

Aus der Klinik für Anästhesiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. K. Peter

**Modulation von polymorphkernigen Leukozyten  
durch das Adenosin A<sub>2A</sub>-Rezeptorsystem  
bei Patienten mit Sepsis**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Alwin Jürgen Hölzl

aus

München

2007

---

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. M. Thiel

Mitberichterstatter: Prof. Dr B. H. Belohradsky  
Priv. Doz. Dr. M. Angele

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. I. Kaufmann

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 25.01.2007

---

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>2</b>
<b>2</b>	<b>Fragestellung der Studie</b> .....	<b>11</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>12</b>
3.1	Gewinnung von Leukozyten und Plasma.....	13
3.2	Messung der spontanen und durch lösliche Stimuli induzierten H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Produktion.....	14
3.3	Messung der Adhärenz und Phagozytose von opsoniertem Zymosan durch PMNL und deren Phagozytose-assoziierte H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Produktion.....	17
3.4	Prinzipien der durchflusszytometrischen Messungen.....	21
3.5	Bestimmung der Plasmakonzentration von Adenosin.....	28
3.6	Statistik.....	29
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>30</b>
4.1	Patientencharakteristik.....	30
4.2	Einfluss von Adenosin auf die spontane und durch lösliche Stimuli induzierte H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Produktion.....	33
4.3	Einfluss von Adenosin auf die Adhärenz und Phagozytose von opsoniertem Zymosan sowie die assoziierte H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Produktion.....	38
4.4	Adenosinkonzentrationen <i>in vivo</i> .....	41
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>42</b>
5.1	Granulozytendysfunktion bei Sepsis.....	43
5.2	Selektive Modulation der Granulozytendysfunktion durch das Adenosin A <sub>2A</sub> -Rezeptorsystem.....	44
5.3	Klinische Bedeutung von Adenosin und dem A <sub>2A</sub> -Rezeptor.....	46
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>52</b>
<b>7</b>	<b>Vorveröffentlichte Teilaspekte der Dissertation</b> .....	<b>55</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>56</b>
<b>9</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>67</b>
<b>10</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>71</b>
<b>11</b>	<b>Lebenslauf</b> .....	<b>72</b>

## 1 EINLEITUNG

Trotz Fortschritten im Verständnis von Pathophysiologie und Therapie der Sepsis stellt dieses Krankheitsbild noch immer eine Bedrohung für den kritisch kranken Patienten dar. Die Inzidenz ist zunehmend. Derzeit haben etwa 2 von 100 Patienten bei Aufnahme in das Krankenhaus eine Sepsis (47). Die Prognose der Sepsis veränderte sich im Laufe der letzten Jahre eher negativ, und die Mortalität des Krankheitsbildes ist unverändert hoch. Sie beträgt bei einfacher Sepsis etwa 15%, bei Sepsis mit einfachem Organversagen ca. 34% und im septischem Schock bis zu 70% (23). Limitierend ist hierbei das Versagen lebenswichtiger Organe wie Lunge (18%), Niere (15%) und Kreislauf (7%). Hauptursache für eine Sepsis sind mit 42% Infektionen des Respirationstraktes, gefolgt von systemischen Entzündungen ohne Fokusbachweis, Infektionen des Urogenitaltrakts und des Abdomens (47). Ätiologisch dominieren sowohl grampositive (30–50%) als auch gramnegative Bakterien (37–39%) als Ursache für die Infektionen (23,47). Seltener werden Pilze als Auslöser identifiziert.

Die Therapie der Sepsis umfasst eine Reihe grundlegender Maßnahmen wie die Antibiotika- und Volumensubstitution, die Katecholaminapplikation, die Kompensation der respiratorischen Insuffizienz, den Ausgleich des erhöhten peripheren Sauerstoffbedarfs und die Korrektur des Säure-Basen-Haushalts (9). Viele Therapieansätze (z.B. Anti-TNF- $\alpha$ ) erwiesen sich in klinischen Studien nicht als eindeutiger Durchbruch. Die Ursachen dafür sind vielfältig. Häufig wird die Therapie auf einzelne Mediatoren beschränkt, die aber der komplexen Pathophysiologie der Sepsis nicht gerecht werden können. Es macht offensichtlich

wenig Sinn, aus dem von der Natur redundant angelegten Zytokinnetzwerk, einzelne Entzündungsmediatoren auszuschalten (1,5).

Vielversprechender erscheint daher die pharmakologische Modulation der Zellart zu sein, die in der Pathogenese der Sepsis und ihrer Organschäden eine wichtige Rolle spielt und in der Entzündungsbahn weiter distal lokalisiert ist, die polymorphkernigen Leukozyten (PMNL) (22,40,61).

Häufigste Auslöser einer Sepsis sind die Endo- und Exotoxine gramnegativer und -positiver Bakterien, die für PMNL potente Stimuli sind. Durch die zusätzliche Interaktion der bakteriellen Toxine mit körpereigenen humoralen (z.B. Komplementsystem, die Produkte des Arachidonsäuremetabolismus) und zellulären (z.B. Monozyten, Mastzellen) Mediatorsystemen kommt es zu deren Aktivierung und Freisetzung von Botenstoffen (z.B. Zytokine) mit pro- als auch anti-inflammatorischen Wirkungen.

PMNL besitzen für viele, der aus diesen Systemen freigesetzten Produkte spezifische Rezeptoren. Sie unterliegen dabei einer Stimulus-Antwort-Reaktion, die normalerweise dem Auffinden von Mikroorganismen durch Chemotaxis, ihrer intrazellulären Aufnahme durch Adhärenz und Phagozytose sowie der Abtötung durch Sauerstoffradikale und Proteasen dient. Das für die Produktion von Superoxidanionen verantwortliche Enzymsystem, die Nicotinsäureamid-Adenosin-Dinucleotid-Phosphat (NADPH)-Oxidase, ist mit ihrem aktiven Zentrum in der Plasmamembran eigentlich nach außen orientiert. Bei der Phagozytose werden die Mikroorganismen mit der Zellmembran des Phagozyten umflossen und in das Phagosom eingeschlossen. Dabei kommt es zur Einstülpung der Zellmembran und damit zu deren Inversion, d.h. die Außenseite wird zur Innenseite des Phagosoms. Dies stellt sicher, dass die von der NADPH-Oxidase

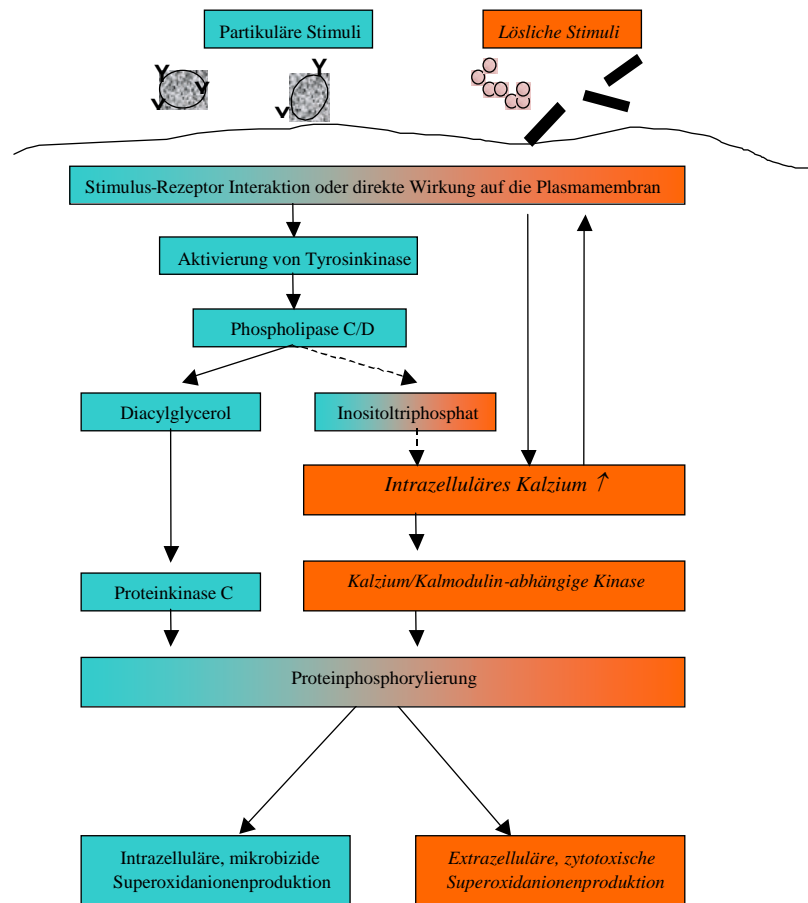
gebildeten Superoxidanionen (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) direkt in das Phagosom sezerniert werden, um die darin aufgenommenen Bakterien möglichst wirksam abzutöten (19,51).

Unter physiologischen Bedingungen wird die Kontaktaufnahme der PMNL mit eingedrungenen Bakterien durch Opsonine (Produkte des Komplementsystems, Immunglobuline) erheblich verstärkt.

In der Sepsis reagieren die PMNL jedoch überschüssend mit nachteiligen Reaktionen. Lösliche Stimuli, wie bakterielle Toxine und Komplementanaphylatoxine, führen dann zu einer Stimulation der NADPH-Oxidase auf der gesamten Zellmembran der PMNL mit der Folge einer Freisetzung reagibler Superoxidanionen in den extrazellulären Raum (10). PMNL, die verstärkt an das Gefäßendothel adhären, setzen dort ihre toxischen Produkte (Superoxidanionen, kationische Proteine, Enzyme) frei und führen so zu einer Schädigung der mikrovaskulären Strombahn mit verminderter Gewebepfusion. Die Folgen sind die Beeinträchtigung der Funktionen vitaler Organsysteme und die graduelle Zunahme von Multiorgandysfunktionen, welche zum letalen Multiorganversagen (MOV) führen können (2,7,9,10,17,28,30,64).

Der Fähigkeit polymorphkerniger Leukozyten, zu adhären und NADPH-Oxidase-abhängig reagible Superoxidanionen zu produzieren, kommt damit eine ambivalente Rolle zu. Einerseits ist die Adhäsion an opsonierte Bakterien eine wichtige Voraussetzung für deren Phagozytose und Abtötung durch die vorwiegend intrazellulär ablaufende Produktion von mikrobiziden Sauerstoffspezies, andererseits bewirkt die Adhäsion an das Gefäßendothel und die nachfolgende Aktivierung mit löslichen Stimuli eine überwiegend extrazelluläre Freisetzung von reagiblen und damit potentiell zytotoxischen Superoxidanionen.

Aber partikuläre und lösliche Stimuli unterscheiden sich nicht nur im Hinblick auf den Ort der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies, sondern auch bezüglich der an der Aktivierung beteiligten intrazellulären Signalwege (Abb. 1).



**Abbildung 1:**  
Intrazelluläre Signalwege von PMNL bei Aktivierung durch partikuläre oder lösliche Stimuli:

**Partikuläre Stimuli:**

Rezeptorabhängige Aktivierung der Tyrosinkinase und nachfolgend der Phospholipase, über die Bildung von Diacylglycerol Aktivierung der Proteinkinase C sowie via Inositoltriphosphat Aktivierung des kalziumabhängigen Weges mit Proteinphosphorylierung und Erhöhung der intrazellulären, mikrobiziden Superoxidanionenproduktion

**Lösliche Stimuli:**

Rezeptorabhängige sowie –unabhängige Aktivierung der Kalzium/Kalmodulinabhängigen Kinase mit Proteinphosphorylierung und Erhöhung der extrazellulären, zytotoxischen Superoxidanionenproduktion

Wünschenswert für die Behandlung der Sepsis wären daher Pharmaka, welche in der Lage sind, im Sinne einer Differentialtherapie die unerwünschte extrazelluläre Freisetzung von zytotoxischen Superoxidanionen zu reduzieren, ohne den mit der Phagozytose assoziierten, mikrobizid wirkenden oxidativen Burst zu hemmen.

Vielversprechend in dieser Hinsicht ist Adenosin, ein im Organismus physiologisch vorkommendes Nukleosid, für das die PMNL Rezeptoren besitzen (13,31,45).

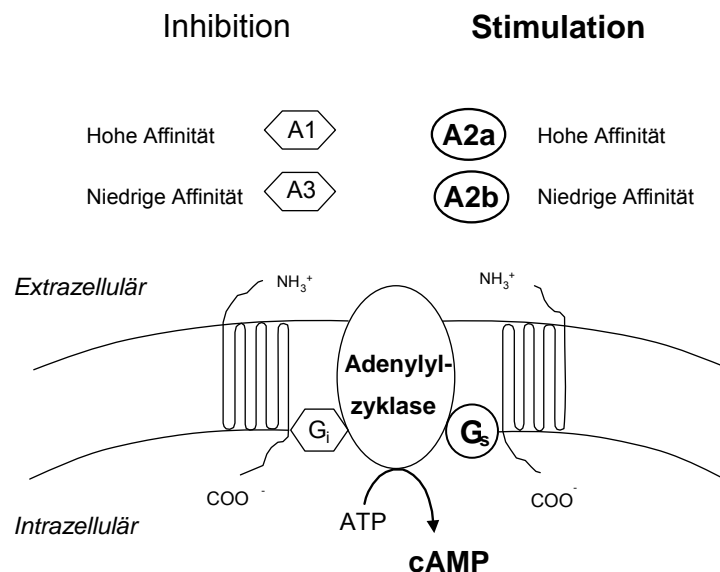
Darüber hinaus ist in der Sepsis die Bildung von Adenosin erhöht. Bei der Sepsis kommt es durch Störungen der Mikrozirkulation zur Ausbildung eines Missverhältnisses zwischen Sauerstoffangebot und -bedarf mit der Folge des Abbaus energiereicher Phosphate ( $ATP \rightarrow ADP \rightarrow AMP$ ) durch endo- und ecto-5'-Nukleotidasen und der vermehrten Bildung von Adenosin.

Eine zweite Molekülart, aus welcher Adenosin gebildet werden kann, ist S-Adenosylhomocystein, ein Produkt der Transmethylierung des Substrates S-Adenosylmethionin. Aus diesem Speicher kann Adenosin durch enzymatischen Abbau mittels S-Adenosylhomocysteinhydrolase entstehen. Unter anaeroben bzw. pathologischen Bedingungen tritt dieser Weg der Adenosinbildung jedoch in den Hintergrund.

Endogenes Adenosin kann unter ischämischen Bedingungen hohe Konzentrationen erreichen (31,48,58). Dieses wird dann mittels Adenosin-desaminase zu Inosin und Hypoxanthin abgebaut. Während für Inosin und Hypoxanthin keine spezifischen Rezeptoren bekannt sind, werden die Rezeptoren für Adenosin im Organismus ubiquitär exprimiert (3,31,45).



Prinzipiell werden 2 verschiedene Gruppen von purinergen Rezeptoren unterschieden: P<sub>1</sub>- und P<sub>2</sub>-Rezeptoren. Adenosin weist eine höhere Affinität für P<sub>1</sub>-Rezeptoren auf, während ATP bevorzugt an P<sub>2</sub>-Rezeptoren bindet. Die P<sub>1</sub>-Adenosinrezeptoren lassen sich in 4 weitere Subgruppen unterteilen: A<sub>1</sub>-, A<sub>2A</sub>-, A<sub>2B</sub> und A<sub>3</sub>-Rezeptoren (31,37). Es handelt sich um G-Protein gekoppelte Rezeptoren (20) mit 7 Transmembrandomänen (Abb. 2).



**Abbildung 2: Einteilung von Adenosinrezeptoren mit funktioneller Kopplung an die Adenylylzyklase.**

Über GTP-bindende Proteine sind die Adenosinrezeptoren funktionell an die Adenylylzyklase gekoppelt. Die zytoplasmatischen Domänen enthalten potentielle Phosphorylierungsstellen sowie Regionen, die möglicherweise mit den  $\alpha$ -Einheiten membranaler G-Proteine interagieren. Die Adenylylzyklase katalysiert die Abspaltung von Pyrophosphat aus ATP unter Bildung von zyklischem AMP (cAMP), das als intrazellulärer Botenstoff („second messenger“) die Funktionen von Zellen modulieren kann. Bevor die DNA-Sequenzen der

Rezeptoren Anfang der 90er Jahre an Säugetieren und Menschen aufgeklärt wurden, erfolgte die pharmakologische Charakterisierung der Adenosinrezeptorsubtypen anhand der Potenz verschiedener Agonisten, die Adenylylzyklase zu aktivieren bzw. zu hemmen (21,37).

Prinzipiell werden inhibitorisch (A<sub>1</sub>/A<sub>3</sub>) und stimulatorisch (A<sub>2A</sub>/A<sub>2B</sub>) auf die Adenylylzyklase wirkende Rezeptoren mit hoher (A<sub>1</sub>/A<sub>2A</sub>) und niedriger (A<sub>2B</sub>/A<sub>3</sub>) Bindungsaffinität für Adenosin unterschieden. Einen Überblick über die Charakterisierung der Adenosinrezeptoren anhand der Bindungsaffinitäten und der daraus resultierenden Rangordnung der Potenz von Adenosinrezeptoragonisten sowie der G-Protein-vermittelten Kopplung an unterschiedliche Second-Messenger Systeme gibt die Tab. 1.

Auf humanen polymorphkernigen Leukozyten wurden funktionell sowie auf der Ebene der Protein- und mRNA-Expression A<sub>1</sub>-, A<sub>2A</sub>- A<sub>2B</sub>- und A<sub>3</sub>-Rezeptoren nachgewiesen.

Erste Hinweise auf einen potentiell protektiven Effekt von Adenosin in der Inflammation gab es bereits vor über 20 Jahren. Cronstein et al. (1983) zeigten, dass die Superoxidanionenproduktion aktivierter humaner PMNL durch endogenes und exogenes Adenosin gehemmt werden kann, ohne die Aggregation der PMNL oder die Freisetzung mikrobiziden Lysozyms zu beeinflussen (12). Damit wurde Adenosin als eine Substanz identifiziert, die in der Lage ist, oxidativen Stress durch neutrophile Granulozyten über einen membranständigen Rezeptor zu hemmen (20,31). Diese Ergebnisse wurden in weiteren Untersuchungen im Hinblick auf eine Schutzfunktion für Endothelzellen durch Hemmung aktivierter PMNL mit Adenosin bestätigt. So reduzierte der unspezifische Agonist 2-Chloroadenosin nicht nur die Adhärenz der PMNL am

Endothel um 60%, sondern verminderte auch deren zytotoxische Effekte um 52% (13).

**Tabelle 1: Adenosinrezeptoren und ihre pharmakologische Klassifikation**

Adenosin-rezeptor	Agonisten	Antagonisten	G-Protein	Second Messenger
<b>A<sub>1</sub></b>	CCPA (K <sub>i</sub> =0,2nM) CPA (K <sub>i</sub> = 0,6 nM) CHA (K <sub>i</sub> = 1,3 nM) R-PIA (K <sub>i</sub> = 1,2 nM) NECA (K <sub>i</sub> = 6,3 nM) 2-CI-ADO (K <sub>i</sub> = 9,3 nM) S-PIA (K <sub>i</sub> = 49,3 nM) CV1808 (K <sub>i</sub> =561 nM) CGS21680 (K <sub>i</sub> =2600nM)	1,3-dipropyl-8-cyclopentylxanthin/DPCPX (K <sub>i</sub> [human]: 2 nM) PD115199 8PT CGS15943 (IC <sub>50</sub> =20nM) Triazoloquinoxaline CP66713 (IC <sub>50</sub> = 270 nM)	G <sub>i</sub>	↓ cAMP ↑ IP <sub>3</sub> /DAG (PLC) ↑ Arachidonate (PLA <sub>2</sub> ) ↑ Choline (PLD)
<b>"Rank Order of Potency":</b> CCPA > CPA > CHA > R-PIA > NECA > 2-CI-ADO > S-PIA > CGS21680				
<b>A<sub>2A</sub></b>	CGS21680(K <sub>i</sub> =10nM) NECA (K <sub>i</sub> = 15 nM) 2-CI-ADO (K <sub>i</sub> = 62 nM) CV1808 (K <sub>i</sub> = 119 nM) R-PIA (K <sub>i</sub> = 124 nM) CPA (K <sub>i</sub> = 462 nM) CHA (K <sub>i</sub> = 514 nM) S-PIA (K <sub>i</sub> = 1820) PAPA-APEC CPCA	PD115199 DPCPX (K <sub>i</sub> [human]: 156 nM) 8PT <b>Unselektive A<sub>2</sub>-Antagonisten:</b> CGS15943(IC <sub>50</sub> = 3 nM) Triazoloquinoxaline CP66713 (IC <sub>50</sub> = 21 nM) <b>andere:</b> 8-styrylsubstituierte 1,3,7-Alkylxanthine	G <sub>s</sub>  G <sub>olf</sub>  G <sub>15/16</sub>	↑ cAMP  ↑ cAMP  ↑ IP <sub>3</sub>
<b>"Rank Order of Potency":</b> CGS21680 > NECA > 2-CI-ADO > R-PIA > CHA > CPA > S-PIA				
<b>A<sub>2B</sub></b>	NECA 2-CI-ADO R-PIA CHA S-PIA CV1808 CGS21680	DPCPX (K <sub>i</sub> [human]: 40 nM <sup>(28.a)</sup> ) 8PT PD115199 <b>Unselektive A<sub>2</sub>-Antagonisten:</b> CGS15943(IC <sub>50</sub> = 3 nM) Triazoloquinoxaline CP66713 (IC <sub>50</sub> = 21 nM)	G <sub>s</sub>  G <sub>q/11</sub>	↑ cAMP  ↑ IP <sub>3</sub> /DAG (PLC)
<b>"Rank Order of Potency":</b> NECA > 2-CI-ADO > R-PIA = CHA = CPA > S-PIA >> CGS21680				
<b>A<sub>3</sub></b>	APNEA R-PIA NECA CGS21680 andere: S-PIA AB-MECA	MRE3005F20 (K <sub>i</sub> [human] = 0,28 nM) MRE3008F20 (K <sub>i</sub> [human] = 0,29 nM) MRS1220 MRE3008F20 (K <sub>i</sub> [human] = 0,65 nM) MRE3008F20 (K <sub>i</sub> [human] = 0,85 nM) CGS15943 (K <sub>i</sub> [human] = 14 nM)	G <sub>12,3</sub>  G <sub>q/11</sub>	↓ cAMP  ↑ IP <sub>3</sub> /DAG (PLC)
<b>"Rank Order of Potency":</b> APNEA > R-PIA = NECA >> CCPA > S-PIA > CGS-21680				

Die Hemmeffekte von Adenosin auf die extrazelluläre Freisetzung von Superoxidanionen aus humanen PMNL beruhen wahrscheinlich auf einer Aktivierung von A<sub>2A</sub>-Rezeptoren (48,52). Durch Stimulation der Adenylylzyklase kommt es dabei zu einem Anstieg der intrazellulären Konzentration von zyklischem AMP („second messenger“) mit Hemmung der NADPH-Oxidase (20). Eine Aktivierung immunsuppressiver A<sub>2A</sub>-Rezeptoren wurde ferner als Ursache für den Hemmeffekt von Adenosin auf andere potenziell zytotoxische Reaktionen humaner PMNL identifiziert, wie die Expression von Adhäsionsmolekülen aus der Familie der  $\beta_2$ -Integrine, die Degranulation, und die TNF- $\alpha$ -Produktion (20,49,54,59,60).

Da die selektive Beeinflussung der unerwünschten Freisetzung von gewebe-schädigenden Superoxidanionen ohne weitere Reduktion mikrobizider Funktionen von humanen PMNL - insbesondere bei Patienten mit Sepsis - potenziell von großer klinischer Relevanz ist, haben wir uns in der vorliegenden Arbeit folgenden Fragen zugewandt.

## 2 FRAGESTELLUNG DER STUDIE

Aus den in der Einleitung geschilderten Mechanismen der Veränderung der Funktionen von PMNL in der Sepsis einerseits und der prinzipiell vermehrten Adenosinfreisetzung in der Inflammation andererseits, ergeben sich folgende, im Rahmen dieser Arbeit zu klärende Fragen:

1. Welchen Effekt hat Adenosin in aufsteigenden Konzentrationen auf humane PMNL und ihre potenziell zytotoxisch wirksame Produktion von Superoxidanionen? Ist dieser Effekt von Adenosin bei gesunden Probanden und Patienten mit Sepsis unterschiedlich stark ausgeprägt? Ergeben sich aus der Analyse der Dosis-Wirkungskurven von Adenosin auf die Superoxidanionenproduktion der PMNL Unterschiede in der halbmaximalen inhibitorisch wirksamen Konzentration IC<sub>50</sub> für Gesunde und Patienten mit Sepsis?
2. Welchen Einfluss hat Adenosin auf die potenziell mikrobizide Fähigkeit von PMNL zur Adhärenz und Phagozytose von Zymosan und die damit assoziierte Superoxidanionenproduktion?
3. Welcher Adenosinrezeptortyp ist für die beobachteten Effekte verantwortlich?
4. Steigen die Plasmakonzentrationen von Adenosin bei Patienten mit Sepsis an?
5. Sind die bei Patienten mit Sepsis gemessenen Plasmaadenosinkonzentrationen ausreichend, die potenziell zytotoxischen PMNL-Funktionen zu hemmen?

### 3 MATERIAL UND METHODEN

In diese prospektiv klinische Studie zur Untersuchung der Effekte von Adenosin auf die PMNL wurden insgesamt 50 gesunde Probanden (Kontrollgruppe), 15 Patienten mit einfacher Sepsis und 33 Patienten mit einem septischen Schock eingeschlossen. Die Diagnose einer Sepsis bzw. eines septischen Schocks wurde anhand der Kriterien der *American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference (ACCP/SCCM)* gestellt (8). Zur Diagnose einer einfachen Sepsis mussten entsprechend der Definition der Konsensuskonferenz mindestens zwei der folgenden Parameter erfüllt sein und ein Infektionsnachweis erfolgen:

- Temperatur: > 39°C oder < 36°C
- HF > 90 / min.
- Tachypnoe: > 20/min. oder p<sub>CO2</sub> < 32 mmHg
- Leukozytenzahl: > 12.000 oder < 4.000/mm<sup>3</sup>

Ein septischer Schock wurde diagnostiziert, wenn trotz adäquater Volumensubstitution eine arterielle Hypotension vorlag und den Einsatz von Katecholaminen (Noradrenalin oder Adrenalin) mit einer Dosierung von mehr als 0,4 mg/h erforderlich machte.

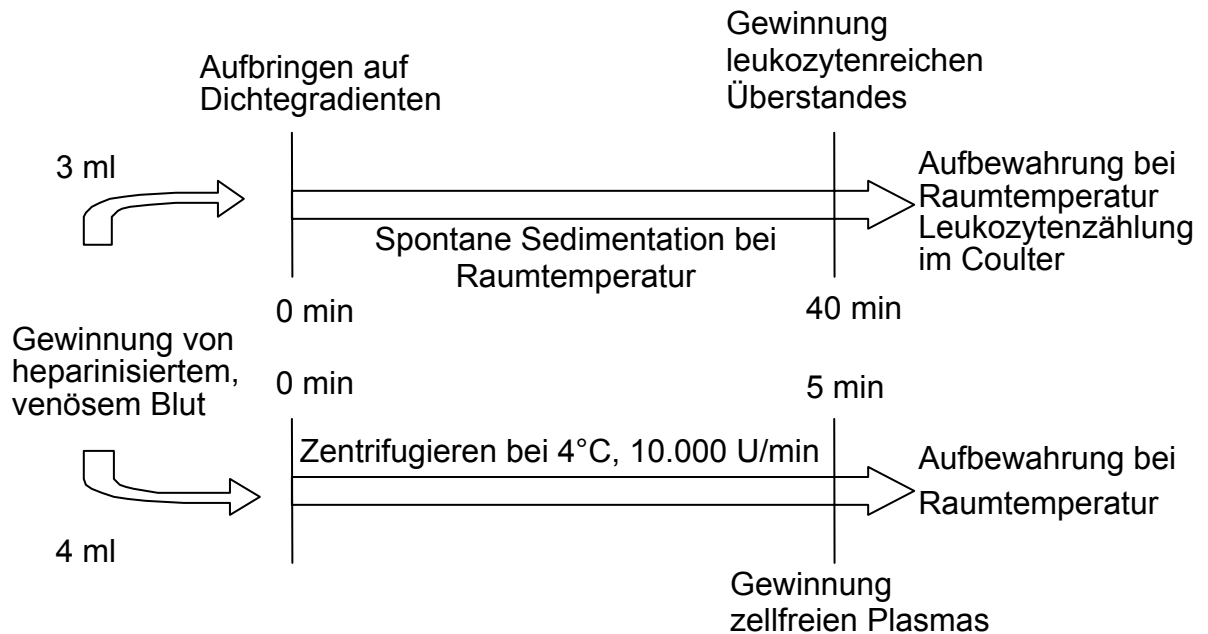
Die Untersuchungen an polymorphkernigen Leukozyten des peripheren Blutes wurden innerhalb von 24 – 48 Stunden nach Diagnosestellung durchgeführt.

Patienten, die jünger als 18 oder älter als 88 Jahre waren, eine Medikation mit immunsuppressiver Wirkung (Prostaglandine, Steroide etc.) erhielten oder an einer chronisch konsumierenden Erkrankung (Tumorstadium IV, Colitis ulcerosa, M. Crohn) litten, wurden von der Studie ausgeschlossen. Ferner wurden jene Patienten, die mit einer Blutabnahme zu Studienzwecken nicht einverstanden waren, nicht in die Studie aufgenommen. Im Falle nicht geschäftsfähiger Patienten wurde der vom Vormundschaftsgericht bestellte Betreuer um die Einwilligung gebeten oder die nächsten Angehörigen um ihr Einverständnis zur Teilnahme des Patienten an der Studie ersucht. Die ethische Unbedenklichkeit der Studie wurde von der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München bescheinigt.

### **3.1 GEWINNUNG VON LEUKOZYTEN UND PLASMA**

Gesunden Probanden und septischen Patienten wurden jeweils 7 ml Blut entnommen und mit Heparin (Endkonzentration: 10 IE/ml) antikoaguliert.

3 ml des heparinisierten Blutes wurden über ein identisches Volumen Ficoll-Histopaque Medium (Dichte 1077 g/l) geschichtet und einem vierzigminütigen Sedimentationsvorgang unterzogen. Danach wurden 800 µl des im Überstand verbliebenen leukozytenreichen Plasmas abgehoben. Die Zellkonzentration wurde mit einem Coulter Counter Multisizer bestimmt und die Leukozyten bei Raumtemperatur (RT) aufbewahrt. Zur Gewinnung von Plasma wurden 4 ml heparinisiertes Blut 5 min bei 10.000 U/min zentrifugiert (Abb. 3).



**Abbildung 3: Schema der Leukozyten- und Plasmagewinnung durch Absedimentieren und Abzentrifugieren von Vollblut**

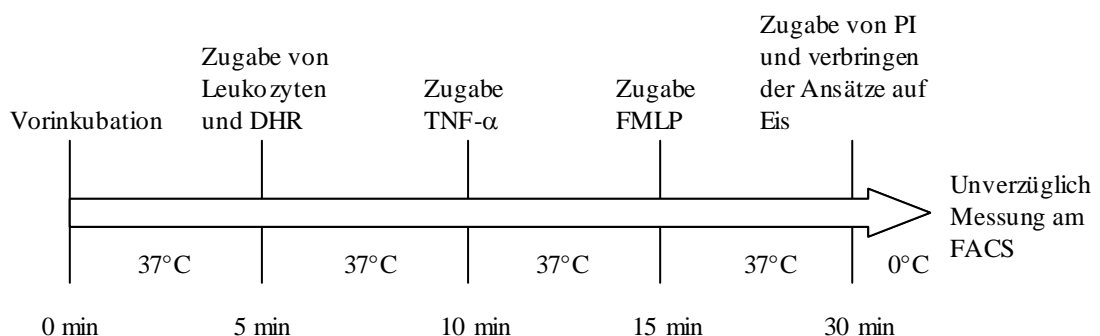
### 3.2 MESSUNG DER SPONTANEN UND DURCH LÖSLICHE STIMULI INDUZIERTEN H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-PRODUKTION

Als Maß für die Fähigkeit polymorphkerniger Leukozyten, potenziell gewebschädigende Sauerstoffspezies zu bilden, wurde die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion von PMNL unter verschiedenen Inkubationsbedingungen – auf der Basis der Methode von Rothe et al. (46) - bestimmt. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stellt das unmittelbare Reaktionsprodukt gebildeter Superoxidanionen durch deren spontane Dismutation dar. Das gebildete H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kann in einer Reaktion mit Dihydrorhodamin (DHR123) unter oxidativer Bildung von fluoreszierendem Rhodamin mit der Durchflusszytometrie quantitativ erfasst werden (siehe auch Abschnitt 3.4).



- Die Inkubation der Zellen ohne Stimulation sollte zunächst Auskunft über die spontane H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Bildung geben.
- Für die Erfassung der Kapazität der Zellen, auf inflammatorische Stimuli H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu produzieren, wurden die Zellen mit TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) vorinkubiert und nachfolgend mit fMLP (10<sup>-7</sup>M) aktiviert.
- Für die Erstellung der Dosis-Wirkungs-Kurven von nativem Adenosin auf die durch lösliche Stimuli induzierte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion wurden die Leukozyten mit Adenosin in aufsteigenden Konzentrationen von 10<sup>-11</sup>M bis 10<sup>-5</sup>M inkubiert, um dann mit TNF- $\alpha$ /fMLP zur Produktion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> angeregt zu werden.
- Zur Erfassung der Wirkung des Adenosin-A<sub>2A</sub>-Rezeptors auf die TNF -  $\alpha$ /fMLP-induzierte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion wurde zusätzlich dessen Agonist CGS21680 (10<sup>-5</sup>M) mit PMNL inkubiert. Als A<sub>1</sub>-Rezeptor-Agonist wurde CCPA (10<sup>-10</sup>M) verwendet (Tab. 2).

Abb. 4 gibt einen Überblick des zeitlichen Ablaufs der Inkubationsschritte:



**Abbildung 4:** Schematischer Ablauf der Inkubationsschritte für die Bestimmung der durch lösliche Stimuli induzierten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion. Wird auf die Zugabe der Stimuli verzichtet, ergibt sich die spontane H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktionsrate.

In Tab. 2 ist das Versuchsprotokoll in detaillierter Form dargestellt.

Versuchsablauf (entsprechend Abb. 3 und 4; Tab. 2 und 3):

Zunächst wurden je 1 ml HBSS Lösung (bestehend aus HBSS-Trockenpulver [pH = 7,40; ohne Phenolrot], 5 ml Hepeslösung [2 M], 1 Liter Aqua dest. + 2 ml Natronlauge NaOH [2 M]) in 10 ml Polypropylenröhrchen auf 37°C erwärmt. Sieben Ansätze wurden zusätzlich mit einer aufsteigenden Konzentration von Adenosin 10<sup>-11</sup>M bis 10<sup>-5</sup>M versehen. Zwei weitere enthielten CCPA (10<sup>-10</sup>M) und CGS21680 (10<sup>-5</sup>M). Ein Versuchsansatz diente als Kontrolle. Nach der Präparation von leukozytenreichen Plasma mit der Ficoll-Histopaque-Methode (siehe Abschnitt 3.1) wurde dieses (20 µl je Versuchsansatz) in die Polypropylenröhrchen überführt. Danach wurde TNF-α (Endkonzentration: 10 ng/ml) zugesetzt, und nach weiteren 5 min erfolgte die Stimulation mit fMLP (Endkonzentration: 10<sup>-7</sup>M) über einen Zeitraum von 15 min. Nach Zugabe von PI (Endkonzentration: 3 µmol/l) wurden die Proben auf Eis gegeben und unverzüglich im FACS (Tab. 5) gemessen.

**Tabelle 2: Bestimmung der spontanen und durch lösliche Stimuli induzierten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Produktion humaner PMNL ohne / mit Adenosin, CCPA, CGS21680**

Zeit (min.)	T(°C)	Kontrolle	+ TNF-α + fMLP ± Adenosin	+ TNF-α + fMLP ± CGS21680 oder CCPA
-10	37	1ml HBSS	1ml HBSS ± ADO 10 <sup>-5</sup> -10 <sup>-11</sup> M	1ml HBSS ± CCPA 10 <sup>-10</sup> M/ CGS21680 10 <sup>-5</sup> M
0	37	+ 20µl Leukozyten + 10 µl DHR 1,1 x 10 <sup>-3</sup> M	+ 20µl Leukozyten + 10 µl DHR 1,1 x 10 <sup>-3</sup> M	+ 20µl Leukozyten + 10 µl DHR 1,1 x 10 <sup>-3</sup> M
5	37		+ 10 µl 1x10 <sup>-3</sup> g/ml TNF-α	+ 10 µl 1 x 10 <sup>-3</sup> g/ml TNF-α
10	37		+ 10 µl 1x10 <sup>-5</sup> M fMLP	+ 10 µl 1x 10 <sup>-5</sup> M fMLP
25	4	auf Eis + PI (Endkonz.: 3 µM)	auf Eis + PI (Endkonz.: 3 µM)	auf Eis + PI (Endkonz.: 3 µM)

### **3.3 MESSUNG DER ADHÄRENZ UND PHAGOZYTOSE VON OPSONIERTEM ZYMOCHAN DURCH PMNL UND DEREN PHAGOZYTOSE-ASSOZIIERTE H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-PRODUKTION**

In unseren Untersuchungen wurden die Adhärenz, die Phagozytose und die mit der Phagozytose assoziierte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion polymorphkerniger Leukozyten in Reaktion auf opsoniertes Zymosan als partikulären Stimulus gemessen.

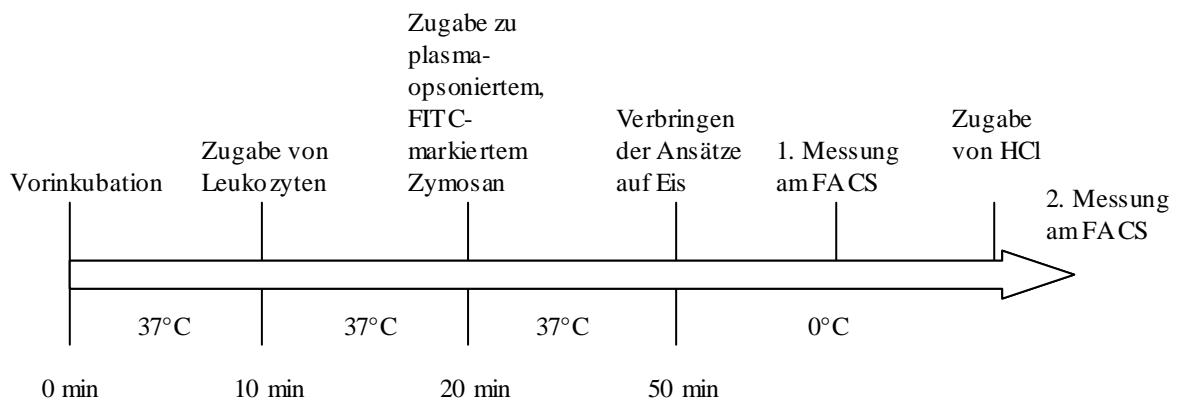
Für die Herstellung einer Zymosansuspension wurden die Hefepartikel 10 min in NaCl 0.9 % gekocht, gewaschen und dann in phosphatgepufferter Krebs-Ringer-Lösung/KRP (pH = 7,4; CaCl<sub>2</sub> [0,5 mmol/l]; Glukose [5 mmol/l]) suspendiert.

Die Opsonierung erfolgte durch dreißigminütige Inkubation der Zymosanpartikel in 100 % humanem, autologem Plasma bei 37°C, anschließendem Zentrifugieren und Waschen in 4°C kalter HBSS-Lösung. Der Plasmaüberstand wurde abpipettiert und verworfen.

#### **A. ADHÄRENZ UND PHAGOZYTOSE VON OPSONIERTEM ZYMOCHAN DURCH PMNL**

In den Untersuchungen zur Bestimmung der Adhärenz und Phagozytose wurden Zymosanpartikel verwendet, die vor ihrer Opsonierung mit FITC kovalent markiert wurden. Die FITC-Markierung des Zymosan erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers (FLUOS, Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland).

Abb. 5 gibt einen Überblick des zeitlichen Ablaufs der Inkubationsschritte für die Bestimmung der Adhärenz und Phagozytose von plasmaopsonierten Zymosanpartikel durch humane PMNL.



**Abbildung 5: Schematisches Messprotokoll zur Bestimmung der Adhärenz und Phagozytose FITC-positiver Zymosanpartikel durch PMNL.**

In Tab. 3 ist das dazugehörige Versuchsprotokoll in detaillierter Form dargestellt.

Versuchsablauf (Abb. 5; Tab. 3 und 6):

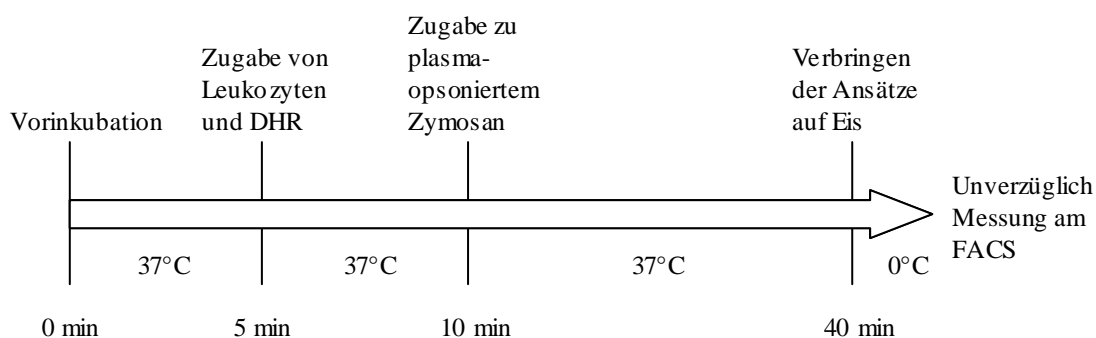
Im Versuch wurden in einem Ansatz 0,5 ml HBSS in Polypropylenröhrchen auf 37°C angewärmt, 10 µl leukozytenreiches Plasma zugegeben und für 10 min vorinkubiert. Anschließend wurde dieser Versuchsansatz mit FITC-markiertem, plasmaopsoniertem Zymosan (Zymosan/Leukozyten-Quotient: 1/10) aus einem zweiten Ansatz versetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Hierbei betrug das Verhältnis von Zymosanpartikeln zu Leukozyten 10:1. Nach dem Zeitraum von 30 min wurden die Proben auf Eis gegeben und die Prozentsätze FITC-positiver Granulozyten unverzüglich im FACS (Tab. 6) gemessen.

**Tabelle 3: Bestimmung der Adhärenz und Phagozytose von opsoniertem Zymosan durch humane PMNL**

Zeit (min)	T(°C)	
-45	37	0,5 ml autologes Plasma + FITC markiertes Zymosan in Messgefäß 1
-10	4	2x waschen mit HBSS und zentrifugieren bei 3000 U/min für 5 min, dann Überstand absaugen
-10	37	Vorinkubation von 0,5 ml HBSS in Messgefäß 2
0	37	Zugabe von 10 µl Leukozyten
10	37	0,5 ml HBSS und Leukozyten in Messgefäß 2 zu Pellet in Messgefäß 1. Vortexen.
40	4	Verbringung auf Eis
	4	FACS-Messung ± 10 µl 1 M HCl

## B. PHAGOZYTOSE-ASSOZIIERTE H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-PRODUKTION DURCH PMNL

Die mit der Phagozytose von opsonierten Zymosanpartikeln einhergehende H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion durch PMNL wurde entsprechend dem folgenden Messprotokoll (Abb. 6) ermittelt.



**Abbildung 6: Schematisches Meßprotokoll für die Bestimmung der durch Phagozytose von Zymosan ausgelösten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Produktion**

In Tab. 4 ist das dazugehörige Versuchsprotokoll in detaillierter Form dargestellt.

Versuchsablauf (Abb. 6; Tab. 4 und 5):

10 µl leukozytenreiches Plasma und DHR123 (Endkonzentration: 10<sup>-6</sup>M) wurden zu 0,5 ml 37°C warmer HBSS-Lösung in 10 ml-Polypropylenröhrchen für 10 min vorinkubiert. Anschließend wurde dieser Versuchsansatz mit nicht-markiertem, plasmaopsoniertem Zymosan aus einem zweiten Ansatz versetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Dabei betrug das Verhältnis von Zymosanpartikeln zu Leukozyten 10:1. Nach diesem Zeitraum wurden die Proben auf Eis gegeben und die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Produktion unverzüglich im FACS (Tab. 6) gemessen.

Für die Untersuchung der Effekte von nativem Adenosin (10<sup>-5</sup>M), CCPA (10<sup>-10</sup>M) als einem A<sub>1</sub>-Adenosinrezeptoragonist und CGS21680 (10<sup>-5</sup>M) als A<sub>2A</sub>-Adenosinrezeptoragonist auf die Phagozytose-assoziierte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion wurde das oben beschriebene Modell verwendet. Danach wurden die Ansätze auf Eis verbracht und umgehend bei 4°C im FACS unter den in Tab. 5 angegebenen Einstellungen gemessen.

**Tabelle 4: Bestimmung der durch opsoniertes Zymosan-induzierten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Produktion humaner PMNL ohne / mit Adenosin, CCPA, CGS21680**

Zeit (min)	T(°C)	
-45	37	0,5 ml Plasma + unmarkiertes Zymosan in Messgefäß 1
-10	4	2x waschen mit HBSS und zentrifugieren bei 3000 U/min für 5 min, dann Überstand absaugen
-10	37	Vorinkubation von 0,5 ml HBSS in Messgefäß 2
0	37	Zugabe von 10 µl Leukozyten+ DHR 10 <sup>-6</sup> M ± 5 µl ADO 10 <sup>-3</sup> M / CCPA 10 <sup>-8</sup> M / CGS 21680 10 <sup>-3</sup> M
10	37	0,5 ml HBSS, DHR und Leukozyten in Messgefäß 2 zu Pellet in Messgefäß 1.
40	4	Verbringung auf Eis

### 3.4 PRINZIPIEN DER DURCHFLUSSZYTOMETRISCHEN MESSUNGEN

#### I. SPONTANE UND DURCH LÖSLICHE STIMULI INDUZIERTES H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-PRODUKTION

Für die Quantifizierung der Bildung reagibler Superoxidanionen diene die Messung ihres spontanen Dismutationsproduktes Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Das Prinzip dieser Methode wurde von Rothe und Valet entwickelt und als Standardverfahren publiziert (46).

Der Nachweis des nach Stimulation der NADPH-Oxidase abhängig gebildeten Wasserstoffperoxids beruht auf der Oxidation von nicht-fluoreszierendem, zellmembranpermeablem DHR123 zu fluoreszierendem Rhodamin (Abb. 7). Rhodamin ist einfach positiv geladen und akkumuliert deshalb in der Zelle. Die durchflusszytometrische Bestimmung seiner Fluoreszenzintensität ist der Konzentration des Farbstoffes und damit der Größe der abgelaufenen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion direkt proportional.

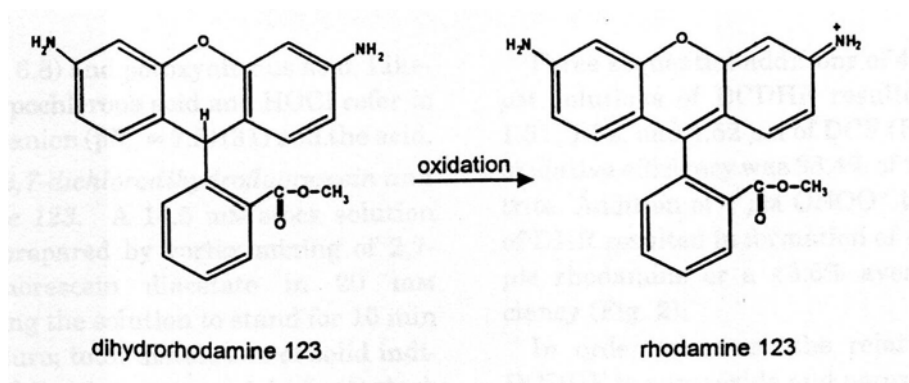


Abbildung 7: Oxidation von Dihydrorhodamin 123 zu Rhodamin 123 (16).

Bei der durchflusszytometrischen Untersuchung basiert die Identifikation der verschiedenen Populationen weißer Blutzellen auf ihren unterschiedlichen Vorwärts (FSC)- und Seitwärts (SSC)-Streulichteigenschaften, die auf Unterschieden der Leukozytenpopulationen, wie der Größe und intrazellulären Granulationen, beruhen (46).

Rhodamin123-gefärbte Granulozyten emittieren nach Anregung mit einem 488 nm-Argonlaser (5mW) grünes Licht ( $\lambda \sim 510-530$  nm). Tote Zellen können mit PI angefärbt werden, da diese Zellen eine erhöhte Permeabilität ihrer Membran für diesen Kernfarbstoff aufweisen. PI emittiert nach Anregung mit dem Argonlaser rotes Licht ( $\lambda > 600$  nm). Die Grünfluoreszenz wird auf dem Fluoreszenzkanal FL-1 und die Rotfluoreszenz auf dem Fluoreszenzkanal FL-3 mit dem Durchflußzytometer gemessen.

Repräsentative Dot-Plot-Scatter Diagramme der TNF- $\alpha$ /fMLP-stimulierten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion sind in Abb. 8 dargestellt.



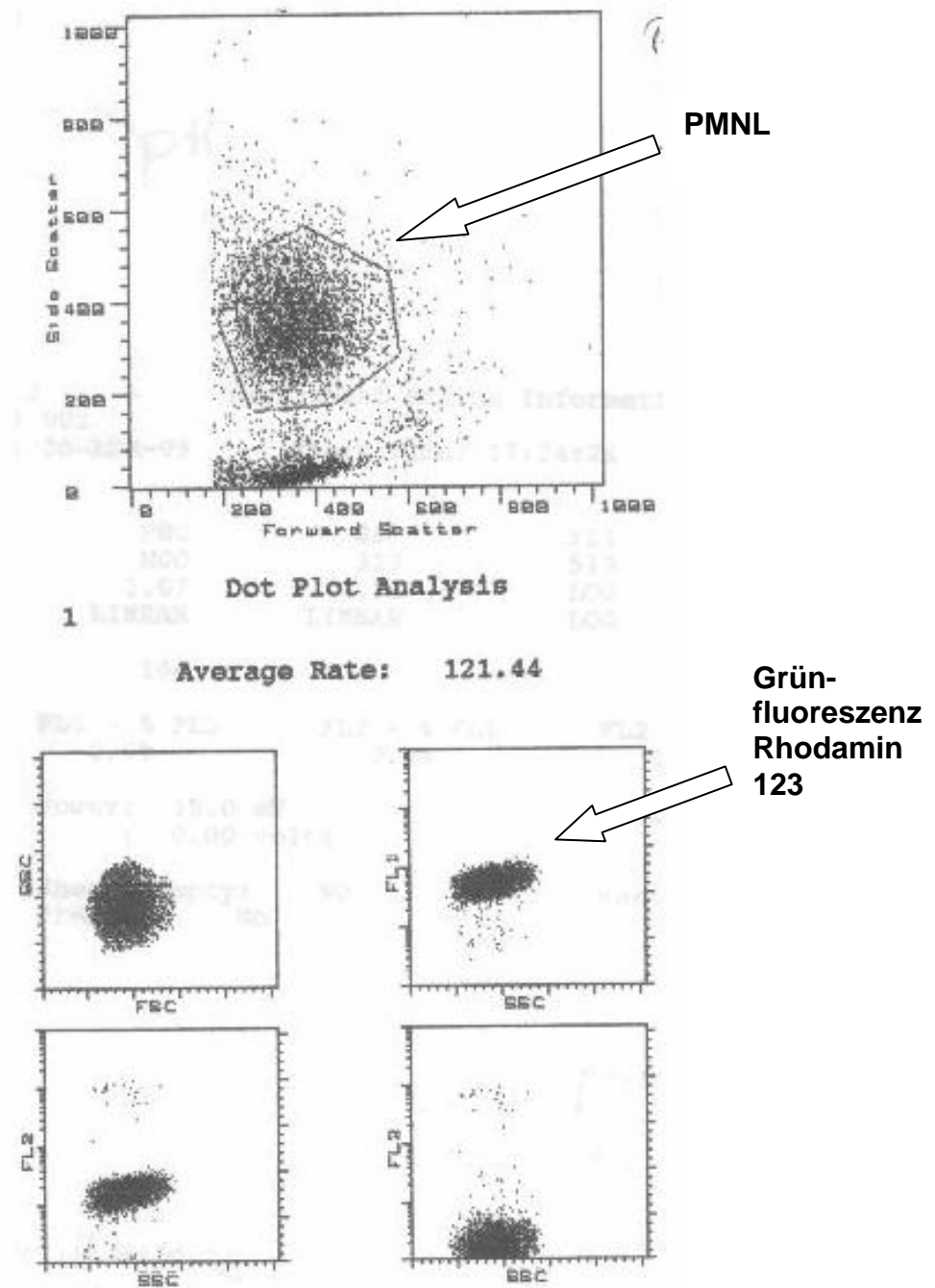


Abbildung 8: Dot-Plot-Scatter Diagramm der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion polymorphkerniger Granulozyten nach Stimulation mit TNF- $\alpha$ /fMLP (eigene Messungen).

Die multiparametrische Erfassung wurde für 5000 Zellen pro Messung im logarithmischen Betriebsmodus der Photomultiplier durchgeführt (Tab. 5).

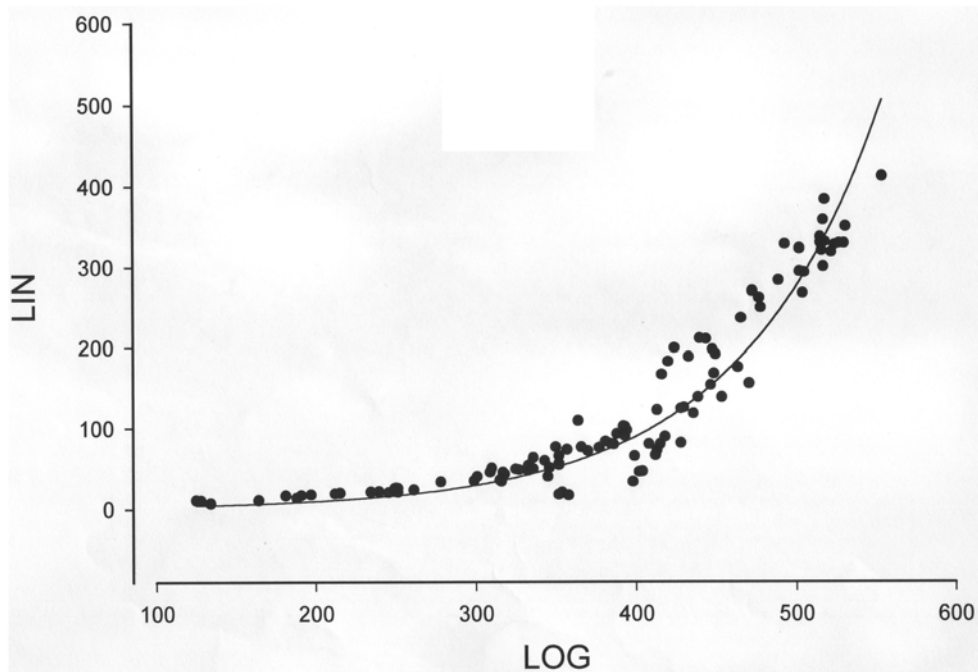
**Tabelle 5: Einstellungen des Durchflusszytometers zur Bestimmung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion humaner PMNL**

Kanal	FSC	SSC	FL-1	FL-2	FL-3
Detektor-Spannung	E00	323	513	459	404
Detektor-Verstärkung	1.07	1.00	Log.	Log.	Log.
Data Mode	Lin.	Lin.	Log.	Log.	Log.
Schwelle / Threshold	164	0	0	0	0

Die im Listenmodus gespeicherten Werte wurden mit der Software des Durchflusszytometers ausgewertet. Ein logarithmischer Messmodus war notwendig, da die Superoxidanionenproduktion und damit die sekundäre Bildung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hohe Fluoreszenzwerte, insbesondere nach Aktivierung der PMNL, aufwies. Die logarithmisch verstärkten Werte wurden mit Hilfe einer für das Durchflusszytometer und seinen Betriebsmodus spezifisch bestimmten Kalibrationskurve mit Exponentialfunktion auf lineare Werte umgerechnet. Die der Kalibrationskurve zugrundeliegende Funktion wurde durch eine nicht-lineare Regressionsanalyse ermittelt.

Abb. 9 zeigt die in FL-1 logarithmisch und im linearen Modus gemessenen Rhodaminfluoreszenzwerte und die daraus resultierende Kalibrationskurve. Die sie beschreibende mathematische Funktion lautet:

$$\text{LIN} = e^{0,01124 \times \text{LOG}} \quad (n = 110, p < 0,0001, r^2 = 0.924)$$



**Abbildung 9:** Kalibrationskurve für die Umrechnung von Fluoreszenzaktivität, die bei logarithmischer Verstärkerfunktion bestimmt wurden, auf lineare Werte.

## **II. MESSUNG DER ADHÄSION UND PHAGOZYTOSE VON OPSONIERTEM ZYMOSAN DURCH PMNL UND DER PHAGOZYTOSE-ASSOZIIERTEN H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-PRODUKTION**

Die Phagozytose als zentraler Prozess der Abwehrreaktion des menschlichen Körpers kann in 3 entscheidende Schritte unterteilt werden:

- 1) Adhäsion,
- 2) Internalisierung,
- 3) nachfolgende Vernichtung des Bakteriums durch oxidativen Burst.

Die Phagozytose verschiedenartiger Partikel (Latex, Bakterien, Zymosan A) durch PMNL wurde früher lichtmikroskopisch erfasst. Dieses Verfahren ist jedoch zeitaufwendig, erlaubt keine Differenzierung zwischen adhären und phagozytierten Partikeln und ist oft nicht reproduzierbar. Deshalb hat die Durchflusszytometrie aufgrund ihrer schnellen diagnostischen Möglichkeiten und hohen Aussagekraft zunehmend an Bedeutung gewonnen (18,25).

Als Partikel zur Bestimmung von Adhäsion und Phagozytose haben sich sowohl Bakterien als auch Zymosan A durchgesetzt. Zymosan A ist ein durch Hitze inaktivierter Zellwandbestandteil des Hefepilzes *Saccharomyces cerevisiae*, der sich durch eine konstante Größe auszeichnet, keine Konglomerate bildet und somit für die Adhäsion und Phagozytose durch PMNL geeignet ist. Zymosan ist einfach in der experimentellen Handhabung und kann gut opsoniert werden (24).

Bei unseren Untersuchungen zur Bestimmung der Adhärenz und Phagozytose wurden opsonierte Zymosanpartikel verwendet, die vor ihrer Opsonierung mit FITC kovalent markiert wurden.

Bei der Untersuchung mit dem Durchflusszytometer erfolgt die Identifikation der PMNL anhand ihrer Vorwärts (FSC)- und Seitwärts (SSC)-Streulichteigenschaften. Danach wurde zur Bestimmung der Adhärenz- und Phagozytosefähigkeit der PMNL zunächst der Anteil der grün fluoreszierenden FITC-positiven PMNL auf dem Fluoreszenzkanal FL-1 erfasst. Anschließend erfolgte nach Zugabe von 10 µl HCl 1 M eine erneute durchflusszytometrische Bestimmung des Anteils der FITC-positiven PMNL (Tab. 6).

**Tabelle 6: Einstellungen des Durchflusszytometers zur Adhärenz und Phagozytose von opsoniertem Zymosan humaner PMNL**

Kanal	FSC	SSC	FL-1	FL-2	FL-3
Detektor-Spannung	E00	323	299	459	404
Detektor-Verstärkung	1.00	1.62	Log.	Log.	Log.
Data Mode	Lin.	Lin.	Log.	Log.	Log.
Schwelle / Threshold	156	0	0	0	0

Wie von Hiramoto et al. (1964) beschrieben (26), bewirkt der Zusatz von HCl eine Abnahme des pH-Wertes des Mediums auf 3 bis 4 mit dem Ziel des sog. „Quenching“ von dem extrazellulär lokalisiertem Fluoreszenzfarbstoff FITC. „Quenching“ führt zum Verlust fluoreszierender Eigenschaften. D.h. extrazellulär lokalisierte FITC-markierte Zymosanpartikel, die an der Zellmembran von PMNL außen adhären, werden damit für das Durchflußzytometer unsichtbar. Folglich fluoreszieren nach dem „Quenching“ nur jene PMNL, welche FITC-markierte Zymosanpartikel durch Phagozytose nach intrazellulär aufgenommen haben. Die Phagozytoserate ergibt sich damit als Prozentsatz fluoreszenzpositiver Granulozyten, der nach Zusatz von HCl bestimmt wurde. Durch Berechnung der Differenz aus der ersten (vor der Zugabe von HCl) und zweiten Messung (nach der Zugabe von HCl) ergibt sich der Prozentsatz der PMNL, an welchen die FITC-markierten Partikel lediglich adhären.

Die durchflusszytometrische Bestimmung der phagozytose-assoziierten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion erfolgt in Analogie zu der Messung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion auf lösliche Stimuli (siehe 3.4, Abschnitt I).

### 3.5 BESTIMMUNG DER PLASMAKONZENTRATION VON ADENOSIN

Um die Plasmakonzentrationen von Adenosin zu bestimmen, wurde Blut (2 ml) in Spritzen entnommen, die mit 2 ml eiskalter „Stopplösung“ (Zusammensetzung: Dipyridamol  $2 \times 10^{-4} \text{M}$ , EHNA  $2 \times 10^{-5} \text{M}$ , EDTA  $2 \times 10^{-2} \text{M}$ , EGTA  $2 \times 10^{-2} \text{M}$ , D-L-alpha-Glycerophosphat  $2 \times 10^{-2} \text{M}$  in physiologischer Kochsalzlösung, pH 7,40) gefüllt waren. Diese Stopplösung verhindert den Verlust von Adenosin im Plasma durch Hemmung des Abbaus und der Adenosin-Wiederaufnahme in Zellen. Eine Blockade von Ecto-Nucleotidasen und unspezifischen Phosphatasen verhindert hierbei zusätzlich die Bildung von Purinen aus Adenin-Nukleotiden. Die Proben wurden für 5 min bei 600 G zentrifugiert und der Überstand durch Denaturierung der Proteine mit 70%-iger Perchlorsäure bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur Messung konserviert. Das zugrundeliegende Messprotokoll zur Bestimmung der Plasmakonzentrationen von Adenosin wurde erstmals von Ontyd et al. (1984) beschrieben (38) und modifiziert angewendet. Die Adenosinkonzentrationen wurden durch eine „dual column switching high affinity performance/reversed phase high performance liquid chromatography“ (HPLC) im Labor der Klinik für Anästhesiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München bestimmt. Die Interassaypräzision der o.g. Methode betrug für Adenosin ca. 10%. Die Sensitivität lag für die einzelnen Substanzen bei ca. 2 - 5 pmol pro Injektion.

### 3.6 STATISTIK

Die deskriptive und vergleichende Statistik erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS 13.0. Nach Prüfung auf Normalverteilung mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test wurden nicht normal-verteilte, unverbundene Stichproben mit dem Kruskal-Wallis- und post-hoc Mann-Whitney-Test und normalverteilte Stichproben mit dem ANOVA- und post-hoc students-t-Test auf Unterschiede geprüft. Im Falle verbundener Stichproben wurden bei nicht normal verteilten Daten ein Friedmann-Test mit post-hoc Wilcoxon Test und bei gegebener Normalverteilung ein ANOVA für Messwiederholungen mit post-hoc paired t-Test durchgeführt. Bei Mehrfachvergleichen erfolgte eine Korrektur des Signifikanzniveaus nach Bonferoni. Die Daten sind in den Abbildungen und Tabellen als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SEM) dargestellt. Abweichend davon sind die Werte der gemessenen Plasmakonzentrationen von Adenosin als Box Plots abgebildet. Für die Erklärung der Box Plots: siehe Legende der Abb. 16.

Die Analyse der Dosis-Wirkungskurve für die konzentrationsabhängigen Effekte von Adenosin auf die TNF- $\alpha$ /fMLP stimulierte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion erfolgte durch logistische Regression, mit deren Hilfe die halbmaximale Hemmkonzentration (IC<sub>50</sub>) berechnet wurde. Die entsprechenden Regressionsanalysen wurden mit dem Programm Sigmaplot Version 9.0 durchgeführt.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 PATIENTENCHARAKTERISTIK

Die Gruppen mit gesunden Probanden sowie Patienten mit einfacher Sepsis und septischem Schock zeigten keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Alters. Die Dauer des Zeitintervalls zwischen dem Beginn der Sepsis und der Durchführung der Messungen war in den Patientengruppen ähnlich und lag bei ca. 27 Stunden (Tab. 7).

**Tabelle 7: Charakteristika der untersuchten Gruppen**

	<b>Gesunde Probanden</b>	<b>Sepsis</b>	<b>Septischer Schock</b>
Anzahl	50	15	33
Alter (Jahre)	56,8 ± 1,9	54,3 ± 5,3	61,4 ± 3,3
Zeit: Beginn der Sepsis-Messung (h)	-	26,6 ± 7,5	26,5 ± 3,0

Parallel zur Klassifikation der Schwere der Sepsis nach den Kriterien der ACCP/SCCM Konsensuskonferenz stiegen die Apache II- und -III Werte der Patienten. Ebenso verhielten sich der Multi-Organ-Dysfunction (MOD) sowie der Sepsis-Organ-Failure-Assessment (SOFA)-Punktwert. All diese Punktwerte, die als Parameter der Schwere einer Erkrankung gelten, waren bei den Patienten mit septischem Schock signifikant höher als bei Patienten mit Sepsis ( $p < 0.05$ ; Tab. 8).



**Tabelle 8: Schwere der Sepsis**

Parameter	Sepsis	Septischer Schock
APACHE II	7,6 ± 1,1	26,5 ± 0,9 <sup>+</sup>
APACHE III	32,9 ± 4,5	56,5 ± 3,3 <sup>+</sup>
MOD	2,1 ± 0,4	9,3 ± 0,5 <sup>+</sup>
SOFA	3,8 ± 0,7	13,2 ± 0,2 <sup>+</sup>

<sup>+</sup> p < 0,05 im Vergleich zur Sepsis.

In Übereinstimmung mit der Auffassung, dass die systemische Inflammation wesentlich zur Entwicklung von Organschäden beiträgt, stiegen mit dem Schweregrad der Sepsis die Entzündungsparameter und Temperatur an (Tab. 9), und es veränderten sich die Parameter der einzelnen Organfunktionen (Tab. 10).

**Tabelle 9: Entzündungsparameter**

Parameter	Gesunde Probanden	Sepsis	Septischer Schock
CRP (mg/dl)	0,06 ± 0,03	14,6 ± 1,5*	23,1 ± 1,9*
IL-6 (pg/ml)	4,4 ± 1,3	105,7 ± 32,1*	817,4 ± 512,6* <sup>+</sup>
PCT (ng/ml)	-	3,7 ± 1,7	13,2 ± 6,9 <sup>+</sup>
Temperatur (°C)	36,4 ± 0,2	37,6 ± 0,2*	38,0 ± 0,2*

\*p < 0,05 im Vergleich zu gesunden Probanden, <sup>+</sup>p < 0,05 im Vergleich zur Sepsis.

Tabelle 10: Klinische und laborchemische Parameter

Organsystem	Parameter	Gesunde Probanden	Sepsis	Septischer Schock
Atmung	P <sub>a</sub> O <sub>2</sub> / F <sub>i</sub> O <sub>2</sub> Quotient	-	294,3 ± 22,9	234,3 ± 13,9 <sup>+</sup>
Kreislauf	Noradrenalin (mg/h)	-	0,2 ± 0,1	1,7 ± 0,2 <sup>+</sup>
Leberfunktion	Serumbilirubin (mg/dl)	-	1,2 ± 0,2	1,9 ± 0,3
Nierenfunktion	Serumkreatinin (mg/dl)	1,1 ± 0,03	0,9 ± 0,1*	1,6 ± 0,2**
Gerinnung	Thrombozyten (G/l)	262 ± 14	248 ± 32	216 ± 24*
Stoffwechsel	Laktat (mmol/l)	-	0,9 ± 0,1	3,0 ± 0,9 <sup>+</sup>

\*p < 0,05 im Vergleich zu gesunden Probanden, <sup>+</sup>p < 0,05 im Vergleich zur Sepsis.

## 4.2 EINFLUSS VON ADENOSIN AUF DIE SPONTANE UND DURCH LÖSLICHE STIMULI INDUZIERTER H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> PRODUKTION

Die Fähigkeit von PMNL, spontan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu bilden (Abb. 10), war bei gesunden Probanden und Patienten mit Sepsis ähnlich. Sie stieg bei Patienten mit einem septischen Schock im Vergleich zu gesunden Probanden und Patienten mit Sepsis signifikant an ( $p < 0,05$ ).

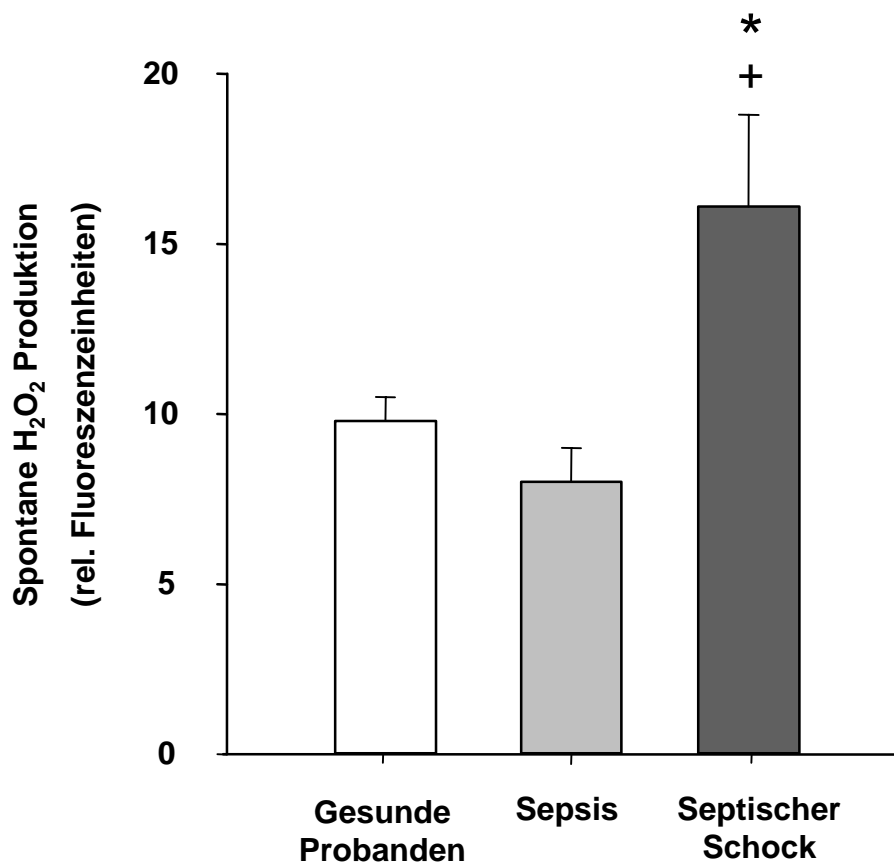


Abbildung 10: Spontane H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion polymorphkerniger Leukozyten.

\*  $p < 0,05$  gegenüber gesunden Probanden; +  $p < 0,05$  gegenüber Sepsis. Angabe in relativen Fluoreszenzeinheiten.

In allen Gruppen lag die Bildung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nach Aktivierung der PMNL mit TNF- $\alpha$ /fMLP über der spontanen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Produktion. Im Intergruppenvergleich war die Bildung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nach TNF- $\alpha$ /fMLP-Stimulation bei Patienten mit Sepsis signifikant höher als bei gesunden Probanden. Die höchsten Werte wurden für Patienten mit septischem Schock gemessen ( $p < 0,05$  gegenüber gesunden Probanden und Sepsis; Abb. 11).

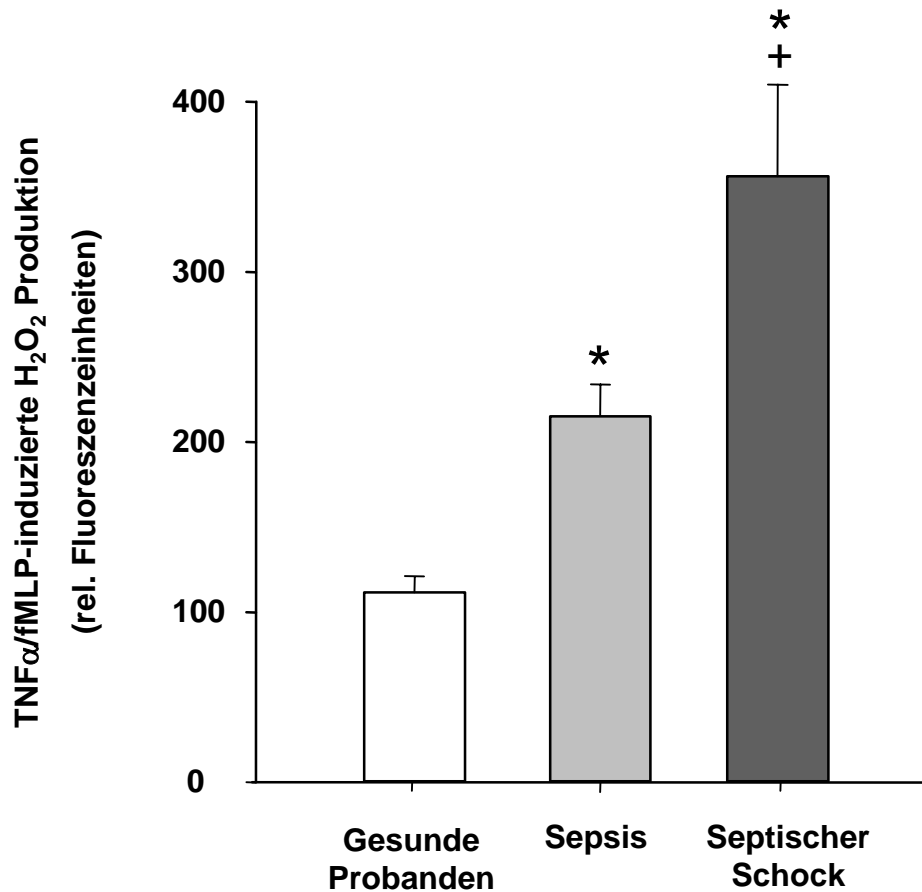


Abbildung 11: TNF- $\alpha$ /fMLP-induzierte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion polymorphkerniger

Leukozyten.\*  $p < 0,05$  gegenüber gesunden Probanden;

+  $p < 0,05$  gegenüber Sepsis. Angabe in relativen Fluoreszenzeinheiten.

Die Inkubation TNF- $\alpha$ /fMLP-stimulierter PMNL mit aufsteigenden Konzentrationen von Adenosin 10<sup>-11</sup>M bis 10<sup>-5</sup>M zeigte eine signifikante, dosisabhängige Hemmung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung in allen untersuchten Gruppen (Abb. 12).

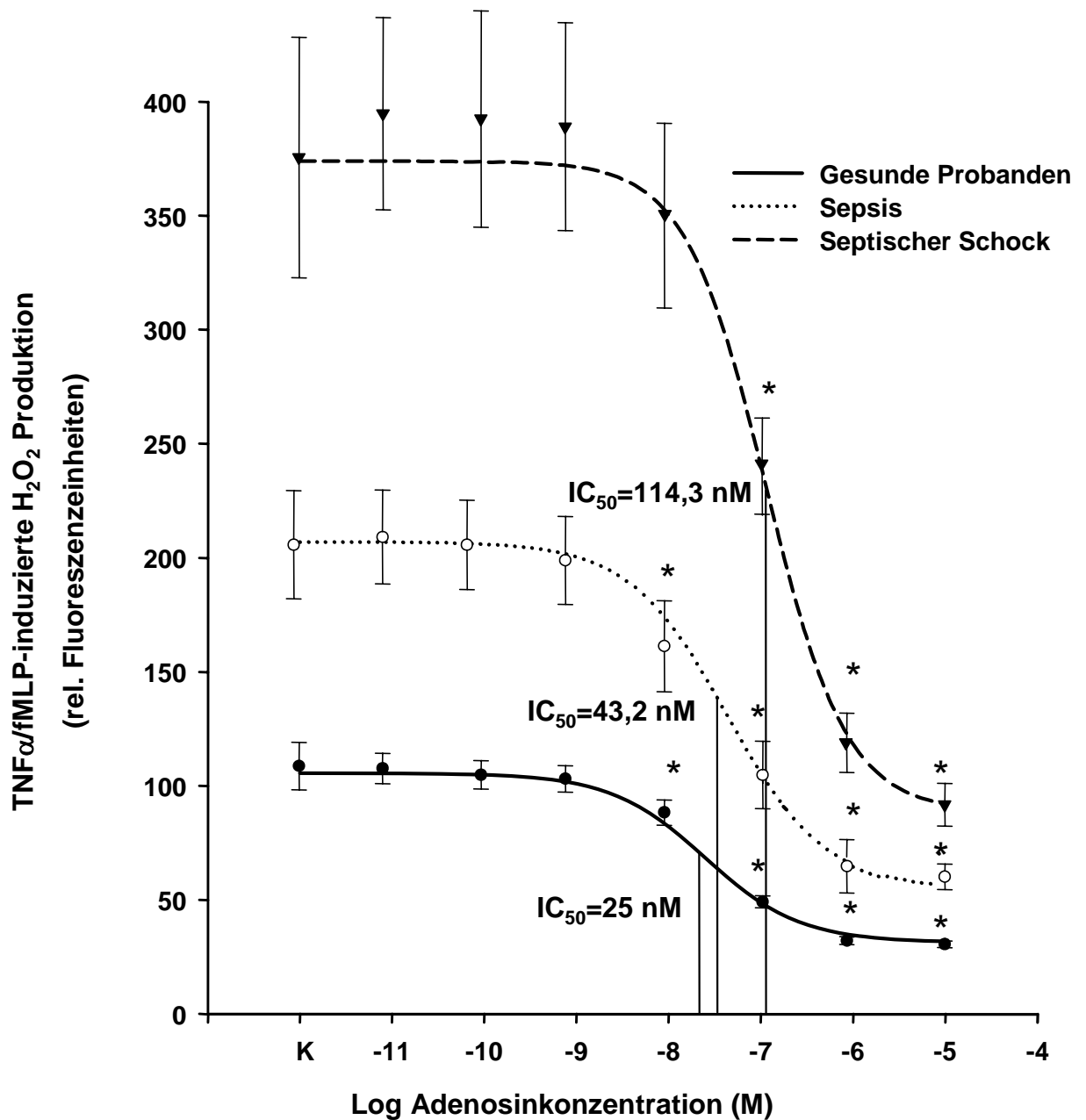


Abbildung 12: Vergleich der TNF- $\alpha$ /fMLP-induzierten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion durch PMNL unter Einfluss von aufsteigenden Konzentrationen von Adenosin 10<sup>-11</sup>M bis 10<sup>-5</sup>M.

\* p < 0,05 gegenüber dem Ausgangswert (K). Angabe in relativen Fluoreszenzeinheiten.

Im Intergruppenvergleich war die Bildung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durch PMNL nach TNF- $\alpha$ /fMLP-Stimulation zu allen Zeitpunkten bei Patienten mit septischem Schock signifikant höher als bei gesunden Probanden ( $p < 0,05$  gegenüber gesunden Probanden).

In allen Gruppen lagen die maximalen Hemmwirkungen von Adenosin zwischen 60% und 70% (Tab. 11).

**Tabelle 11: Maximale Hemmwirkung (%) von Adenosin und CGS21680 auf die TNF- $\alpha$ /fMLP-induzierte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion.**

Parameter	Gesunde Probanden	Sepsis	Septischer Schock
Adenosin	69,1 $\pm$ 3,9	69,2 $\pm$ 4,2	60,7 $\pm$ 7,2
CGS21680	74,0 $\pm$ 3,0	74,3 $\pm$ 3,2	67,2 $\pm$ 4,2

Sie wurden bei Adenosinkonzentrationen von 10<sup>-6</sup>M bei Gesunden und von 10<sup>-5</sup>M im septischen Schock erreicht. Die Adenosinkonzentration, bei der es zu einer halbmaximalen Wirkung kam, unterschied sich zwischen den Gruppen und stieg mit dem Schweregrad der Erkrankung an. Sie betrug 25,0 nM für Gesunde und erreichte den 4,6-fachen Wert (114,3 nM) für Patienten im septischen Schock (Abb. 12). Die IC<sub>50</sub> beschreibt somit eine Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungskurve von Adenosin in Abhängigkeit vom Schweregrad des septischen Krankheitsbildes.

In allen untersuchten Gruppen war es nicht möglich, die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion der PMNL nach Aktivierung mit TNF- $\alpha$ /fMLP durch Inkubation mit dem A<sub>1</sub>-Rezeptoragonisten CCPA zu beeinflussen (Abb. 13).

Im Gegensatz dazu wurde durch Inkubation mit dem A<sub>2A</sub>-Rezeptoragonist CGS21680 in allen Gruppen ein signifikanter Abfall der TNF- $\alpha$ /fMLP-induzierten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Produktion zwischen 67 % und 74 % beobachtet (Tab. 11; Abb. 13). Dieser Abfall ist ähnlich dem Ergebnis durch die Inkubation mit Adenosin.

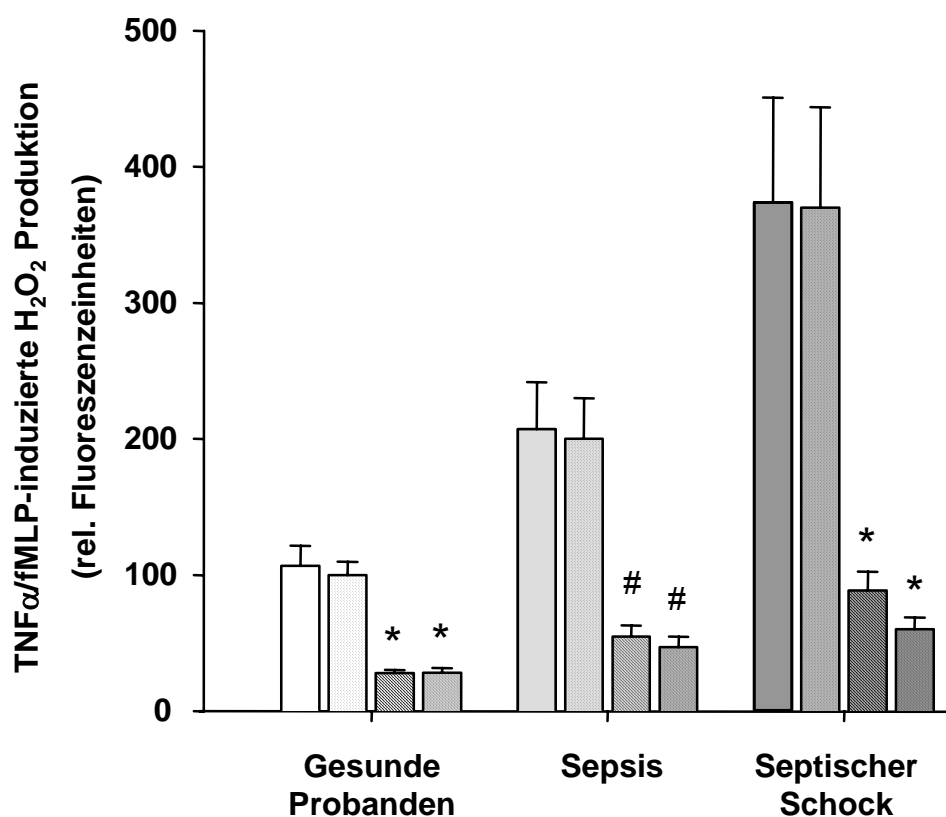


Abbildung 13: Vergleich der TNF- $\alpha$ /fMLP-induzierten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion durch PMNL unter dem Einfluss von CCPA 10<sup>-10</sup>M (gepunkteter Balken), Adenosin 10<sup>-5</sup>M (weit gestreifter Balken) und CGS21680 10<sup>-5</sup>M (eng gestreifter Balken);  
\* p < 0,0001 und # p < 0,01 gegenüber dem Kontrollwert (homogener Balken). Angabe in relativen Fluoreszenzeinheiten.

#### 4.3 EINFLUSS VON ADENOSIN AUF ADHÄSION UND PHAGOZYTOSE VON OPSONIERTEM ZYMOZAN SOWIE DIE ASSOZIIERTE H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> PRODUKTION

Die Analyse der Adhärenz FITC-markierter, opsonierter Zymosanpartikel an PMNL wies bei Patienten mit Sepsis und septischem Schock im Vergleich zu gesunden Probanden einen Anstieg auf, der im septischen Schock signifikant unterschiedlich zu gesunden Probanden war. Adenosin 10<sup>-5</sup>M beeinflusste diese PMNL-Funktion nicht (Abb. 14).

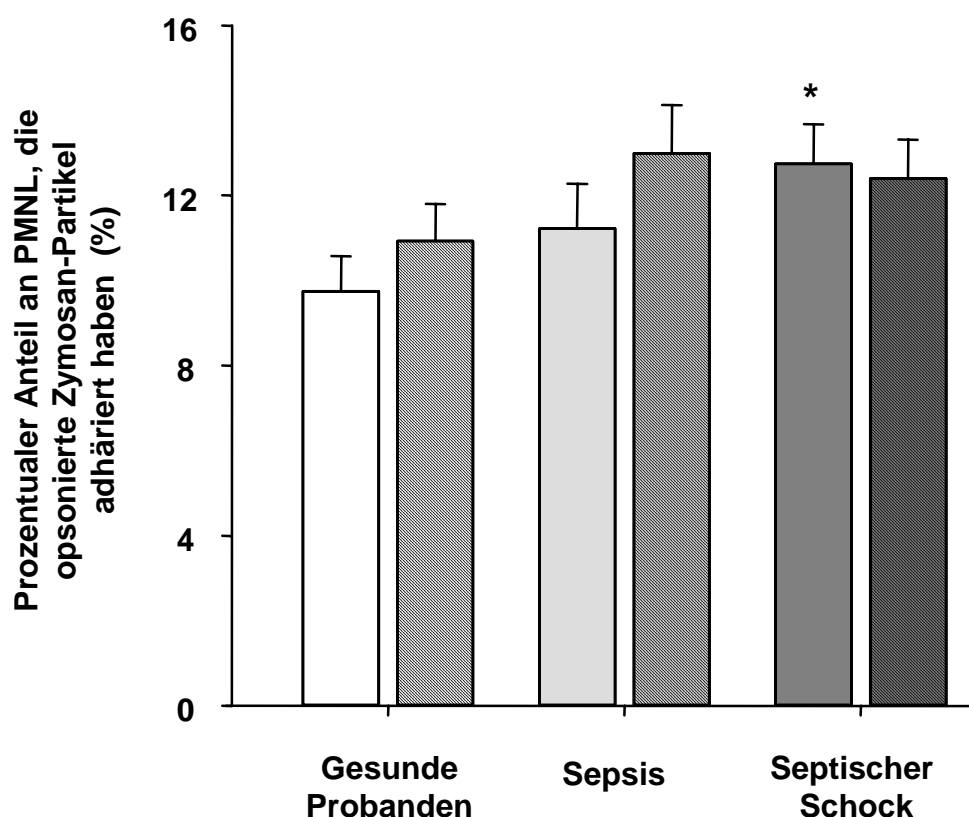


Abbildung 14: Prozentualer Anteil der PMNL, welche FITC-markierte, opsonierte Zymosanpartikel adhärnt haben, ohne (homogene Balken) und mit (gestreifte Balken) Adenosin 10<sup>-5</sup>M. \* p < 0,05 gegenüber Gesunden. Angabe in Prozent.



PMNL von Patienten mit Sepsis und septischem Schock phagozytierten signifikant mehr FITC-markiertes, opsoniertes Zymosan als PMNL gesunder Probanden. Adenosin 10<sup>-5</sup>M zeigte keinen signifikanten Einfluss auf diese PMNL-Funktion (Abb. 15).

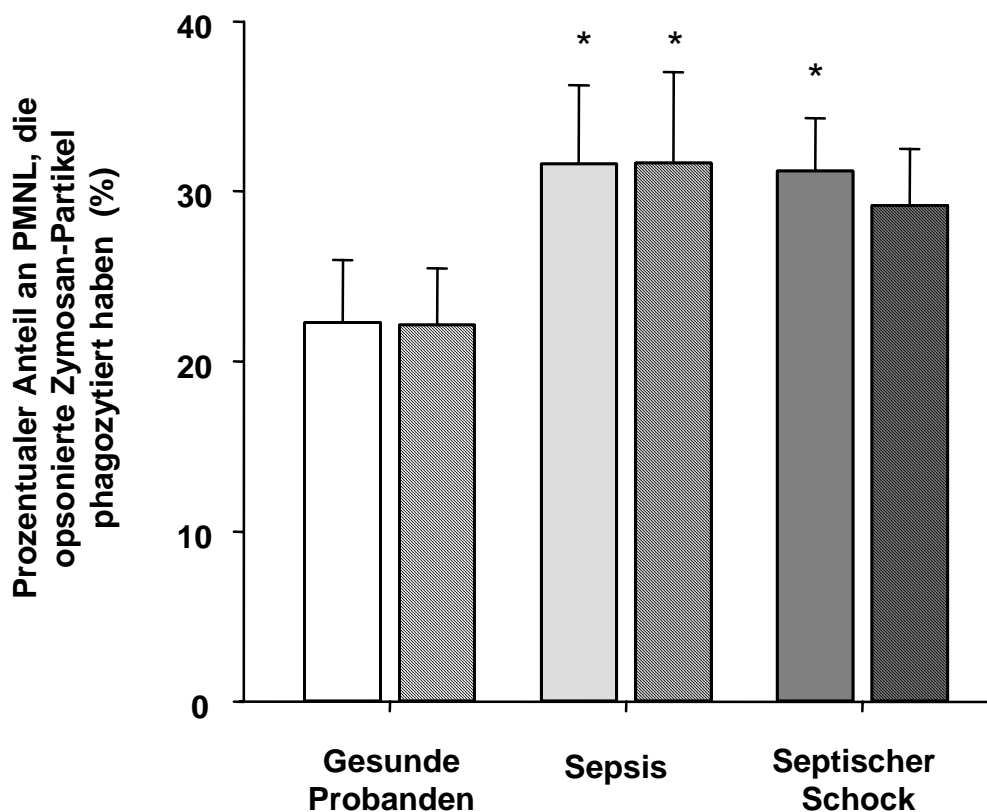


Abbildung 15: Prozentualer Anteil der PMNL, die FITC-markierte, opsonierte Zymosanpartikel phagozytiert hat, ohne (homogene Balken) und mit (gestreifte Balken) Adenosin 10<sup>-5</sup>M. \* p < 0,05 gegenüber Gesunden. Angabe in Prozent.

Die mit der Phagozytose von opsonierten Zymosanpartikeln assoziierte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion zeigte ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen. Auch diese potentiell mikrobizide PMNL-Funktion wurde durch Adenosin 10<sup>-5</sup>M nicht verändert (Abb. 16).

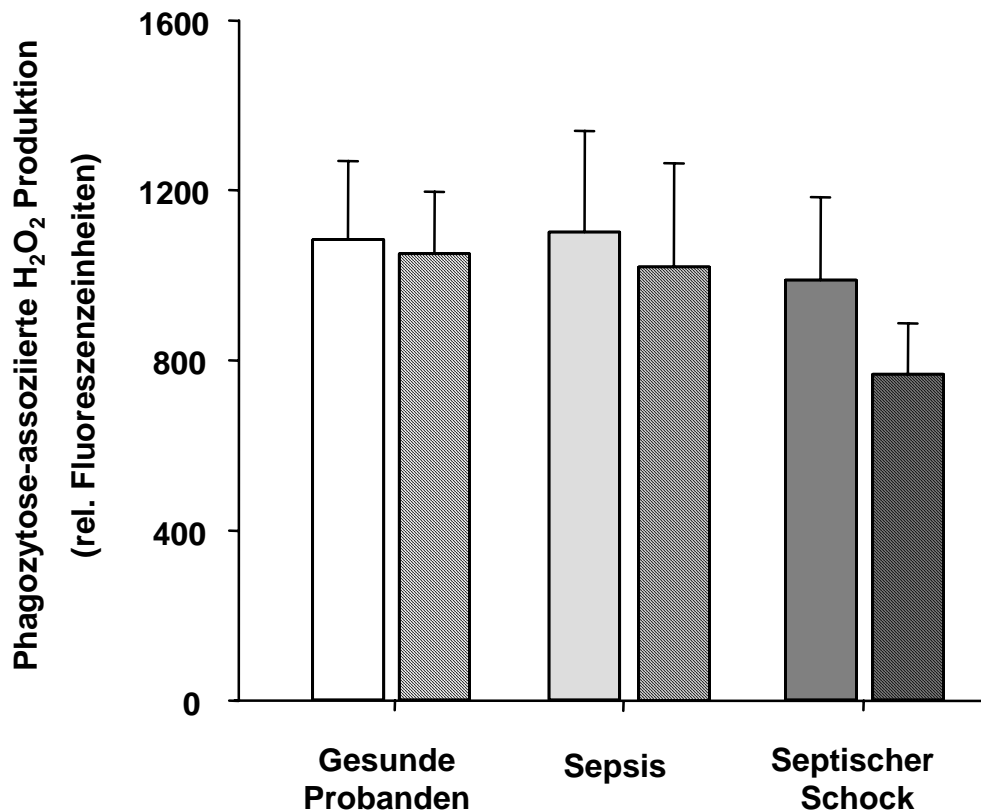


Abbildung 16: Mit der Phagozytose von opsoniertem Zymosan assoziierte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion durch PMNL ohne (homogene Balken) und mit (gestreifte Balken) Adenosin 10<sup>-5</sup>M. Angabe in relativen Fluoreszenzeinheiten (Mittelwert ± SEM).

In den Versuchsansätzen konnte in keiner der Gruppen ein Einfluss der A<sub>1</sub>- bzw. A<sub>2A</sub>-Rezeptoragonisten auf die nach Stimulation durch plasmaopsoniertes Zymosan resultierende H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Produktion gefunden werden (Daten nicht gezeigt).

#### 4.4 ADENOSINKONZENTRATIONEN *IN VIVO*

Mittels HPLC konnte im venösen Blut (Abb. 17) gesunder Patienten eine durchschnittliche Adenosinkonzentration von  $42,5 \pm 2,9$  nmol/l festgestellt werden. Bei Patienten mit Sepsis wurde eine Adenosinkonzentration von  $77,4 \pm 19,7$  nmol/l gemessen (+ 54,9 % gegenüber gesunden Probanden). Der Adenosinspiegel im septischen Schock war die Adenosinkonzentration  $125,6 \pm 18,2$  nmol/l (+ 61,6 % gegenüber Patienten mit Sepsis). Das entspricht der 3-fachen Höhe des Adenosinspiegels gesunder Probanden.

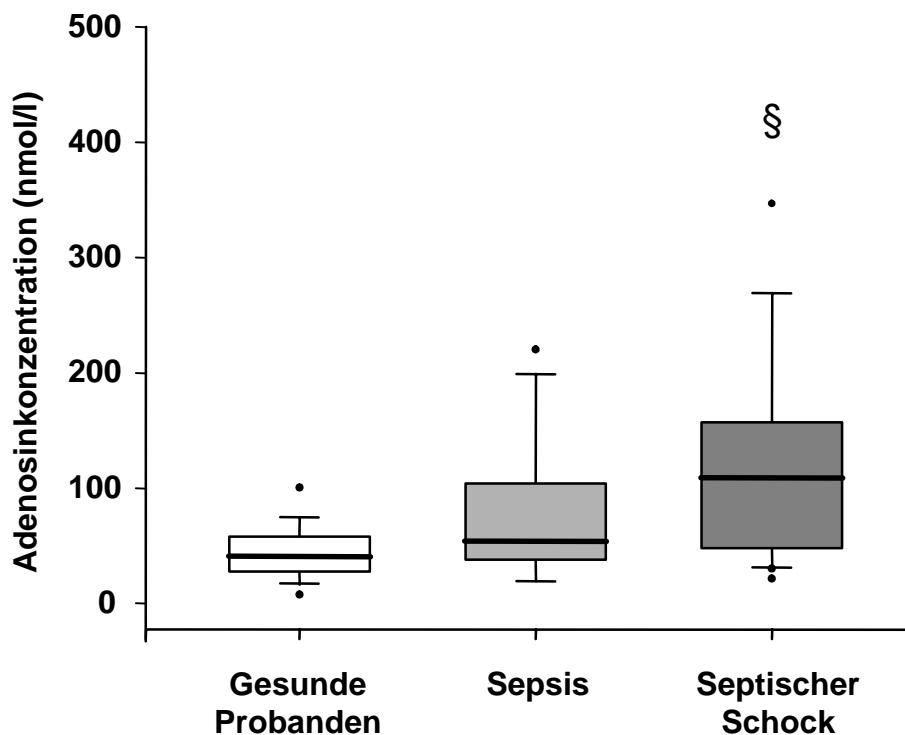


Abbildung 17: Adenosinkonzentration im Plasma. Box Plot-Diagramme: Der obere und untere Punkt geben den 5. und 95. Perzentilenwert wieder. Der obere und untere Querbalken entsprechen der 10. und 90. Perzentile. Die obere und untere Begrenzung der Box stellen die 25. und 75. Perzentile dar. Der Medianwert (50. Perzentile) entspricht dem dicken Balken in der Box.

§  $p < 0,0001$  gegenüber Gesunden.

## 5 DISKUSSION

Die ambivalente Rolle neutrophiler Granulozyten im Rahmen inflammatorischer Prozesse wird in der Literatur intensiv diskutiert (7,36,54,65). Die Immunantwort der PMNL ist einerseits für die Abwehr von Mikroorganismen verantwortlich. Auf der anderen Seite sind die PMNL in der Lage, überschießend und extrazellulär Superoxidanionen ( $O_2^-$ ) und Radikale frei zu setzen, die nicht der Vernichtung des Mikroorganismus dienen, sondern autoaggressiv wirken (19). Mit der zunehmenden Schwere der Inflammation scheint das Gleichgewicht der beiden Prozesse außer Kontrolle zu geraten, und es kommt zu schweren Schäden im Organismus (55).

Bei der Regulation der Inflammation wird dem Adenosinrezeptorsystem eine wichtige Rolle zugeschrieben. Einerseits wird Adenosin im Rahmen von Inflammation und Hypoxie vermehrt freigesetzt (43,63), andererseits scheint es als „retaliatory metabolite“ (35) die ambivalente Rolle und damit die Effizienz der PMNL aktiv zu beeinflussen. Adenosin entfaltet dabei über verschiedene Rezeptorsysteme (A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub>, A<sub>3</sub>) seine Wirkungen. Über die Dynamik und Funktionalität der einzelnen Adenosinrezeptoren in der Sepsis ist bisher nicht viel bekannt. Von Interesse sind dabei vor allem die hochaffinen A<sub>1</sub>- und A<sub>2A</sub>-Rezeptoren. Die Veränderungen potentiell gewebschädigender, zytotoxischer und keimabtötender, mikrobizider PMNL-Funktionen unter dem Einfluss von Adenosin bei zunehmender Schwere der Sepsis vergleichend zu untersuchen, war das Ziel der vorliegenden Arbeit.

## 5.1 GRANULOZYTENDYSFUNKTION BEI SEPSIS

In der vorliegenden klinisch-experimentellen Studie wurde der Anstieg der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion humaner neutrophiler Granulozyten in der Sepsis quantitativ erfasst (Abb. 10 und 11). Durchflußzytometrisch wurde mittels Umwandlung von Dihydrorhodamin 123 zu grün fluoreszierendem Rhodamin eine signifikante Zunahme der potentiell zytotoxischen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion mit zunehmendem Schweregrad der Sepsis beobachtet. Die höchsten Werte für die basale als auch für die durch lösliche Stimuli (TNF- $\alpha$  und fMLP) induzierte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion fanden sich bei Patienten im septischen Schock. Da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durch Dismutation von Superoxidanionen (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) entsteht, kann ebenfalls auf eine gesteigerte O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Produktion geschlossen werden. Das heißt, Patienten im septischen Schock produzieren signifikant mehr extrazelluläre Superoxidanionen als gesunde Probanden und sind damit einem höheren Risiko der Gewebeschädigung bzw. der Entwicklung von Organdysfunktionen ausgesetzt. Diese Daten bestätigen frühere Untersuchungen anderer Autoren von septischen Patienten (34,42,62) und tierexperimentelle Ergebnisse (44,53,59).

Mit zunehmendem Schweregrad der Sepsis wurde in dieser klinisch-prospektiven Studie außerdem eine vermehrte Adhäsion und Phagozytose von opsoniertem Zymosan (Abb. 14 und 15) beobachtet. Das bestätigt Untersuchungen zur Adhäsions- und Phagozytosefähigkeit von PMNL durch andere Autoren (34). Zusätzlich konnten wir zeigen, dass die potentiell mikrobizide, in das Phagosom gerichtete H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion, wie sie durch die Phagozytose von partikulären Stimuli, z.B. Zymosan, ausgelöst wird, in der Gruppe der Patienten mit einfacher

Sepsis und der gesunden Population ähnlich war, aber bei den Patienten mit septischem Schock gesunken ist (Abb. 16). Betrachtet man die bei Patienten im septischen Schock gegenüber Gesunden und Patienten mit einfacher Sepsis eingetretene tendenzielle Abnahme der Phagozytose-assoziierten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion (Abb. 16) bei gleichzeitig gesteigerter Adhärenz (Abb. 14) und Phagozytose (Abb. 15), so erscheint der Schluss erlaubt, dass es im septischen Schock zu einer verminderten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion pro Phagozytosevorgang kommt. Dies deutet auf eine Erschöpfung der mikrobiziden Kapazität neutrophiler Granulozyten im septischen Schock hin.

Damit zeigt die Analyse der verschiedenen Granulozytenfunktionen, dass es mit zunehmendem Schweregrad der Sepsis zu einer Steigerung der potentiell gewebeschädigenden, zytotoxischen Partialfunktionen bei gleichzeitiger Beeinträchtigung der mikrobiziden Partialfunktionen im Sinne einer septischen Granulozytendysfunktion kommt.

## **5.2 SELEKTIVE MODULATION DER GRANULOZYTENDYSFUNKTION DURCH DAS ADENOSIN A<sub>2A</sub>-REZEPTORSYSTEM**

In unseren Experimenten führte die *in vitro* Inkubation der PMNL mit Adenosin 10<sup>-5</sup>M zur Hemmung ihrer TNF- $\alpha$ /fMLP-induzierten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion (Abb. 12 und 13) auf unter 30-40%. Folglich ist Adenosin eine stark anti-inflammatorisch wirksame Substanz, die in der Lage ist, die potentiell zytotoxische Sauerstoffradikalproduktion der PMNL *in vitro* zu supprimieren.

Um die Frage zu klären, über welchen der hochaffinen Adenosinrezeptoren dieser Effekt vermittelt wird, wurden die Zellen zunächst mit aufsteigenden Konzentrationen von Adenosin inkubiert und die Dosis-Wirkungs-Kurven ermittelt (Abb. 12). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Cronstein und Mitarbeitern (12,14), bewirkte Adenosin in unserer klinisch-experimentellen Studie in den Konzentrationen von 10<sup>-11</sup>M bis 10<sup>-5</sup>M eine dosisabhängige Hemmung der durch lösliche Stimuli induzierten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion der PMNL. Diese konzentrationsabhängige Inhibition ließ sich nicht nur bei Gesunden, sondern auch bei Patienten mit Sepsis und septischem Schock beobachten (Abb. 12). In allen Gruppen verlief die Hemmkurve sigmoidal. Vereinbar mit der Wirkung von nativem Adenosin an einem A<sub>2A</sub>-Rezeptor bewirkte das Nukleosid eine dosisabhängige und sättigbare Hemmwirkung mit einem maximalen Effekt für Konzentrationen, die im Affinitätsbereich des A<sub>2A</sub>-Rezeptors (50 nM – 1 µM) liegen (15).

Um die Rolle des A<sub>2A</sub>-Rezeptors weiter zu erhärten, wurden die Zellen mit spezifischen Rezeptoragonisten inkubiert. Wie aus der Abb. 13 ersichtlich, ließ sich in allen Gruppen mit CGS21680 – einem A<sub>2A</sub>-Rezeptoragonisten - ein ebenso starker Hemmeffekt wie mit Adenosin erzielen (Tab. 11). Im Gegensatz dazu übte CCPA als A<sub>1</sub>-Rezeptoragonist keinen Einfluss auf die stimulierte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion aus (Abb. 13). Dies lässt den Schluss zu, dass der potentiell protektive Hemmeffekt von Adenosin auf die durch lösliche Stimuli induzierte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion über den A<sub>2A</sub>-Rezeptor vermittelt wird. Ähnliche Resultate berichtete Fredholm (1997), indem er ebenfalls die A<sub>2A</sub>-Rezeptor-vermittelte Hemmung der granulozytären oxidativen Reaktion durch Adenosin beschrieb (20). Bereits 1995 konnte nachgewiesen werden, dass PMNL nach Stimulation A<sub>2A</sub>-Rezeptor-vermittelt weniger TNF-α sezernieren (57). Heute gilt der A<sub>2A</sub>-

Rezeptor als anti-inflammatorisch wirksamer Rezeptor (48). Unsere Ergebnisse bestätigen diesen Fakt erstmals auch bei Patienten mit Sepsis.

Die *in vitro* Inkubation mit Adenosin  $10^{-5}$ M, einer sehr hohen Adenosinkonzentration, führte jedoch zu keiner signifikanten Veränderung von Adhärenz und Phagozytose plasmaopsonierter Zymosanpartikel. Die Produktion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nach Stimulation der Granulozyten mittels plasmaopsonierten Zymosans blieb auch unter der Bedingung der *in vitro* Inkubation mit Adenosin bei dieser hohen Konzentration von  $10^{-5}$ M, die die potentiell zytotoxische H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion maximal supprimieren konnte, unverändert hoch. Auf die Phagozytose-induzierte, mikrobizide Sauerstoffradikalproduktion durch PMNL hatten die selektiven Rezeptoragonisten selbst bei  $10^{-5}$ M - ähnlich dem Adenosin selbst - ebenfalls keinen Einfluss und bestätigen, dass Adenosin über den A<sub>2A</sub>-Rezeptor die zytotoxischen Funktionen der PMNL stark hemmt, ohne jedoch die mikrobiziden Funktionen zu beeinträchtigen. Dazu vergleichbare Untersuchungen sind beim Menschen - laut Datenlage in der Literatur - bisher nicht erfolgt.

### **5.3 KLINISCHE BEDEUTUNG VON ADENOSIN UND DEM A<sub>2A</sub>-REZEPTOR**

In der von uns durchgeführten Studie stiegen mit zunehmender Schwere der Sepsis die Adenosinkonzentrationen im Plasma an. Die höchsten Werte wurden im Plasma von Patienten im septischen Schock gemessen. Sie erreichten mit 125,6 nM durchschnittlich die 2,5-fache Höhe von Mittelwerten gesunder Probanden. Ebenfalls erhöhte Adenosinspiegel im Vergleich zu gesunden Freiwilligen wies eine prospektive Studie (33) an 25 septischen Intensivpatienten nach. Jabs et al. (1998) hatten bei gesunden Probanden Adenosinspiegel von



50 nM, bei überlebenden, kritisch kranken Patienten von 120 nM und bei jenen, die dann verstarben, 320 nM gemessen (27). Fredholm (20) berichtete Normalwerte für Adenosinspiegel in Höhe von 20 – 500 nM. Ähnliche Werte (80 – 216 nM) bei gesunden Probanden maßen Maguire et al. (1998) und Pasini et al. (2000) (32,43).

Mögliche Ursachen für eine Erhöhung der Plasmakonzentrationen von Adenosin in der Sepsis sind seine verstärkte Bildung infolge des gesteigerten ATP-Katabolismus bei Inflammation und Hypoxie (43,63), also Bedingungen, die häufig bei Patienten mit septischem Schock vorliegen. Der Sinn gesteigerter Adenosinplasmakonzentrationen könnte in der Notwendigkeit einer stärkeren Suppression der potentiell zytotoxischen, gewebeschädigenden Granulozytenfunktionen liegen. Zudem nahm die Empfindlichkeit zirkulierender PMNL gegenüber den Adenosin A<sub>2A</sub>-Rezeptor-vermittelten Hemmeffekten bei Patienten mit septischem Schock ab. So kam es mit zunehmendem Schweregrad der Sepsis zu einer Rechtsverschiebung der Hemmkurve (Abb. 12) und zu einem Anstieg der halbmaximalen Hemmkonzentration (IC<sub>50</sub>) von Adenosin für die TNF- $\alpha$ /fMLP-induzierte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion, die bei septischen Patienten den 1,7-fachen und im septischen Schock den 4,6-fachen Wert erreichte. Das bedeutet, dass in der Sepsis höhere Konzentrationen an Adenosin erforderlich waren, um den gleichen prozentualen Hemmeffekt auf diese zytotoxische PMNL-Funktion zu erreichen. Der auf das 4,6-fache, erhöhte IC<sub>50</sub>-Wert im septischen Schock (114 nM) ist dennoch insofern überraschend, als dass *in vivo* aktivierte Granulozyten aus inflammatorisch veränderten Lungen von Mäusen eine Hochregulation des A<sub>2A</sub>-Rezeptors zeigen (58).

Eigentlich hätte man bei einer Abnahme der anti-inflammatorischen Wirkung von Adenosin in der Sepsis auch einen zahlenmäßigen Rückgang des anti-inflammatorisch wirksamen Rezeptors erwartet. Dies scheint – wie die tierexperimentellen Daten von Thiel et al. (2005) zeigen – nicht der Fall zu sein (58). Eine alternative Erklärung könnte eine Desensibilisierung des A<sub>2A</sub>-Rezeptors unter dem Einfluss inflammatorischer Stimuli sein (11,39). Zusätzlich oder alternativ zur Theorie der A<sub>2A</sub>-Rezeptor-Desensibilisierung steht eine eventuell vermehrte Expression von pro-inflammatorisch wirksamen A<sub>1</sub>-Rezeptoren (53), die für eine verminderte anti-inflammatorische Wirksamkeit von Adenosin verantwortlich sein könnten. Dies ist jedoch nicht der Fall, wie wir in unseren Experimenten zeigen konnten, da CCPA, der hochselektive A<sub>1</sub>-Rezeptor-Agonist, die zytotoxische H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion bei Patienten mit Sepsis nicht steigerte (Abb. 13). Außerdem besteht die Möglichkeit, dass die Signaltransduktion nach intrazellulär über die G-Protein-Kopplung gestört ist.

Die Folge der Rechtsverschiebung der Adenosinhemmkurve - unabhängig vom Grund – ist die geringere anti-inflammatorische Wirkung des Adenosins mit den möglichen Folgen einer Verstärkung der Inflammation, des Gewebeschadens und damit des Risikos des Multiorganversagens in der Sepsis. In Reaktion darauf wäre die Erhöhung der Adenosinplasmakonzentration im septischen Schock mit einem Faktor ähnlich dem des Anstiegs des IC<sub>50</sub>-Wertes als eine kompensatorische Gegenregulation zu werten.

Vermag aber die Zunahme der Adenosinkonzentration im Plasma der Patienten mit septischem Schock den Anstieg des IC<sub>50</sub>-Wertes tatsächlich zu kompensieren? Betrachtet man für die Beantwortung der Frage die Verteilung der bei Patienten mit septischem Schock gemessenen Adenosinplasmakonzentrationen (Abb. 16), so gibt der dicke Balken in der Box den Medianwert

der Adenosinplasmakonzentration wieder. Da entsprechend der Definition des Medians die Hälfte aller Patienten unter- und oberhalb des Medianwertes liegen, und der bestimmte Medianwert mit ca. 121 nM nahezu gleich groß dem IC<sub>50</sub> (114 nM) ist, bedeutet dies, dass ca. 50 % der Patienten im septischen Schock (exakt 16 von 33 Patienten [48,5 %]) Plasmaadenosinkonzentrationen aufweisen, die nicht ausreichend sind, die potentiell zytotoxischen Funktionen der PMNL mindestens halbmaximal zu hemmen. Diese Patienten, die fast die Hälfte aller Patienten mit septischem Schock darstellen, könnte so jene Zielgruppe sein, die am stärksten von einer Adenosinapplikation zur „Down-Regulation“ überschüssend aktivierter Granulozyten unter Aufrechterhaltung von deren mikrobiziden Partialfunktionen profitieren dürfte.

Dabei erscheint eine Anwendung von Adenosin im septischen Schock als durchaus möglich. So ist Adenosin als Antiarrhythmikum schon lange im klinischen Einsatz, und seine pharmakologisch-toxischen Eigenschaften sind gut bekannt (29). Vorteilhaft ist die Verbesserung der Koronardurchblutung über den Adenosin A<sub>2A</sub>-Rezeptor (6). Die Halbwertszeit von 8 bis 10 Sekunden macht Adenosin für den Akuteinsatz sehr gut steuerbar, seine potentiellen Nebenwirkungen sind dementsprechend kurzlebig und umfassen sehr selten auftretende, meist vorübergehende Gesichtsrötung, Brustschmerz, Atemnot, Bronchospasmus, Schwindel und Bradykardie. Adenosin ist kontraindiziert bei einem AV-Block II° und III° sowie bei Patienten mit einem Bradykardie-Tachykardie-Syndrom. Die Einzeldosis zur Demaskierung einer AV-Knoten-Tachykardie liegt zwischen 3 und 12 mg (4).

Die kardiopulmonalen Nebenwirkungen – wie beim gesunden Probanden beschrieben – scheinen bei der Sepsis nicht aufzutreten. Vielmehr lassen tierexperimentelle Daten vermuten, dass sich Adenosin in der Sepsis nicht nur äußerst günstig auf die PMNL-Dysfunktion, sondern auch auf die pulmonale und Herz-Kreislauf-Situation auszuwirken vermag. Bei septischen Schweinen verdoppelte die Behandlung mit Adenosin nahezu das Herzminutenvolumen durch Verminderung des peripheren vaskulären Widerstands um 50%, reduzierte den pulmonalen Widerstand und das Shuntvolumen, verbesserte die Atemwegwiderstände und entfaltete eine positiv inotrope Wirkung am linken Ventrikel. Adenosin verbesserte damit die Oxygenierung des inflammatorischen Gewebes, ohne die zu erwartende endotoxinbedingte Vasodilatation zu verstärken (60). Dies ist ein in septischen Krankheitsbildern ein durchaus gewünschter Effekt. Darüber hinaus wurde am Modell der hyperdynamen Endotoxinämie des Schweins erstmals gezeigt, dass eine kontinuierliche Infusion von Adenosin die extrazelluläre Freisetzung von zytotoxischen Superoxidanionen ausgeprägt hemmen konnte, ohne die mikrobiziden Funktionen weiter zu beeinträchtigen (59).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass - aufgrund der bei septischen Krankheitsbildern *in vitro* und in Tierexperimenten aufgezeigten günstigen immunologischen und hämodynamischen Effekte von Adenosin - die Anwendung der Substanz bei septischen Patienten sinnvoll erscheint.

Prinzipiell denkbar ist damit auch der Einsatz bei anderen Erkrankungen, die mit einer systemischen, inflammatorischen Reaktion einhergehen. Dazu zählen z.B. ARDS-Patienten, Polytraumata sowie Patienten mit einem SIRS nach großen Operationen. Ein weites Gebiet könnte auch die Verwendung von Adenosin in nicht klassisch chirurgisch-intensivmedizinischen Krankheitsbildern wie rheumatoider Arthritis, bei inflammatorischen Darmerkrankungen, Malaria oder bei postischämischen Veränderungen nach Gefäßverschlüssen, Myokardinfarkt oder Mesenterialischämie darstellen.

Nach *in vivo* Prüfung in klinischen Studien könnte Adenosin eine Erfolg versprechende Alternative oder ergänzende Behandlung zu bereits existierenden anti-inflammatorischen Therapien sein.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Eine wachsende Zahl von Untersuchungen weist auf eine Schlüsselrolle der polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten in der Pathogenese der Sepsis hin. Von besonderem Interesse ist dabei die ambivalente Funktion der PMNL mit zur Schädigung von Gewebe beitragenden, potentiell zytotoxischen Effekten einerseits sowie einer zum Schutz von Gewebe vor eingedrungenen Mikroorganismen mikrobiziden Abwehrfunktion andererseits. Humane neutrophile Granulozyten unterliegen einer purinergen Regulation und besitzen dafür G-Protein-gekoppelte Adenosinrezeptoren (A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> [A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub>] und A<sub>3</sub>) auf ihrer Membranoberfläche.

Wir haben in einer klinisch-prospektiven Studie, in die gesunde Probanden und Patienten mit Sepsis und septischem Schock eingeschlossen wurden, den Einfluss von Adenosin und A<sub>2A</sub>- sowie A<sub>1</sub>-Rezeptor-spezifischen Agonisten auf die Regulation der zytotoxischen und der mikrobiziden Partialfunktion von zirkulierenden PMNL *in vitro* untersucht.

Dabei haben sich folgende Ergebnisse gezeigt:

- Die durch lösliche Stimuli (TNF- $\alpha$ /fMLP) induzierte, potenziell zytotoxische H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion ist in der Sepsis abhängig von der Schwere der Erkrankung gesteigert und kann durch Adenosin selektiv und dosisabhängig gehemmt werden. Verantwortlich für die Vermittlung dieses anti-inflammatorisch wirksamen Effektes von Adenosin ist der A<sub>2A</sub>-

Adenosinrezeptor. Die anhand von Dosis-Wirkungs-Kurven ermittelte halbmaximale Hemmkonzentration (IC<sub>50</sub>) von Adenosin für die potenziell zytotoxische H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion durch PMNL steigt allerdings mit zunehmendem Schweregrad der Sepsis an, d.h. der Hemmeffekt von Adenosin nimmt mit zunehmender Schwere der Sepsis ab.

- Die potenziell mikrobizid wirksamen PMNL-Funktionen, Adhärenz und Phagozytose von partikulärem Zymosan, zeigen einen Anstieg mit zunehmender Schwere der Sepsis, während die damit assoziierte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion abnimmt. Diese Ergebnisse weisen auf eine Einschränkung der mikrobiziden Funktion pro Phagozytosevorgang hin. Keine dieser mikrobiziden PMNL-Partialfunktionen wird jedoch durch Adenosin signifikant gestört.
- Kompensatorisch zur Abnahme des Hemmeffektes von Adenosin auf die zytotoxische Superoxidanionenproduktion zeigen die Plasmaadenosinpiegel *in vivo* eine Zunahme der Konzentrationen des Nukleosids entsprechend dem Schweregrad der Sepsis. Dadurch bleiben die Adenosinplasmakonzentrationen im Bereich der angestiegenen IC<sub>50</sub> der anti-inflammatorischen Adenosinwirkung und sind theoretisch ausreichend, die Produktion von potenziell zytotoxischem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu hemmen. Allerdings erreichen ca. 50 % der Patienten im septischen Schock die *in vitro* ermittelte IC<sub>50</sub>-Konzentration von Adenosin nicht.

Schlussfolgerung:

Basierend auf den vorliegenden Ergebnissen kann Adenosin über einen A<sub>2A</sub>-Rezeptor vermittelten Mechanismus die bei Sepsis gesteigerte Produktion von potenziell gewebeschädigendem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hemmen, ohne die für die Abwehr von Bakterien bei Sepsis ohnehin eingeschränkten mikrobiziden Funktionen zu beeinträchtigen.

Da bei der Hälfte der Patienten mit septischem Schock Adenosinkonzentrationen im Plasma vorliegen, die nicht ausreichen, um die zytotoxische Produktion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> halbmaximal zu hemmen, erscheint die Applikation von Adenosin bei genau diesem Patientenkollektiv sinnvoll zu sein.

Weiterführende Studien werden prüfen müssen, ob eine Infusionsbehandlung mit Adenosin bei Patienten mit einer septischen Granulozytendysfunktion tatsächlich geeignet ist, die überschüssige Freisetzung potentiell gewebeschädigender Superoxidanionen selektiv zu hemmen.



## 7 VORVERÖFFENTLICHTE TEILASPEKTE DER DISSERTATION

INES KAUFMANN, ALWIN HOELZL, FLORIAN SCHLIEPHAKE, THERESIA HUMMEL,

ALEXANDER CHOUKER, LIDIA ŁYSENKO, KLAUS PETER, AND MANFRED THIEL

Effects of adenosine on functions of polymorphonuclear leukocytes from septic shock patients.

Shock, in press, 2006.

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

1. Abraham E  
Why immunomodulatory therapies have not worked in sepsis.  
Intensive Care Med 25: 556-566, 1999
  
2. Adrie C, Pinsky MR  
The inflammatory balance in human sepsis.  
Intensivmed 36: 419-428, 1999
  
3. Aggarwal A, Wartier DC  
Adenosine: present uses, future indications.  
Curr Opin Anaesthesiol 7: 109-122, 1994
  
4. Anon 2003  
British National Formula / BNF 45: 72, 2003  
Published by:  
British Medical Association, London, Grossbritannien, and the Royal Pharmaceutical  
Society of Great Britain, London, Grossbritannien
  
5. Baue AE  
Multiple organ failure - the discrepancy between our scientific knowledge and  
understanding and the management of our patients.  
Langenbeck's Arch Surg 385: 441-453, 2000

6. Belardinelli L, Shryock JC, Snowdy S, Zhang Y, Monopoli A, Lozza G, Ongini E, Olsson RA, Dennis DM  
The A<sub>2A</sub> adenosine receptor mediates coronary vasodilation.  
J Pharmacol Exp Ther 284: 1066-1073, 1988
  
7. Bellingan G  
Leukocytes: friend or foe.  
Intensive Care Med 26: S111-S118, 2000
  
8. Bone RC, and the American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference Committee  
Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis.  
Critical Care Medicine 20 (6):864 – 874, 1992
  
9. Bone RC  
Sepsis and SIRS.  
Nephrol Dial Transplant 9 (Suppl. 4): 99-103, 1994
  
10. Brigham KL  
Oxygen radicals – an important mediator of sepsis and septic shock.  
Klin Wochenschr 69: 1004-1008; 1991
  
11. Chern YJ, Lai HL, Fong JC, Liang Y  
Multiple mechanisms for desensitization of A<sub>2A</sub>-adenosine receptor-mediated cAMP elevation in rat pheochromocytoma PC12 cells.  
Mol Pharmacol 44:950-958, 1993

12. Cronstein BN, Kramer Sb, Weissmann G, Hirshhorn R  
Adenosin: a physiological modulator of superoxide anion generation by human neutrophils.  
J Exp Med 158: 1160–1177, 1983
  
13. Cronstein BN; Levin RI; Belanoff J; Weissmann G; Hirschhorn R  
Adenosine: an endogenous inhibitor of neutrophil-mediated injury to endothelial cells.  
J Clin Invest 78(3): 760-770, 1986
  
14. Cronstein BN, Kubersky SM, Weissmann G, Hirschhorn R  
Engagement of adenosine receptors inhibits hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-) release by  
activated human neutrophils.  
Clin Immunol Immunopathol 42: 76-85, 1987
  
15. Cronstein BN, Levin RI, Philips M, Hirschhorn Rochelle, Abramson SB, Weissmann G  
Neutrophil adherence to endothelium is enhanced via adenosine A<sub>1</sub> receptors and inhibited  
via A<sub>2</sub> receptors.  
J Immunol 148 (7): 2201-2206, 1992
  
16. Crow JP  
Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are sensitive indicators of  
peroxynitrite in vitro: Implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and  
oxygen species.  
Nitric Oxide: Biol Chem 1 (2): 145-157, 1997
  
17. Dallegri F, Ottonello L  
Tissue injury in neutrophilic inflammation.  
Inflamm Res 46: 382-391, 1997

18. Fattorossi A, Nisini R, Pizzolo JG, D'Amelio R  
New, simple flow-cytometry technique to discriminate between internalized and membrane-bound particles in phagocytosis.  
Cytometry 10: 320-325, 1989
  
19. Follin P, Dahlgren C  
Phagocytosis by lipopolysaccharide-primed human neutrophils is associated with increased extracellular release of reactive oxygen metabolites.  
Inflammation 16:83-91, 1992
  
20. Fredholm BB  
Purines and neutrophil leukocytes.  
Gen Pharmac 28(3): 345-350, 1997
  
21. Fredholm BB, Arslan G, Halldner L, Kull B, Schulte G, Wassermann W  
Structure and function of adenosine receptors and their genes.  
Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 362 (4-5): 364-374, 2000
  
22. Goode HF, Webster NR  
Free radicals and antioxidants in sepsis.  
Critical Care Medicine 21(11): 1770-1776, 1993
  
23. Greg SM, Mannino DM, Eaton S, Moss M  
The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000.  
New Engl J Med 348: 1546-1554, 2003
  
24. Hed J  
Methods for distinguishing ingested from adhering particles.  
Methods Enzymol 132: 198-204, 1986

25. Heintelmann M, Gardner SA, Mercer-Jones M, Roll AJ, Polk HC  
Quantification of phagocytosis in human neutrophils.  
Microbiol Immunol 43: 505-512, 1999.
26. Hiramoto R, Bernecky J, Jurand J, Hamlin M  
The effect of hydrogen ion concentration on fluorescent labeled antibodies.  
J Histochem Cytochem 12:271-274, 1964
27. Jabs CM, Sigurdsson GH, Neglen P  
Plasma levels of high-energy compounds compared with severity of illness in critically ill patients in the intensive care unit.  
Surgery 124(1): 65-72, 1998
28. Jacobi J  
Pathophysiology of sepsis.  
Am J Health-Sys Pharm 59(Suppl 1): S3-S8, 2002
29. Karow T, Lang-Roth R  
Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie.  
Dr. Thomas Karow, Pulheim, Deutschland, 10. Auflage, 107 ff.
30. Khadaroo R, Marshall JC  
ARDS and the Multiple Organ Dysfunction Syndrome.  
Crit Care Clin 18 (1): 127-141, 2002
31. Linden J  
Molecular approach to adenosine receptors: receptor-mediated mechanisms of tissue protection.  
Ann Rev Pharmacol Toxicol 41: 775-787, 2001

32. Maguire MH, Szabo I, Valko IE, Finley BE, Bennett TL  
Simultaneous measurement of adenosine and hypoxanthine in human umbilical cord plasma using reversed-phase high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection and on-line validation of peak purity.  
J Chromatogr B Biomed Sci Appl 707(1-2): 33-41, 1998
  
33. Martin C, Leone M, Vivand X, Ayem ML, Guieu R  
High adenosine plasma concentrations as a prognostic index for outcome in patients with septic shock.  
Crit Care Med 28 (9): 3198-3202, 2000
  
34. Martins PS, Kallas EG, Neto MC, Dalboni MA, Blecher S, Salomo R  
Upregulation of reactive oxygen species generation and phagocytosis, and increased apoptosis in human neutrophils during severe sepsis and septic shock.  
Shock 20:208-212, 2003
  
35. Newby AC  
Adenosine and the concept of retaliatory metabolites.  
Trends Biochem Sci 9: 42-44, 1984
  
36. Nussler AK, Wittel UA, Nussler NC, Beger HC  
Leukocytes, the Janus cells in inflammatory disease.  
Langenbeck's Arch Surg 384: 222-32; 1999
  
37. Olah ME, Stiles GL  
Adenosine receptor subtypes: characterization and therapeutic regulation.  
Ann Rev Pharmacol Toxicol 35: 581-606, 1995

38. Ontyd J, Schrader J  
Measurement of adenosine, inosine, and hypoxanthine in human plasma.  
J Chromat 307: 404-409, 1984
39. Palmer TM, Stiles GL  
Identification of an A<sub>2a</sub> adenosine receptor domain specifically responsible for mediating short-term desensitization.  
Biochemistry 36: 832-838, 1997
40. Parker SJ, Watkins PE  
Experimental models of gram-negative sepsis.  
Br J Surg 88: 22-30, 2001
41. Parmely MJ, Zhou WW, Edwards CK, Borcharding DR, Silverstein R, Morrison DC  
Adenosine and a related carbocyclic analogue selectively inhibit tumor necrosis factor- $\alpha$  production and protect mice against endotoxin challenge  
J Immunol 151: 389-396, 1993
42. Pascual C, Karzai W, Meier-Hellmann A, Bredle DL, Reinhart K  
A controlled study of leukocyte activation in septic patients.  
Intensive Care Med 23: 743-748, 1997
43. Pasini FL, Guideri F, Picano E, Parenti G, Petersen C, Varga A, Di Perri T  
Increase in plasma adenosine during brain ischemia in man: A study during transient ischemic attacks, and stroke.  
Brain Res Bull 51(4): 327-330, 2000
44. Peralta JG; Llesuy S; Evelson P; Carreras MC; Flecha BG; Poderoso JJ  
Oxidative stress in skeletal muscle during sepsis in rats.  
Circ Shock 39(2): 153-159, 1993



45. Ramkumar V, Hallam DM, Zhongzhen N  
Adenosine, Oxidative Stress and Cytoprotection.  
Jpn J Pharmacol 86: 265-274, 2001
46. Rothe G, Valet G  
Flow cytometric assays of oxidative burst activity in phagocytes.  
Methods Enzymol 233: 539-548, 1994
47. Sands KE, Bates DW, Lanken PN, Graman PS, Hibberd PL, Kahn KL, Parsonnet J, Panzer R, Orav EJ, Syndman DR, Black E, Schwartz JS, Moore R, Johnson Jr BL, Platt R and the Academic Medical Center Consortium Sepsis Project Working Group  
Epidemiology of sepsis syndrome in 8 academic medical centers.  
JAMA 278(3): 34-40, 1997
48. Sitkovsky MV, Lukashev D, Apasov S, Kojima H, Koshiba M, Caldwell C, Ohta A, Thiel M  
Physiological control of immune response and inflammatory tissue damage by hypoxia-inducible factors and adenosine A<sub>2A</sub> receptors.  
Ann Rev Immunol 22: 657-682, 2004
49. Skubitz KM, Wickham NW, Hammerschmidt DE  
Endogenous and exogenous adenosine inhibits granulocyte aggregation without altering the associated rise in intracellular calcium concentration.  
Blood 72 (1): 29-33, 1988
50. Solberg CO, Hellum KB  
Neutrophil granulocyte function in bacterial infections.  
Lancet 2: 727-730, 1972

51. Stevens P, Hong D  
The role of myeloperoxidase and superoxide anion in the luminol and lucigenin-dependent chemiluminescence of human neutrophils.  
Microchem J 30: 135-146, 1984
  
52. Sullivan GW, Guodong F, Linden J, Scheld M  
A<sub>2A</sub> adenosine receptor activation improves survival in mouse models of endotoxemia and sepsis.  
J Infect Dis 189: 1897-904, 2004
  
53. Sundaram U, Hassanain H, Suntres Z, Yu JG, Cooke HJ, Guzman J, Christofi FL  
Rabbit chronic ileitis leads to up-regulation of adenosine A<sub>1</sub>/A<sub>3</sub> gene products, oxidative stress, and immune modulation.  
Biochem Pharmacol 65: 1529-1538, 2003
  
54. Thiel M  
Therapie der Leukozytendysfunktion bei Sepsis.  
Intensivmed 33: 386-398, 1996
  
55. Thiel M  
[Inflammation and immunoparalysis. What are the differential criteria?].  
Anästhesist 49: 466-471, 2000
  
56. Thiel M, Bardenheuer H  
Regulation of oxygen radical production of human polymorphonuclear leukocytes by adenosine: the role of calcium.  
Pflügers Arch 420: 522-528, 1992

57. Thiel M, Chouker A  
Acting via A<sub>2</sub> receptors, adenosine inhibits the production of tumor necrosis factor- $\alpha$  of endotoxin-stimulated human polymorphonuclear leukocytes.  
J Lab Clin Med 126 (13): 275-282, 1995
58. Thiel M, Chouker A, Ohta A, Jackson E, Caldwell C, Smith P, Lukashev D, Bittmann I, Sitkovsky MV  
Oxygenation inhibits the physiological tissue-protecting mechanism and thereby exacerbates acute inflammatory lung injury.  
PLoS Biol 3: 1088-1100, 2005
59. Thiel M, Holzer K, Kreimeier U, Moritz S, Peter K, Messmer K  
Effects of adenosine on the functions of circulating polymorphonuclear leukocytes during hyperdynamic endotoxemia.  
Infect Immun 65: 2136 – 2144, 1997
60. Thiel M, Kreimeier U, Holzer K, Moritz S, Peter K, Messmer K  
Effects of adenosine on cardiopulmonary functions and oxygen-derived variables during endotoxemia.  
Crit Care Med 26 (2): 322-337, 1998
61. Tjardes T, Neugebauer E  
Sepsis research in the next Millenium: Concentrate on the software rather than the hardware.  
Shock 17(1): 1-8, 2002
62. Tschaikowsky K, Sittl R, Braun GG, Hering W, Rügheimer E  
Increased fMet-Leu-Phe receptor expression and altered superoxide production of neutrophil granulocytes in septic and posttraumatic patients.  
Clin Investig 72:18-25, 1993

63. Van Belle H, Goossens F, Wynants J  
Formation and release of purine catabolites during hypoperfusion, anoxia, and ischemia.  
Am J Physiol 252:H886-H893, 1987
64. Yao YM, Redl H, Bahrami S, Schlag G  
The inflammatory basis of trauma/shock-associated multiple organ failure.  
Inflamm Res 47:201-210, 1998
65. Zallen G, Moore EE, Johnson JL, Tamura DY, Aiboshi J, Biffi WL, Silliman CC  
Circulating postinjury neutrophils are primed for the release of proinflammatory cytokines.  
J Trauma 46:42-48, 1999

## 9 ANHANG

### ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

- APNEA N<sup>6</sup>-2-(4-Amino-3-[<sup>125</sup>I]Iodophenyl)-Ethyladenosin
- PAPA-APEC [<sup>125</sup>I]-2-[4-[2-[2-[Phenylmethylcarbonylamino]Ethylaminocarbonyl]Ethyl]Phenyl]Ethylamino-5'-N-Ethylcarboxamidoadenosine
- [<sup>3</sup>H]MRE3008F20 [<sup>3</sup>H]-5-N-(4-methoxyphenylcarbonyl)amino-8-ethyl-2-(2-furyl)pyrazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5 c]pyrimidine
- 2-Cl-ADO 2-Chloroadenosin
- 8PT 8-phenyltheophyllin
- ACCP/SCCM American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference
- ADO: Adenosin
- ARDS: Adult Respiratory Distress Syndrome
- ATP Adenosintriphosphat
- bzw. beziehungsweise
- CCPA: 2-chloro-N<sup>6</sup>-cyclopentyladenosine
- CGS 21680 (2-p-carboxyethyl)phenylamino-5'-N-carboxamidoadenosine hydrochloride
- CHA N<sup>6</sup>-cyclohexyladenosine
- CPA N<sup>6</sup>-cyclopentyladenosin
- CPCA 5'-(N-Cyclopropyl)-Carboxiamido-Adenosin
- CRP C-reaktives Protein
- CV1808 2-Phenylaminoadenosin
- DAG Diacylglycerin

- DHR 123 Dihydrorhodamin 123
- DMF Dimethylformamid
- DPCPX 8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthin
- FACS Fluorescence-activated Cell Sorter
- FITC Fluoresceinisothiocyanat
- FMLP N-Formyl-methionyl-1-leucyl-1-phenylalanin
- HBSS Hanks Balanced Salt Solution
- HPLC High performance liquid chromatography
- IL-6 Interleukin 6
- IP<sub>3</sub> Inositoltriphosphat
- KRP Phosphatgepufferte Krebs-Ringer-Lösung
- LPS Lipopolysaccharid
- MRE3005F20 5-N-(4-methoxyphenylcarbamoyle)amino-8-ethyl-2-(2-furyl)pyrazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5 c]pyrimidine
- MRE3008F20 5-N-(4-methoxyphenylcarbamoyle)amino-8-ethyl-2-(2-furyl)pyrazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5 c]pyrimidine
- MRS1220 5-phenylacetylamino-9-chloro-2-(2-furyl)-1,2,4-triazolo[1,5 c]quinazolin
- NADPH Nikotin-Adenin-Dinukleotidphosphat-Oxidase
- NECA 5'-N-Ethylcarboxamidoadenosin
- PBS: Phosphatpufferlösung
- PCT Procalcitonin
- PI: Propidiumiodid
- PLA<sub>2</sub> Phospholipase A<sub>2</sub>
- PLC Phospholipase C
- PLD Phospholipase D
- PMA: Phorbol-12-myristat-13acetat
- PMNL: Polymorph nuclear Leucocytes
- R-PIA (-)-N<sup>6</sup>-(R-Phenylisopropyl)Adenosin
- SIRS Systemic inflammatory response syndrome

- S-PIA                                    (+)-N<sup>6</sup>-(R-Phenylisopropyl)Adenosin
- TNF- $\alpha$ :                                    Tumornekrosefaktor- $\alpha$
- vs.                                            versus
- z.B.                                            zum Beispiel

## GERÄTE UND MATERIALIEN

### Geräte:

- Coulter Multisizer II, Coulter Electronics LTD, Luton UK
- Durchflußzytometer: FACScan, Becton und Dickinson Immuncytometry Systems, San Jose, California, Standardisierung mittels YG-Calibration-Beads, FACScan Research Software Version 2.1, 1989, Datenakquisition im Listenmodus unter den jeweils angegebenen Einstellungen. Bestimmung folgender Parameter:
- Varifuge 3.OR, Heraeus Sepatech Instruments, Osterode, Deutschland
- Heizblock RT3 Grant Instruments Cambridge LTD, GB
- Ultraschallbad Sonorex Super RK 510 H, Firma Bandelin electronic
- stufenlos verstellbarer Reagenzschüttler
- Verstellbare Pipetten der Firma Eppendorf, Hamburg, in den Größen 0,5-10 $\mu$ l, 10-100 $\mu$ l und 250-1000 $\mu$ l .
- Eppendorf Multipipette für Multipipettenspitzen von 0,5-5ml Fassungsvermögen

### Materialien:

- Dihydrorhodamin 123: Fluoreszenzfarbstoff, lichtempfindlich, zur quantitativen Darstellung von intrazellulärer Wasserstoffperoxydproduktion. Firma MoBiTec, Göttingen, Deutschland.
- YG-Beads: Fluoresbrite Carboxylate Microspheres 4,5  $\mu$ m YG-Beads, synthetische FACS Kalibrationssubstanz, Verdünnung 1:50 mit PBS.
- N-Formyl-methionyl-1-leucyl-1-phenylalanin: Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland.

- Tumornekrosefaktor- $\alpha$ : Firma Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland. Enthält TNF- $\alpha$ , PBS / Phosphatpufferlösung und bovines Serumalbumin.
- Propidiumiodid: Firma Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland.
- Adenosin: Firma Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland.
- CGS 21680: Firma Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland.
- CCPA: Firma Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland.
- Zymosan A: Firma Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland.
- Coulter Counter Calibration Beads, Firma Coulter Electronics LTD, Luton UK.
- Combitips für Eppendorf-Multipipette in den Größen: 0,5 ml, 1ml, 10 ml, Firma Eppendorf, Hamburg
- Polypropylenröhrchen 12x75mm, 6ml, Becton und Dickinson, Niederlassung Heidelberg
- Pipettenspitzen für Eppendorfpipetten der Größen: 0,5-10 $\mu$ l, 10-100 $\mu$ l und 250-1000 $\mu$ l, Firma Eppendorf, Hamburg
- Eppendorfhütchen der Größen 1,5 und 2ml, bei DHR lichtgeschützt, braun, Firma Eppendorf, Hamburg
- Histopaque 1.077. Dichtegradient, Firma Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland, Polysaccharose und Natriumdiatrizoat, steril und pyrogenfrei.
- HBSS / Hanks Balanced Salt Solution, Firma Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland: 10 mM Hepeslösung mit pH = 7,40, Na<sup>+</sup> 8,0, ohne Phenolrot, steril und pyrogenfrei. Basislösung: HBSS-Trockenpulver + 5 ml Hepeslösung 2M + 1l Aqua dest. + 2 ml Natronlauge NaOH 2M.
- FACSFLOW: Firma Becton und Dickinson Immuncytometry Systems, San Jose, California.
- Vetren 200: 2ml Heparin mit 200 IE, Firma Ratiopharm, Deutschland.
- Coulter Counter, Firma Coulter Electronics LTD, Luton, UK, Trägerflüssigkeit zur Zellzählung.
- Hepeslösung 2 M : 14g/l NaOH: pH 7,0, Firma Serva, Heidelberg, Deutschland.



## **10 DANKSAGUNG**

Hiermit möchte ich folgenden Personen meinen Dank für ihre Hilfe bei der Erstellung dieser Arbeit aussprechen: Prof. Dr. Manfred Thiel, Dr. Ines Kaufmann und Dr. Alexander Chouker, denn ohne sie wäre diese Arbeit nicht entstanden, den technischen Assistenten und Assistentinnen im Labor der anästhesiologischen Forschung im Klinikum Großhadern für Rat und Tat, und nicht zuletzt meiner Frau Jana, die ich ohne diese Arbeit nicht kennengelernt hätte, und deren Geduld oft auf eine harte Probe gestellt wurde.

Für die Mitwirkung an dieser Studie bedanke ich mich auch bei allen beteiligten Patienten und deren Angehörigen – ohne sie wäre diese Studie nicht möglich gewesen.

## 11 LEBENSLAUF

### PERSÖNLICHE DATEN:

Name:	Hölzl
Vornamen:	Alwin Jürgen
Geburtsdatum:	23.Mai1969
Geburtsort:	München
Familienstand:	verheiratet, ein Kind
Anschrift:	Dawson House Flat 5 481 Beverly Road Hull HU6 7LJ Großbritannien

### SCHULBILDUNG:

1975-1979:	Grundschule in Neufahrn bei Freising
1980-1989:	Gabelsberger Gymnasium Mainburg
1989:	Abitur

### ZIVILDIENTST:

1990-1992:	15 Monate Pflegedienst in der Chirurgie des Kreiskrankenhauses in Dingolfing
------------	---------------------------------------------------------------------------------

STUDIUM:

1997:	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
1999:	Physikum
2000:	Erstes Staatsexamen
2002:	Zweites Staatsexamen
2002-2003:	Praktisches Jahr
2003:	Drittes Staatsexamen und Abschluss an der Ludwig-Maximilians-Universität München, Erlangung der Teilapprobation
2005	Erlangung der ärztlichen Vollapprobation

PROMOTION:

1999-2006:	Anästhesiologische Forschung, Klinikum Großhadern, München: Modulation von polymorphkernigen Leukozyten durch das Adenosin A <sub>2A</sub> -Rezeptorsystem bei Patienten mit Sepsis.
------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

BERUFLICHE LAUFBAHN:

1992-1995:	Ausbildung zum Krankenpfleger, Krankenpflegeschule Vilsbiburg des Landkreises Landshut
1995:	Staatsexamen Krankenpflege
1995-1997:	Krankenpfleger, medizinische Intensivstation F2B/C, Klinikum Großhadern, München.
1997-2000:	Krankenpfleger, anästhesiologische Intensivstation, Chirurgische Klinik Dr. Rinecker, München.

2000-2001:	Krankenpfleger, anästhesiologische Intensivstation, Krankenhaus der Barmherzigen Brüder, München.
2003-2005:	Pre-Registration House Officer Hull Royal Infirmary, Hull University, Großbritannien.
2005:	Beginn der Ausbildung zum General Practitioner, Leeds Metropolitan University.
2005-2006:	Senior House Officer Hull Royal Infirmary, Hull University, Großbritannien.