Feb. 2011), 656–665.

- [77] Kong T, Westerman KA, Faigle M, Eltzschig HK und Colgan SP. HIF-dependent induction of adenosine A2B receptor in hypoxia. In: FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 20.13 (Nov. 2006), 2242–2250.
- [78] Ye Z, Guo Q, Xia P, Wang N, Wang E und Yuan Y. Sevoflurane postconditioning involves an up-regulation of HIF-1 $\alpha$  and HO-1 expression via PI3K/Akt pathway in a rat model of focal cerebral ischemia. In: Brain research 1463 (Juni 2012), 63–74.
- [79] Meybohm P, Gruenewald M, Albrecht M, Müller C, Zitta K, Foessel N *et al.* Pharmacological postconditioning with sevoflurane after cardiopulmonary resuscitation reduces myocardial dysfunction. In: Critical care (London, England) 15.5 (2011), R241.
- [80] Yang L, Xie P, Wu J, Yu J, Yu T, Wang H *et al.* Sevoflurane postconditioning improves myocardial mitochondrial respiratory function and reduces myocardial ischemia-reperfusion injury by up-regulating HIF-1. In: American journal of translational research 8.10 (2016), 4415–4424.
- [81] Cavaillon JM, Adib-Conquy M, Fitting C, Adrie C und Payen D. Cytokine cascade in sepsis. In: Scandinavian journal of infectious diseases 35.9 (2003), 535–544.
- [82] Cannon JG, Tompkins RG, Gelfand JA, Michie HR, Stanford GG, Meer JW van der *et al.* Circulating interleukin-1 and tumor necrosis factor in septic shock and experimental endotoxin fever. In: The Journal of infectious diseases 161.1 (Jan. 1990), 79–84.
- [83] Spooner CE, Markowitz NP und Saravolatz LD. The role of tumor necrosis factor in sepsis. In: Clinical immunology and immunopathology 62.1 Pt 2 (Jan. 1992), S11–7.
- [84] Zabrodskii PF, Gromov MS und Maslyakov VV. Effect of  $\alpha$ 7n-Acetylcholine Receptor Activation and Antibodies to TNF- $\alpha$  on Mortality of Mice and Concentration of Proinflammatory Cytokines During Early Stage of Sepsis. In: Bulletin of experimental biology and medicine 159.6 (Okt. 2015), 740–742.
- [85] Lv S, Han M, Yi R, Kwon S, Dai C und Wang R. Anti-TNF- $\alpha$  therapy for patients with sepsis: a systematic meta-analysis. In: International journal of clinical practice 68.4 (Apr. 2014), 520–528.
- [86] Steurer M, Schläpfer M, Z'graggen BR, Booy C, Reyes L, Spahn DR *et al.* The volatile anaesthetic sevoflurane attenuates lipopolysaccharide-induced injury in alveolar macrophages. In: Clinical and experimental immunology 155.2 (Feb. 2009), 224–230.
- [87] De Filippo K, Dudeck A, Hasenberg M, Nye E, Rooijen N van, Hartmann K *et al.* Mast cell and macrophage chemokines CXCL1/CXCL2 control the early stage of neutrophil recruitment during tissue inflammation. In: Blood 121.24 (Juni 2013), 4930–4937.

- [88] Jin L, Batra S, Douda DN, Palaniyar N und Jeyaseelan S. CXCL1 contributes to host defense in polymicrobial sepsis via modulating T cell and neutrophil functions. In: *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 193.7 (Okt. 2014), 3549–3558.
- [89] Salkowski CA, Detore G, Franks A, Falk MC und Vogel SN. Pulmonary and hepatic gene expression following cecal ligation and puncture: monophosphoryl lipid A prophylaxis attenuates sepsis-induced cytokine and chemokine expression and neutrophil infiltration. In: *Infection and immunity* 66.8 (Aug. 1998), 3569–3578.
- [90] Suter D, Spahn DR, Blumenthal S, Reyes L, Booy C, Z'graggen BR *et al.* The immunomodulatory effect of sevoflurane in endotoxin-injured alveolar epithelial cells. In: *Anesthesia and analgesia* 104.3 (März 2007), 638–645.
- [91] Yang D, Koupenova M, McCrann DJ, Kopeikina KJ, Kagan HM, Schreiber BM *et al.* The A2b adenosine receptor protects against vascular injury. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105.2 (Jan. 2008), 792–796.
- [92] Eckle T, Grenz A, Laucher S und Eltzschig HK. A2B adenosine receptor signaling attenuates acute lung injury by enhancing alveolar fluid clearance in mice. In: *Journal of Clinical Investigation* 118.10 (Okt. 2008), 3301–3315.
- [93] Aird WC. The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. In: *Blood* 101.10 (Mai 2003), 3765–3777.
- [94] Kowalski C, Zahler S, Becker BF, Flaucher A, Conzen PF, Gerlach E *et al.* Halothane, isoflurane, and sevoflurane reduce postischemic adhesion of neutrophils in the coronary system. In: *Anesthesiology* 86.1 (Jan. 1997), 188–195.
- [95] Chappell D, Heindl B, Jacob M, Annecke T, Chen C, Rehm M *et al.* Sevoflurane reduces leukocyte and platelet adhesion after ischemia-reperfusion by protecting the endothelial glycocalyx. In: *Anesthesiology* 115.3 (Sep. 2011), 483–491.
- [96] Gan X, Su G, Zhao W, Huang P, Luo G und Hei Z. The mechanism of sevoflurane preconditioning-induced protections against small intestinal ischemia reperfusion injury is independent of mast cell in rats. In: *Mediators of inflammation* 2013.4 (2013), 378703–12.
- [97] Wang Y, Roller J, Menger MD und Thorlacius H. Sepsis-induced leukocyte adhesion in the pulmonary microvasculature in vivo is mediated by CD11a and CD11b. In: *European journal of pharmacology* 702.1-3 (Feb. 2013), 135–141.
- [98] Lakschevitz FS, Hassanpour S, Rubin A, Fine N, Sun C und Glogauer M. Identification of Neutrophil Surface Marker Changes in Health and Inflammation using High-throughput Screening Flow Cytometry. In: *Experimental cell research* 342.2 (März 2016), 200–209.
- [99] Jämsä J, Huotari V, Savolainen ER, Syrjälä H und Ala-Kokko T. Kinetics of leukocyte CD11b and CD64 expression in severe sepsis and non-infectious critical care patients. In: *Acta anaesthesiologica Scandinavica* 59.7 (Aug. 2015), 881–891.

- [100] Heindl B, Reichle FM, Zahler S, Conzen PF und Becker BF. Sevoflurane and isoflurane protect the reperfused guinea pig heart by reducing postischemic adhesion of polymorphonuclear neutrophils. In: *Anesthesiology* 91.2 (Aug. 1999), 521–530.
- [101] Möbert J, Zahler S, Becker BF und Conzen PF. Inhibition of neutrophil activation by volatile anesthetics decreases adhesion to cultured human endothelial cells. In: *Anesthesiology* 90.5 (Mai 1999), 1372–1381.
- [102] Schmid E, Krajewski S, Bachmann D, Kurz J, Wendel HP, Rosenberger P *et al.* The volatile anesthetic sevoflurane inhibits activation of neutrophil granulocytes during simulated extracorporeal circulation. In: *International Immunopharmacology* 14.2 (Okt. 2012), 202–208.
- [103] Müller-Edenborn B, Frick R, Piegeler T, Schläpfer M, Roth-Z'graggen B, Schlicker A *et al.* Volatile anaesthetics reduce neutrophil inflammatory response by interfering with CXC receptor-2 signalling. In: *British journal of anaesthesia* 114.1 (Jan. 2015), 143–149.
- [104] Ince C, Mayeux PR, Nguyen T, Gomez H, Kellum JA, Ospina-Tascón GA *et al.* THE ENDOTHELIUM IN SEPSIS. In: *Shock* 45.3 (März 2016), 259–270.
- [105] Bernardshaw S, Hetland G, Grinde B und Johnson E. An extract of the mushroom *Agaricus blazei* Murill protects against lethal septicemia in a mouse model of fecal peritonitis. In: *Shock* 25.4 (Apr. 2006), 420–425.
- [106] Brocco MC, Paulo DNS, Almeida CEDd, Carraretto AR, Cabral SA, Silveira ACdO *et al.* A study of interleukin 6 (IL-6) and tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) serum levels in rats subjected to fecal peritonitis and treated with intraperitoneal ropivacaine. In: *Acta cirurgica brasileira* 27.7 (Juli 2012), 494–498.
- [107] Herrmann IK, Castellon M, Schwartz DE, Hasler M, Urner M, Hu G *et al.* Intravenous Application of a Primary Sevoflurane Metabolite Improves Outcome in Murine Septic Peritonitis: First Results. In: *PloS one* 8.8 (Aug. 2013), 1–4.

## 7 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Klinik für Anästhesie und Intensivmedizin unter Betreuung von Prof. Dr. med. Reutershan und PD Dr. med. Straub durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Herrn Prof. Dr. med Reutershan und Dr. med. Franziska Konrad.

Die Tierversuche wurden von Franziska Konrad durchgeführt. Die Weiterverarbeitung der daraus gewonnenen Proben und alle weiteren Versuche führte ich (nach Einarbeitung durch Irene Vollmer, Franziska Konrad, Kristian Ngamsri und Anika Müller) eigenständig durch.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung durch Franziska Konrad durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 17. April 2018

# Danksagung

Ein ganz herzliches Dankeschön möchte ich an Dr. med. Franziska Konrad für ihre hervorragende Betreuung während der Durchführung meiner Versuche und der Anfertigung der Dissertationsschrift aussprechen. Des Weiteren möchte ich Irene Vollmer und Dr. med. Kristian Ngamsri herzlich danken, die mich in die Versuche eingearbeitet haben und bei jeder erdenklichen Frage mit Rat und Tat zur Seite standen. Ein besonderer Dank gilt auch Anika Müller, welche mich ebenfalls stets hilfreich und freundlich unterstützte.

Besonders Danken möchte ich außerdem Prof. Dr. med. Jörg Reutershan, welcher mir diese Doktorarbeit ermöglichte. Ein weiterer Dank gilt PD Dr. med. Andreas Straub, welcher mich als habilitierter Betreuer vor Ort bei meiner Doktorarbeit unterstützte.

Zum Schluss möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Abteilung Anästhesiologie im Zentrum für Medizinische Forschung in Tübingen bedanken. Auch hier fand man bei allen Fragen immer freundliche Hilfe.