

Aus der Klinik für Anaesthesiologie – Klinikum Großhadern  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. B. Zwissler

**Funktionelle Adenosinrezeptorexpression auf  
polymorphkernigen Leukozyten  
bei kardiochirurgischen Eingriffen  
mit der Herz-Lungen-Maschine**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Christoph Eisner  
München  
2008

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Manfred Thiel

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Stefan Linder

Prof. Dr. med. Christoph Nerl

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

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 26. Juni 2008

***Den Patienten  
und  
deren Angehörigen***

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>5</b>
<b>2</b>	<b>Hypothesen und Fragestellungen</b>	<b>14</b>
<b>3</b>	<b>Methodik</b>	<b>15</b>
<b>3.1</b>	<b>Studienkonzept</b>	<b>15</b>
<b>3.2</b>	<b>Methodische Grundlagen</b>	<b>18</b>
<b>3.3</b>	<b>Probenverarbeitung</b>	<b>23</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>28</b>
<b>4.1</b>	<b>Statistik</b>	<b>28</b>
<b>4.2</b>	<b>Patientencharakteristik</b>	<b>28</b>
<b>4.3</b>	<b><i>Ex vivo</i> Funktionen von PMNL</b>	<b>31</b>
<b>4.4</b>	<b>Plasmakonzentration von Adenosin</b>	<b>40</b>
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>41</b>
<b>5.1</b>	<b>Biphasische Granulozytendysfunktion während CPB</b>	<b>41</b>
<b>5.2</b>	<b>Selektive Modulation der Granulozytendysfunktion durch Adenosin</b>	<b>48</b>
<b>5.3</b>	<b>Der Adenosin A<sub>2A</sub>-Rezeptor vermittelt den Hemmeffekt von Adenosin</b>	<b>51</b>
<b>5.4</b>	<b>Desensitivierung des Adenosin A<sub>2A</sub>-Rezeptors während CPB</b>	<b>52</b>
<b>5.5</b>	<b>Plasmakonzentrationen von Adenosin</b>	<b>55</b>
<b>5.6</b>	<b>Einfluß der Anästhesie und anderer Variablen</b>	<b>56</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>57</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>60</b>
<b>7.1</b>	<b>Material</b>	<b>60</b>
<b>7.2</b>	<b>Dipyridamol-Stopplösung</b>	<b>63</b>
<b>7.3</b>	<b>Zyimosanformel</b>	<b>64</b>
<b>7.4</b>	<b>Geräteeinstellungen des Durchflußzytometers</b>	<b>64</b>
<b>7.5</b>	<b>Referenzmedikament</b>	<b>65</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>66</b>

## 1 Einleitung

Die Verwirklichung der Idee der Perfusion von Organen mit künstlich arterialisiertem Blut gelang mit dem Bau einer Herz-Lungen-Maschine (HLM) für den Einsatz des totalen kardiopulmonalen Bypasses (CPB). Am 6. Mai 1953 konnte mit der Anwendung eines totalen CPB durch John Heysham Gibbon jr. eine offene Herzoperation erstmalig erfolgreich durchgeführt werden (Miller, Gibbon et al. 1953). Trotz ihrer stetigen Weiterentwicklung bleibt der Einsatz der HLM mit einem gewissen Restrisiko verbunden. Aus einem Bericht der Society of Thoracic Surgeons National Database des Jahres 1999 geht hervor, dass 20 % der Patienten mit niedrigem Operationsrisiko postoperative Komplikationen entwickelten. Die Inzidenz eines Multiorganversagens (MOV) nach Einsatz des CBP lag bei 11 % (Grover 1999). Die Mortalitätsrate des MOV liegt bei 41 % (Kollef, Wragge et al. 1995). Bei herzchirurgischen Eingriffen erzeugt der ausgelöste Gewebeschaden eine starke systemisch wirksame inflammatorische Antwort (Laffey, Boylan et al. 2002) („systemic inflammatory response syndrome“(SIRS), Tab.1).

**Tabelle 1: Klinisch-diagnostische Klassifizierung der inflammatorischen Antwort (American College of Chest Physicians-Society of Critical Care Medicine Consensus Conference Committee von 1991) (Bone, Balk et al. 1992)**

<b>SIRS</b>	<u>zur Diagnosestellung müssen 2 oder mehr Kriterien zutreffen:</u> Temperatur > 38 °C oder < 36 °C Herzfrequenz > 90 Schläge/min Atemfrequenz > 20 Züge/min oder $p_a\text{CO}_2 < 32 \text{ mmHg}$ Leukozyten > 12.000, < 4.000/mm <sup>3</sup> oder > 10 % unreife Formen
<b>Sepsis</b>	SIRS mit dokumentierter Infektion
<b>schwere Sepsis</b>	Sepsis assoziiert mit Organdysfunktion, Hypoperfusion oder Hypotension
<b>septischer Schock</b>	Sepsis mit Hypotension trotz adäquater Volumentherapie zusammen mit der Präsenz von Perfusionsabnormalitäten
<b>MODS</b>	Status einer veränderten Organfunktion in einem akut kranken Patienten, in dem die Homöostase nicht ohne Eingreifen erhalten werden kann

Dieser Prozeß wird unspezifisch durch das chirurgische Trauma, den Blutverlust, die Bluttransfusionen, die Hypothermie und spezifisch durch Faktoren, die im Zusammenhang

mit dem CPB stehen, getriggert. Beim CBP trägt hauptsächlich die Kontaktaktivierung der Blutzellen mit fremden Oberflächen des Systems, der durch das aortale Cross-Klemmen entstehende Ischämie-Reperfusionsschaden an Organen wie Gehirn (Roach, Kanchuger et al. 1996) (Mangano 1997), Herz (Mangano 1997) (Westhuyzen, Cochrane et al. 1997), Lunge (Christenson, Aeberhard et al. 1996), Niere (Meldrum and Donnahoo 1999) (Mangano, Diamondstone et al. 1998) oder Leber (Yamashita, Wakiyama et al. 1998) und die durch Endotoxintranslokation bedingte indirekte Aktivierung der Entzündungskaskade (Takahashi, Kunimoto et al. 1996) (Martinez-Pellus, Merino et al. 1997) (Mollhoff, Loick et al. 1999) zur Entstehung eines SIRS bei (Abb. 1).

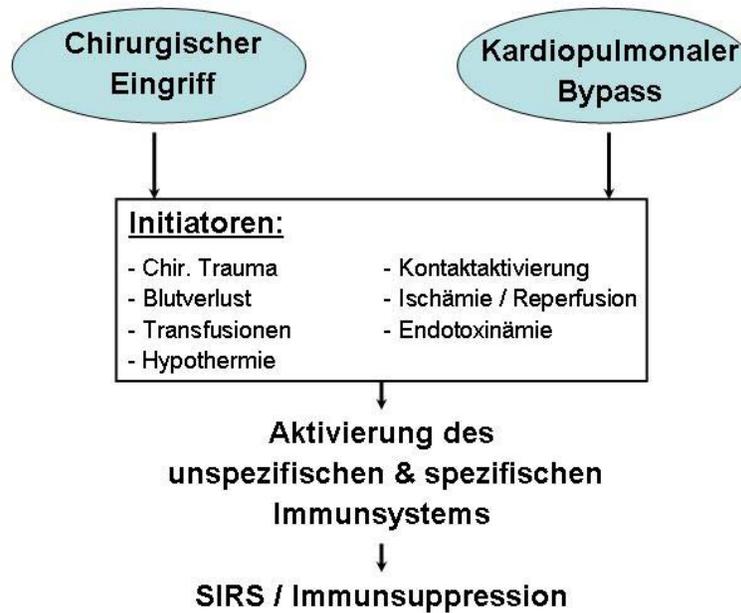
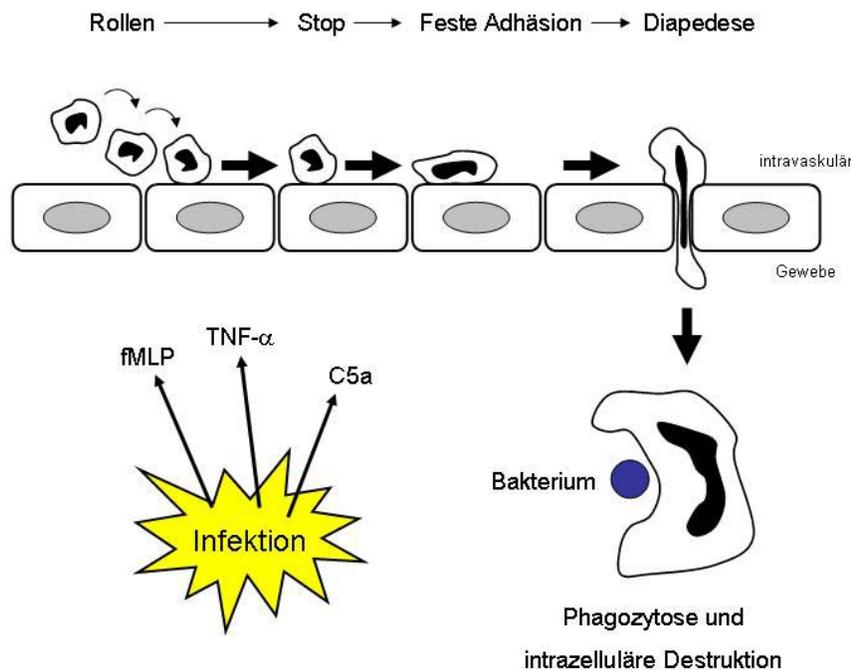


Abbildung 1: Entstehung eines SIRS bei Chirurgie mit CPB (Laffey, Boylan et al. 2002)

Im Rahmen der zellulären Antwort im Entzündungsprozess spielen die polymorphkernigen Leukozyten (PMNL) eine grundlegende Rolle. Sie gehören zum zellulären, angeborenen

Immunsystem des menschlichen Körpers und tragen in ihrer primären Funktion zur antimikrobiellen Abwehr bei. Schemenhaft lassen sich die für die Abtötung von Keimen aktivierten mikrobiziden Partialfunktionen der PMNL als orientierte Migration (Chemotaxis), Adhärenz an und Einschluß von Mikroorganismen in Phagosomen (Abb. 2), und deren anschließender Zerstörung durch Freisetzung von toxischen Sauerstoffradikalspezies (ROS), proteolytischen Enzymen und bakteriziden Proteinen ins Phago-lysosom, skizzieren (Witko-Sarsat, Rieu et al. 2000).



**Abbildung 2: Rekrutierung der Leukozyten an den Infektionsort**

Verantwortlich für die Entstehung von ROS ist das membranständige Enzym Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH) Oxidase (El-Benna, Dang et al. 2005). Die durch Rezeptor-vermittelte und -unabhängige (Bokoch 1995) angeregte Superoxidanionen-Produktion ( $O_2^{\cdot-}$ ) ist die Quelle aller ROS, die im Phagosom entstehen (El-Benna, Dang et

al. 2005). Das Superoxidanion wird entweder durch spontane oder enzymatische Dismutation in Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) umgewandelt. Wasserstoffperoxid produziert mit der Myeloperoxidase (MPO) und anderen Substanzen ( $Cl^-$ , Tyrosin,  $NO_2^-$ ) hochbakterizide Sauerstoffradikalspezies (Klebanoff 1999) und bildet somit vorrangig im Phagolysosom ein antimikrobielles System. Durch die Inversion der Zellmembran und Bildung von Phagosomen während der Phagozytose von Mikroorganismen wird ein möglicher Kollateralschaden an gesundem Gewebe durch ROS minimal gehalten (Kaufmann, Hoelzl et al. 2006).

Unter pathophysiologischen Bedingungen hingegen führen viele der im Rahmen einer systemischen Inflammation überschießend gebildeten Entzündungsmediatoren, wie der Tumornekrosefaktor (TNF)- $\alpha$  oder das Komplementanaphylaxtoxin C5a, aufgrund ihres löslichen Charakters nicht zu ihrer Aufnahme durch Phagozytose, sondern sie stimulieren die NADPH Oxidase auf der ganzen Zellmembran mit der Folge einer vermehrten Produktion von ROS in den extrazellulären Raum (Stevens P 1984). Durch verstärkte Anheftung von PMNL an das Gefäßendothel wird die extrazelluläre Freisetzung von proteolytischen Enzymen und Sauerstoffradikalen (von Andrian, Chambers et al. 1991) (Nathan, Srimal et al. 1989) noch weiter gesteigert. Somit besitzen PMNL, aufgrund ihrer für die Abtötung von Keimen mikrobiziden Partialfunktionen einerseits (Babior 2000) und der gleichzeitigen Fähigkeit, zytotoxische, potenziell gewebschädigende ROS in den Extrazellulärraum freizusetzen andererseits, eine ambivalente Rolle in der Abwehr von Mikroorganismen.

PMNL-Funktionen können und werden unter anderem durch das körpereigene Nukleosid Adenosin reguliert, wie auch eine Reihe anderer physiologischer Funktionen, wie z.B. der Gefäßtonus, die Herzkontraktilität, die Freisetzung von Neurotransmittern oder die Hemmung der Plättchenaggregation (Fredholm, AP et al. 2001). Adenosin wird intra- sowie extrazellulär gebildet und kann in fast allen Geweben, Zellen und Flüssigkeiten des

menschlichen Körpers nachgewiesen werden (Arch and Newsholme 1978) (Newby 1991). Die intrazelluläre Produktion kommt entweder durch die Dephosphorylierung von Adenosin-mono-phosphat (AMP) durch eine 5'-Nukleotidase (Schubert, Komp et al. 1979) (Zimmermann 1992) oder durch Hydrolyse von S-Adenosyl-Homocystein zustande (Ueland, Helland et al. 1984) (Abb. 3). Die extrazelluläre Freisetzung von Adenosin erfolgt unter normalen physiologischen Bedingungen sowie vermehrt unter hypoxischem, oxidativem und ischämischen Stress (Van Belle, Goossens et al. 1987) (Sollevi 1986) von geschädigten Zellen und Geweben (Cronstein, Kramer et al. 1983). Somit können erhöhte Adenosinplasmaspiegel ein Anzeichen für einen bestehenden inflammatorischen Vorgang im Körper sein. Durch die geringe Halbwertszeit von Adenosin von unter 10 Sekunden, bedingt durch die schnelle Aufnahme in Erythrozyten (Plagemann, Wohlhueter et al. 1985), der Desaminierung zu Inosin und Harnsäure (Abb. 3) und der Bindung an Rezeptoren, wirkt Adenosin lokal dort, wo es gebildet worden ist (Poulsen and Quinn 1998).

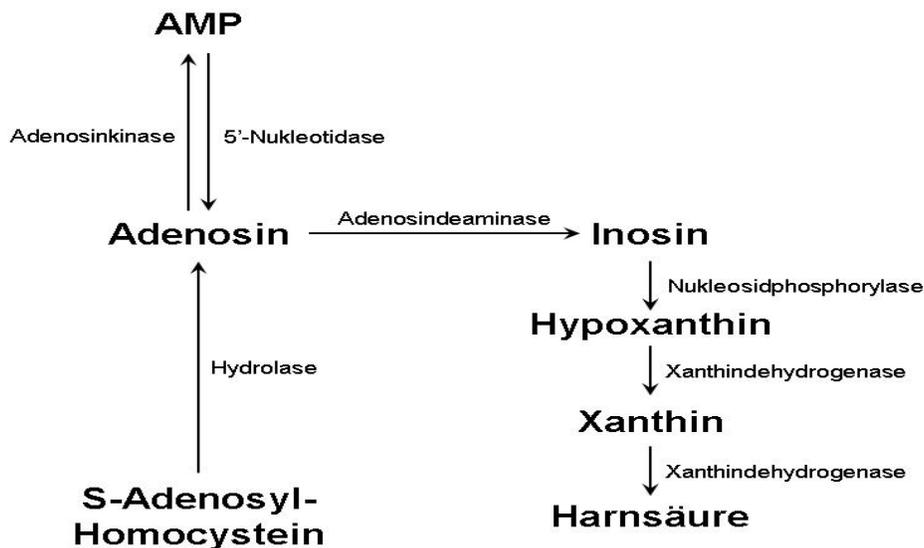


Abbildung 3: Adenosinmetabolismus

Als Hauptagonist gab Adenosin den Rezeptoren seinen Namen, über die es die meisten seiner Effekte ausübt (Fredholm, AP et al. 2001). Bisher wurden vier Rezeptoren (A<sub>1</sub>,

A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> und A<sub>3</sub>) klassifiziert, wobei A<sub>1</sub> und A<sub>2A</sub> hochaffine (K<sub>i</sub> im nanomolaren Bereich) und A<sub>2B</sub> und A<sub>3</sub> niedrigaffine (K<sub>i</sub> im mikromolaren Bereich) Rezeptoren für Adenosin sind (Tab. 2). Die Adenosinrezeptoren bestehen aus 7 transmembranalen  $\alpha$ -Helices mit einem extrazellulären N-terminalen Ende und intrazellulären C-terminalen Ende. Sie sind intrazellulär mit G-Proteinen gekoppelt, die ihrerseits aus einer  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit aufgebaut sind (Fredholm, AP et al. 2001). Je nach Rezeptortyp löst eine Aktivierung eine Erregung (G<sub>s</sub>) oder Hemmung (G<sub>i</sub>) der Adenylatzyklase (Effektorprotein) über die  $\alpha$ -Untereinheit aus mit nachfolgend gesteigerter oder erniedrigter Bildung von cAMP (intrazellulärer Botenstoff = second messenger). A<sub>1</sub> und A<sub>3</sub> Rezeptoren aktivieren auch die Phospholipase C, was zu einem intrazellulären Anstieg von Inositol 1,4,5-trisphosphat (IP<sub>3</sub>) und Kalzium führt. Zusätzlich werden durch den A<sub>1</sub> Rezeptor mehrere Typen von Kalium-Kanälen aktiviert und N-, P- und Q-Typ Kalzium-Kanäle inaktiviert (Fredholm, AP et al. 2001). Ferner wurde für A<sub>2B</sub> Rezeptoren eine intrazelluläre Mobilisation von Kalzium beschrieben (Fredholm, AP et al. 2001).

**Tabelle 2: Klassifizierung der Adenosinrezeptoren (Poulsen and Quinn 1998)**

	A <sub>1</sub>	A <sub>2A</sub>	A <sub>2B</sub>	A <sub>3</sub>
<b>Vorkommen</b>	Gehirn, Herz, Niere, Hoden, PMNL	Gehirn, Herz, Lunge, Thymus, Milz, PMNL	Intestinum, Blase, PMNL	Lunge, Leber, Gehirn, Niere, Herz, PMNL
<b>Agonismus (K<sub>i</sub>)</b>	Hoch(0,3-3nM): CPA Mittel(3-30nM): <u>Adenosin</u> Niedrig(30-350nM): DPMA	Hoch(1-20nM): <u>Adenosin</u> Mittel(20-200nM): ADAC Niedrig(200-500nM): CPA	Hoch(0,5-5 $\mu$ M): NECA Mittel(5-20 $\mu$ M): <u>Adenosin</u> Niedrig(20-100 $\mu$ M): S-PIA	Hoch(<10nM): APNEA Mittel(10-30nM): NECA Niedrig(>1 $\mu$ M): <u>Adenosin</u>
<b>Antagonismus (K<sub>i</sub>)</b>	Hoch(0,5-2nM): <u>DPCPX</u> Mittel(2-200nM): CPT Niedrig(1-20 $\mu$ M): IBMX	Hoch(20-100nM): <u>ZM241385</u> Mittel(0,2-2 $\mu$ M): DPCPX Niedrig(2-20 $\mu$ M): IBMX	Hoch(20-100nM): DPCPX Mittel(0,5-10 $\mu$ M): 8-p-SPT Niedrig(10-20 $\mu$ M): IBMX	Hoch(4nM): <u>VUF 5574</u> Niedrig(>100 $\mu$ M): DPCPX
<b>G-Protein</b>	G <sub>i</sub>	G <sub>s</sub>	G <sub>s</sub>	G <sub>i</sub>
<b>Effekte</b>	Adenylatzyklase: ↓ cAMP Phospholipase C: ↑ IP <sub>3</sub> , ↑ Ca <sup>2+</sup> Aktivierung Kalium-Kanäle Inaktivierung Ca <sup>2+</sup> -Kanäle	Adenylatzyklase: ↑ cAMP	Adenylatzyklase: ↑ cAMP  intrazell. Ca <sup>2+</sup> Mobilisation	Adenylatzyklase: ↓ cAMP Phospholipase C: ↑ IP <sub>3</sub> , ↑ Ca <sup>2+</sup>

Die physiologischen Reaktionen auf Adenosin sind komplexer Natur und hängen vom aktivierten Rezeptorsubtyp und von der Art und des Zustandes des Gewebes ab (Williams 1989). Es wird angenommen, dass die A<sub>1</sub> und A<sub>2A</sub> Rezeptoren komplementäre Rollen beim Energieangebot und -bedarf einer Zelle spielen (Bruns 1991). Bei erhöhtem Sauerstoffbedarf oder verminderter Sauerstoffversorgung kommt es durch den ATP-Metabolismus zu einem Anstieg des Adenosinspiegels. Durch Aktivierung von A<sub>1</sub> Rezeptoren wird der Sauerstoffbedarf gesenkt und über A<sub>2A</sub> Rezeptoren wird die Sauerstoffzufuhr erhöht. Dadurch spielt endogenes Adenosin eine wichtige Rolle bei der Verhinderung von Gewebeschäden durch Hypoxie, Ischämie, Hypotension und epileptische Anfälle (Berne and Rubio 1974) (Kleihues, Kobayashi et al. 1974) (Winn, Park et al. 1980) (Winn, Rubio et al. 1981) (Winn, Welsh et al. 1980). Weitere Effekte von endogenem Adenosin durch A<sub>1</sub> und A<sub>2</sub> Rezeptoren sind aus Tabelle 3 ersichtlich. Über die physiologische Signifikanz des A<sub>2B</sub>-Rezeptors gibt es aufgrund des Mangels an geeigneten Rezeptorliganden nur wenig Wissen. Es wird angenommen, dass er eine übergeordnete Funktion im Hinblick auf die Wiederbelebung der Organsysteme bei bedrohlichem Organversagen spielt (Bruns 1991). Der A<sub>3</sub>-Rezeptor spielt vermutlich eine Rolle in der Vermittlung allergischer Reaktion (Palmer and Stiles 1995) (Marquardt, Walker et al. 1994) und der Histaminfreisetzung durch Mastzelldegranulation (Fozard, Pfannkuche et al. 1996) (Hannon, Pfannkuche et al. 1995).

**Tabelle 3: Effekte auf Organsysteme durch Aktivierung von A<sub>1</sub> und A<sub>2A</sub> Rezeptoren (Poulsen and Quinn 1998)**

<b>Organsystem</b>	<b>physiologischer Effekt von endogenem Adenosin</b>
<b>ZNS</b>	Freisetzung von Neurotransmittern ↓, Antikonvulsion, Sedierung, Hypnose, Antinozizeption
<b>HerzKreislauf</b>	Vasodilatation, Hypotension, Rhythmus stabilisierend, negative Chrono-, Dromo- und Inotropie Plättchenaggregation ↓, PMNL Funktion ↓, NO ↑ durch endotheliale Zellen
<b>Niere</b>	Modulation der Reninfreisetzung, Glomeruläre Filtrationsrate ↓ durch Vasokonstriktion
<b>Leber</b>	Regulierung des hepatischen Blutflusses, Glukoneogenese ↑
<b>Immunsystem</b>	Immunsuppression, Lymphozytenproliferation ↓, Anti-Inflammation durch Modulierung der PMNL Funktion

Auf der Oberfläche der PMNL befinden sich A<sub>1</sub>- (Martini, Trincavelli et al. 1998), A<sub>2A</sub>-, A<sub>2B</sub>- (Fredholm, Zhang et al. 1996) und A<sub>3</sub>-Rezeptoren (Bouma, Jeunhomme et al. 1997) (Gessi, Varani et al. 2002), wobei ihre Expression sich hinsichtlich der Dichte unterscheidet. Die Aktivierung von A<sub>1</sub> Rezeptoren steigert die Chemotaxis (Falleni, Trincavelli et al. 1999) (Cronstein, Daguma et al. 1990) und Adhärenz an endotheliale Zellen, wohingegen A<sub>2A</sub> Rezeptoren den oxidativen Stoffwechsel reduzieren (Cronstein, Daguma et al. 1990). Dem A<sub>3</sub> Rezeptor wurde teilweise die Hemmung der Degranulation und ROS-Produktion von PMNL zugesprochen (Bouma, Jeunhomme et al. 1997) (Gessi, Varani et al. 2002). Somit vermag Adenosin, entweder durch erhöhte Spiegel im Plasma bei einer systemischen inflammatorischen Antwort des Körpers (Martin, Leone et al. 2000) oder durch lokal erhöhte Produktion bei direktem Endothelschaden (Pearson and Gordon 1985) (Newby and Holmquist 1981), einem weiteren Schaden am mikrovaskulären Endothelium entgegenwirken mit der Herunterregulierung zytotoxischer PMNL Funktionen einschliesslich der  $\beta_2$ -Integrin Expression (Thiel, Chambers et al. 1996), Adhäsion (Cronstein, Levin et al. 1992), Sauerstoffradikalproduktion (Cronstein, Rosenstein et al. 1985), Degranulation (Richter 1992) und Produktion von TNF- $\alpha$  (Thiel and Chouker 1995). Demzufolge kommt dem A<sub>2A</sub>-Rezeptor eine Schlüsselrolle als Sensor (für Adenosin und somit Zellschaden) und Terminator des proinflammatorischen Vorgangs zu, da die Anzahl der Rezeptoren pro Zelle das Ausmass der cAMP Bildung mitbestimmen (Armstrong, Chen et al. 2001) und eine zeitabhängige Hoch- und Herrunterregulierung von A<sub>2A</sub> Rezeptoren eine kontrollierte Immunsuppression ermöglicht. Inwiefern sich die Expression des A<sub>2A</sub>-Rezeptors und dadurch sein therapeutisches Potential in verschiedenen klinischen Szenarien, wie z.B. dem schweren Trauma, SIRS oder Sepsis, kurz- und langfristig ändert, ist noch weitgehend unerforscht.

In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb die Funktion der PMNL durch die laborexperimentelle Bestimmung der Adhäsion- und Phagozytosefähigkeit, der Phagozytose-assoziierten mikrobiziden H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion sowie der durch lösliche Stimuli (fMLP, TNF- $\alpha$ ) auslösbaren zytotoxischen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion von PMNL und deren Regulierung durch den A<sub>2A</sub> Adenosinrezeptor untersucht. Um von den dadurch *in vitro* gewonnenen Daten Schlüsse über die Auswirkung von endogenem Adenosin auf die PMNL ziehen zu können, wurden die dazugehörigen Plasmakonzentrationen von Adenosin bestimmt.

## 2 Hypothesen und Fragestellungen

In Anbetracht der physiologischen wie auch der pathophysiologischen Rolle von Adenosin und seiner modulierenden Wirkung auf PMNL, nahmen wir an, dass eine Operation mit der Herz-Lungen-Maschine, (i) die Funktion der PMNL dysreguliert, (ii) eine erhöhte Bildung an Adenosin induziert und (iii) die funktionelle Expression des A<sub>2A</sub>-Rezeptors auf den PMNL verändert.

Dementsprechend wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

1. Wie werden die mikrobiziden Partialfunktionen, die Adhäsion, Phagozytose und die Phagozytose-assoziierte Sauerstoffradikalproduktion sowie die extrazelluläre Freisetzung potentiell gewebschädigender Sauerstoffradikale (ROS) der PMNL durch den CPB beeinflusst?
2. Welche Auswirkungen hat Adenosin auf diese PMNL Funktionen *in vitro*?
3. Wie verändert sich die A<sub>2A</sub>-Rezeptorfunktion im Hinblick auf die Regulation der potentiell zytotoxischen Sauerstoffradikalproduktion bzw. wie verändert sich die funktionelle Expression des A<sub>2A</sub>-Rezeptors durch den CPB?
4. Wie verhalten sich die Plasmaspiegel von Adenosin im perioperativen Verlauf?

### **3 Methodik**

#### **3.1 Studienkonzept**

Die Daten der Patienten stammen aus einer unizentrischen, prospektiven, randomisierten, doppelblinden, Parallelgruppen-Studie der Pharmafirma Fresenius Kabi Austria GmbH mit der Studiennummer 01-OMVE-003. Die Studie untersuchte den Effekt einer perioperativen Infusion von  $\omega$ -3 Fettsäuren auf die postoperative systemische Inflammation bei herzchirurgischen Patienten. Es wurden 40 Patienten in die Studie eingeschlossen, wovon 20 als Studienmedikation 10 %  $\omega$ -3 Fettsäure und eine aus ebenfalls 20 Patienten bestehende Kontrollgruppe als Referenzmedikament eine 2,5 % Lipidemulsion erhielt. In der vorliegenden Dissertation wurde nur die Kontrollgruppe zur Datenanalyse und Beantwortung der Fragestellungen herangezogen. Die Genehmigung zur Durchführung der Studie wurde am 26. Oktober 2001 durch die unabhängige Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München erteilt. Durchgeführt wurde die Studie von der Klinik für Anaesthesiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München an der Stiftsklinik am Augustinum vom 9. Februar 2002 bis zum 18. Dezember 2002.

Es wurden Patienten im Alter zwischen 18 und 75 Jahren eingeschlossen, die sich einer elektiven koronaren Bypass-OP (CABG) unterzogen haben. Sie sollten 3 bis 5 CABGs bekommen, eine HLM-Dauer von über 1 Stunde und eine postoperative Intensivtherapie von mindestens 40 Stunden haben. Die Ausschlusskriterien sind aus Tabelle 4 ersichtlich.

Alle Patienten bekamen standardmäßig eine endotracheale Intubation sowie einen zentralen Venenkatheter, einen arteriellen Katheter (PICCO) und einen Blasenkatheter gelegt. Für die Einleitung der Narkose wurde allen Patienten das Opioid Sufentanil (0,7 - 2  $\mu$ g/kg KG i.v.), das Benzodiazepin Midazolam (10 - 15 mg i.v.) und das Muskelrelaxans Pancuronium (0,08 - 0,1 mg/kg KG i.v.) appliziert. Zur Aufrechterhaltung der Narkose wurden das volatile Anästhetikum Isofluran (1-2 % MAC) und Sufentanil (0,15 - 0,7  $\mu$ g/kg

KG) verwendet. Bei allen Operationen wurde eine Herz-Lungen-Maschine (Stöckert S3, Sorin Group GmbH) mit einem Membranoxygenator (Affinity NT 511T, Medtronic GmbH) eingesetzt.

**Tabelle 4: Ausschlusskriterien**

Allgemeine	Spezielle
Teilnahme an einer anderen klinischen Studie 1 Monat vor Studienbeginn	Bekannte Hypersensibilität gegenüber Bestandteilen der Studienmedikation
Psychiatrische Erkrankungen	Body Mass Index < 18 kg/m <sup>2</sup> oder > 30 kg/m <sup>2</sup> oder KG > 100kg
Epilepsie	Troponin I > 2,5 ng/ml
Verdacht auf Drogenabusus	Pseudo-Cholinesterase < 2500 U/l
derzeitiger Nikotinabusus	Aspartat-Amino - und/oder Alanin-Amino Transferase > 50 U/l
Alkoholabusus (tägliche Einnahme => 40 ml Ethanol)	Diag. Hypertriglyzeridämie und/oder TG > 250 mg/dl
Schwangerschaft	Bilirubin gesamt > 1,5 mg/dl
Frauen in der Stillzeit	Serum Kreatinin > 1,5 mg/dl
Einnahme von Kontrazeptiva	Thrombozyten < 150 x 10 <sup>9</sup> /l
Kooperationsunfähigkeit	Vorbestehender septischer Fokus oder SIRS
	Herzschrittmacherpatienten
	kürzlicher Myokardinfarkt
	instabile Angina pectoris
	dekompensiertes kongestives Herzversagen
	Angiographie innerhalb 24 Stunden vor Studienbeginn
	Immunsuppressive Therapie
	Ejektionsfraktion des linken Ventrikels weniger als 30 %

Die Patienten durchliefen in der Studie 6 Phasen mit 5 Messzeitpunkten (MZP). Es fanden insgesamt vier Infusionen der Studienmedikation in 4 aufeinander folgenden Tagen (Phase 2 bis Phase 5) statt, wobei mit der ersten die Phase 2 und mit der zweiten die Phase 3 beginnt. Die dritte Infusion wird am Tag der OP (Phase 4) vor Beginn des CPB und die vierte 24 Stunden nach OP-Ende mit Einsetzen der Phase 5 gestartet (Abb. 4).

Jedem Patienten wurden pro MZP 8 ml venöses Vollblut abgenommen, wovon 3 ml mit dem Antikoagulant Heparin ( $c_{\text{end}}$  10 IE/ml) und 5 ml mit 5 ml Dipyridamol-Stopplösung (Zusammensetzung siehe Anhang 7.2) vermischt worden sind. Bis zur Verarbeitung wurde das heparinisierte Blut auf Raumtemperatur und das 10 ml-Blutgemisch auf Eiswasser gehalten. Die 3 ml Vollblut dienen zur Gewinnung von leukozytenreichem Plasma. Aus

dem 10 ml Vollblut-Dipyridamol-Stopplösungsgemisch wurde nach Zentrifugation Blutplasma gewonnen. Die weitere Probenverarbeitung ist in Abbildung 5 ersichtlich.

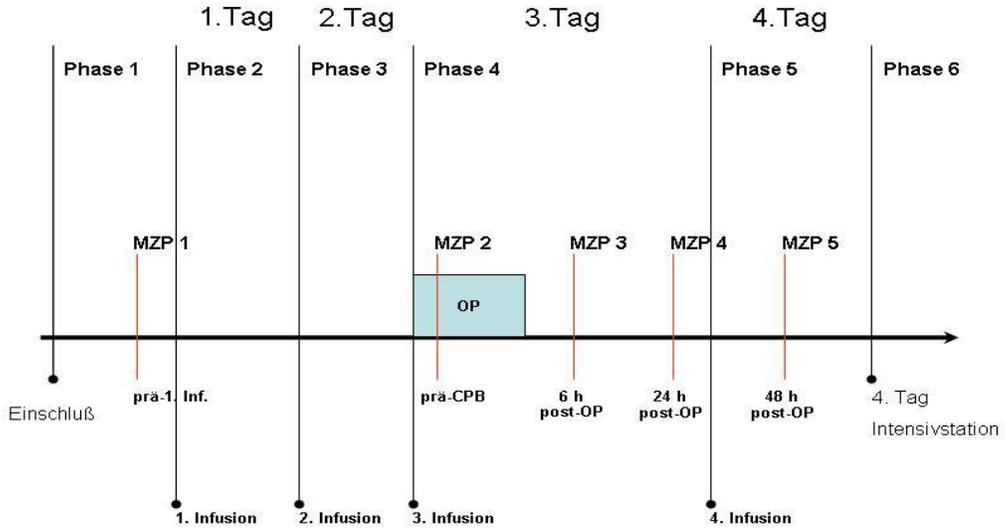


Abbildung 4: Zeitmodell der Omegavenstudie

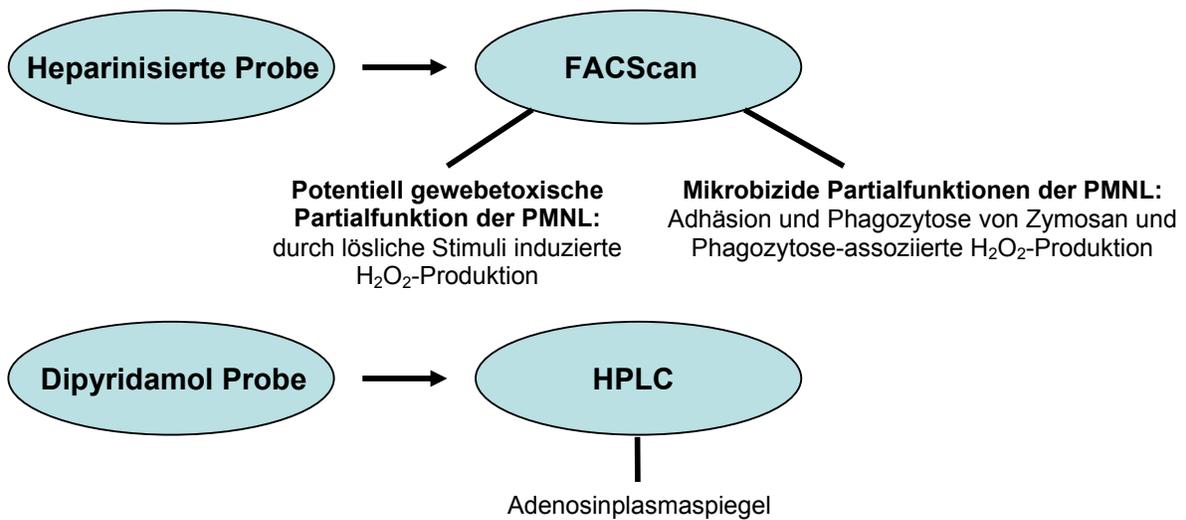


Abbildung 5: Probenverarbeitung

## 3.2 Methodische Grundlagen

### Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein optisches Messverfahren, bei dem Zellen bzw. Partikel anhand von ihrer Größe (Engwinkelstreulicht im FSC), Granularität (Seitwärtsstreulicht im SSC) und Immunfluoreszenz (durch dichrote Teilerspiegel aufgetrennte Fluoreszenzspektren im FL1, FL2, FL3) beurteilt werden können. Die Zellen werden mit einem luftgekühlten Argonionenlaser ( $\lambda = 488 \text{ nm}$ ), der monochromatisches kohärentes Licht liefert, in einer Meßküvette im rechten Winkel beleuchtet. Die Aufreihung der Zellen hintereinander, um sie einzeln zu messen, erreicht man mit der hydrodynamischen Fokussierung (Abb. 6). Das auf den Photomultipliern auftreffende optische Signal wird entweder in ein linear oder logarithmisch verstärktes elektronisches Signal umgewandelt. Die gemessenen Ereignisse werden in einer Dot Plot Graphik (2. Dimension) und in einem Histogramm (1. Dimension; Kanäle 0 - 1024) graphisch dargestellt (Abb. 7).

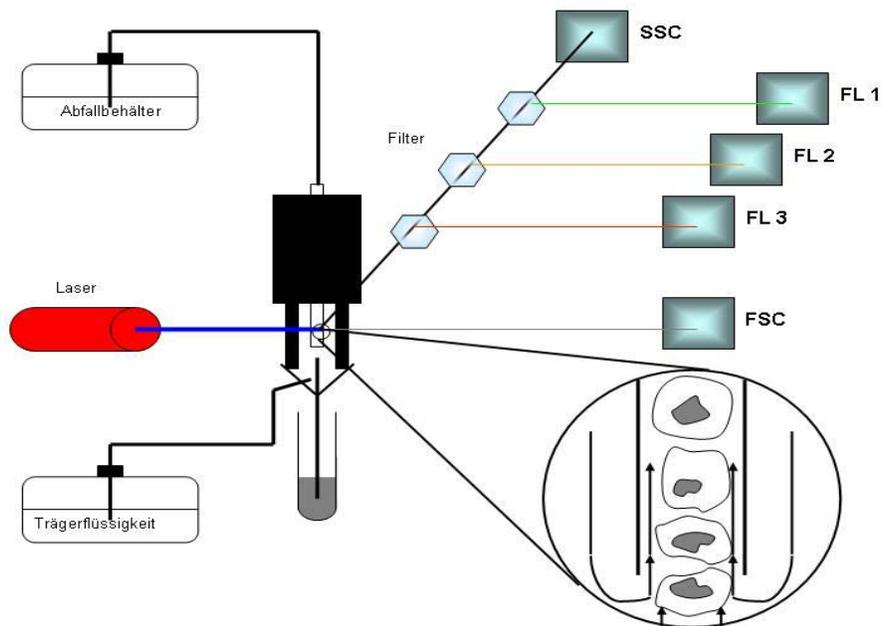
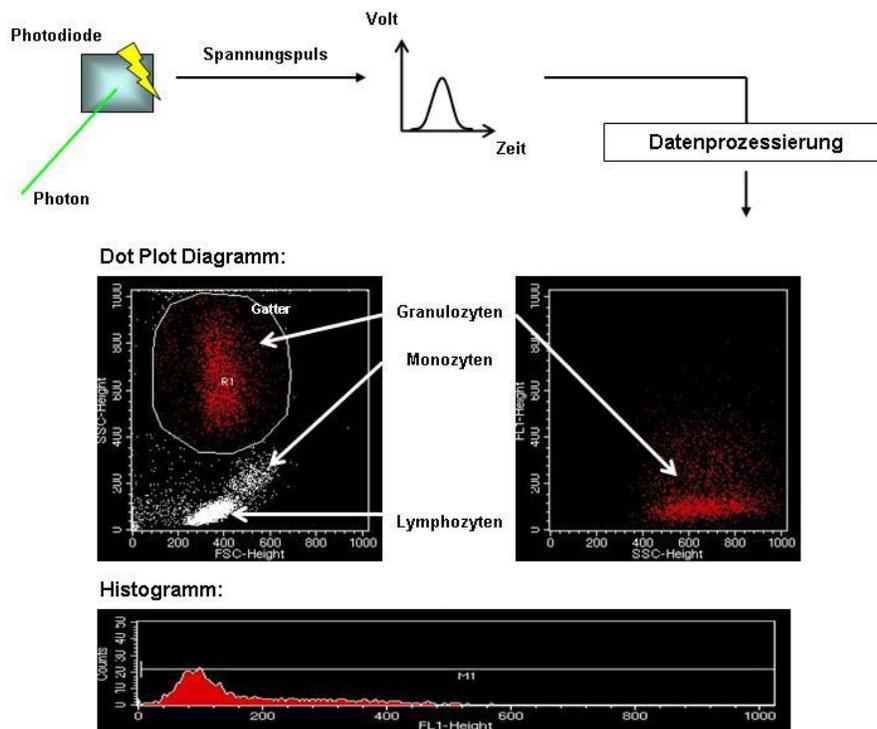


Abbildung 6: Messaufbau des Durchflusszytometers



**Abbildung 7: Datenerstellung anhand der Durchflusszytometrie**

Prinzip der Erfassung der Adhärenz- und Phagozytosefunktion von PMNL

Mikroorganismen werden von PMNL zuerst adhäriert, anschließend phagozytiert und dann im Phagolysosom durch den Phagozytose-assoziierten oxidativen Stoffwechsel abgetötet. Laborexperimentell wird in dem Modell nach Bellavite als Ersatz eines Mikroorganismus auf Zymosan, ein Zellwandpolysaccharid des Hefepilzes *Saccharomyces cerevisiae*, zurückgegriffen (Bellavite, Dri et al. 1983). Diese durch Hitze zerstörten Hefepartikel (Pillemer, Blum et al. 1956) sind homogen in ihrer Größe, aggregieren nicht, werden nicht durch Phagozyten lysiert und sind einfach in der Herstellung (Hed and Stendahl 1982). Das in HBSS gelöste Zymosan (c = 10 mg/ml) wird mit fluoreszierenden Farbstoff FITC kovalent markiert, dessen Emissionsspektrum nach Anregung im grünen Licht (FL1) liegt. Anhand der „Fluorescence Quenching“ Methode (FQ Methode) kann zwischen adhären

und phagozytierten FITC-markierten Partikel von PMNL unterschieden werden (Hed and Stendahl 1982). Die Intensität der Fluoreszenz von FITC wird durch azide pH-Wert Änderungen abgeschwächt (Lehmann, Sornes et al. 2000), und unter einem pH-Wert von 4 kann nach der FQ-Methode die Fluoreszenz ausgelöscht werden (Hiramoto, Bernecky et al. 1964). Dabei darf das Quenchingreagenz die Zellwand nicht passieren, damit das in der Zelle phagozytierte FITC die Fluoreszenz nicht verliert. Das FITC-markierte Zymosan (Bjerknes and Basso 1983) unserer Studie wurde durch Zugabe von 1 M HCl (1:100 zum Probenvolumen) in seiner Fluoreszenz ausgelöscht. Durch Messungen vor und nach Aufhebung der FITC-Fluoreszenz von adhärenem Zymosan, lässt sich der prozentuale Anteil zwischen adhärenen und phagozytierten Partikel im Histogramm des Kanals FL1 errechnen:

- phagozytierte Partikel = Messung nach Zugabe von HCL,
- adhärenente Partikel = Messung vor Zugabe von HCL - phagozytierte Partikel.

#### Prinzip der Messung der Wasserstoffperoxidproduktion von PMNL

Entstandenes  $H_2O_2$  kann durch Oxidation des ungeladenen, membrangängigen, nicht-fluoreszierenden, nicht-toxischen Indikatorfarbstoffes Dihydrorhodamin 123 (DHR) (Kinsey, Kassis et al. 1987) zu fluoreszierendem Rhodamin 123 (RHO), sensitiv nachgewiesen werden (Rothe, Oser et al. 1988). Wegen des elektrisch negativen Potentials der zytoplasmatischen sowie der mitochondrialen Membran akkumuliert das entstandene kationische Rhodamin durch seine Ladung intrazellulär (Rothe and Valet 1994). Der Nachweis der intrazellulären  $H_2O_2$ -Produktion durch DHR ist unabhängig von der Funktion der MPO, da die Oxidation von DHR durch die MPO mehr vom Substrat  $H_2O_2$  als vom Enzym selber abhängt (van Pelt, van Zwieten et al. 1996) (Walrand, Valeix et al. 2003), und somit spezifisch ist. Mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm fluoresziert RHO im

grünen Lichtspektrum (510 nm - 530 nm) und wird mit der Photomultiplieröhre FL1 des Durchflußzytometers erfasst. Abgestorbene Zellen in der Messprobe werden mit DNA Farbstoffen Propidiumjodid (FL3) (Rothe and Valet 1994) und LDS-751 (FL3) (Terstappen, Shah et al. 1988) gegengefärbt, um sie vom Signal der vitalen PMNL unterscheiden und in der Analyse exkludieren zu können. PMNL stellen sich im SSC zu FSC in ihrer typischen Weise dar (Abb. 7) und werden in ein Gatter gesetzt, um ihre Fluoreszenz im Histogramm auswerten zu können. Mit der Darstellung im Histogramm des Kanals FL1 erhält man den Mittelwert der relativen Fluoreszenzintensität der oxidativen Stoffwechselreaktion.

### HPLC

Die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) ist eine leistungsfähige physikalisch-chemische Methode zur Anreicherung und Trennung löslicher Stoffe. Dabei wird unter Hochdruck die gelöste Probensubstanz über eine Trennsäule (stationär) mit Hilfe einer flüssigen Phase (mobil) durch den Chromatographen transportiert und in einzelne Komponenten aufgetrennt. Die getrennten Substanzen werden in der Reihenfolge zunehmender Verzögerung detektiert (Substanz spezifische Retentionszeit) und ihre Konzentration in Abhängigkeit vom Elutionsvolumen (Fläche unter der Kurve = Integral des Peaks) ermittelt. Die Auswertung einer Probenanalyse findet anhand eines Chromatogramms statt (Abb. 8).

Signalgröße

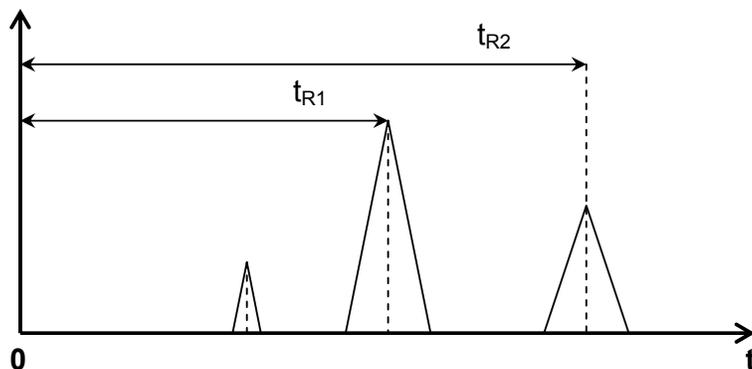


Abbildung 8: Chromatogramm der HPLC:  $t_{R1/2}$  = Retentionszeit für die Substanz 1/ Substanz 2

### Prinzip der Messung der Plasmaspiegel von Purinnukleosiden

Die schnelle Aufnahme von Adenosin in Erythrozyten kann durch Zusatz von Dipyridamol in der Stopplösung verhindert werden (Ontyd and Schrader 1984). Von dem gewonnenen Blutplasma (siehe 3.1) werden 2 ml mit 100  $\mu$ l Perchlorsäure 70 % versetzt und die dadurch denaturierten Proteine durch Zentrifugation entfernt. Die Neutralisation der deproteinisierten Proben wird durch Zugabe einer äquivalenten Menge an KOH erreicht. Die Konzentrationen von Adenosin wurde mit Hilfe der „dual column switching high performance liquid affinity chromatography (HPLAC)/reversed-phase“ HPLC Technik (Hagemeier, Kemper et al. 1983) gemessen. Dabei wird die HPLC Analyse mit einem Präfraktionierungsschritt (HPLAC) gekoppelt, bei dem Adenosin mit seinem cis-diol an eine Nitrophenylboratsäure-haltige Oberfläche (Trägersäule) bindet. Dadurch erhält man ein leistungstarkes und sensitives Chromatographie-System für die Analyse von cis-Diolen (z.B. Purinnukleoside) (Hagemeier, Kemper et al. 1983).

### 3.3 Probenverarbeitung

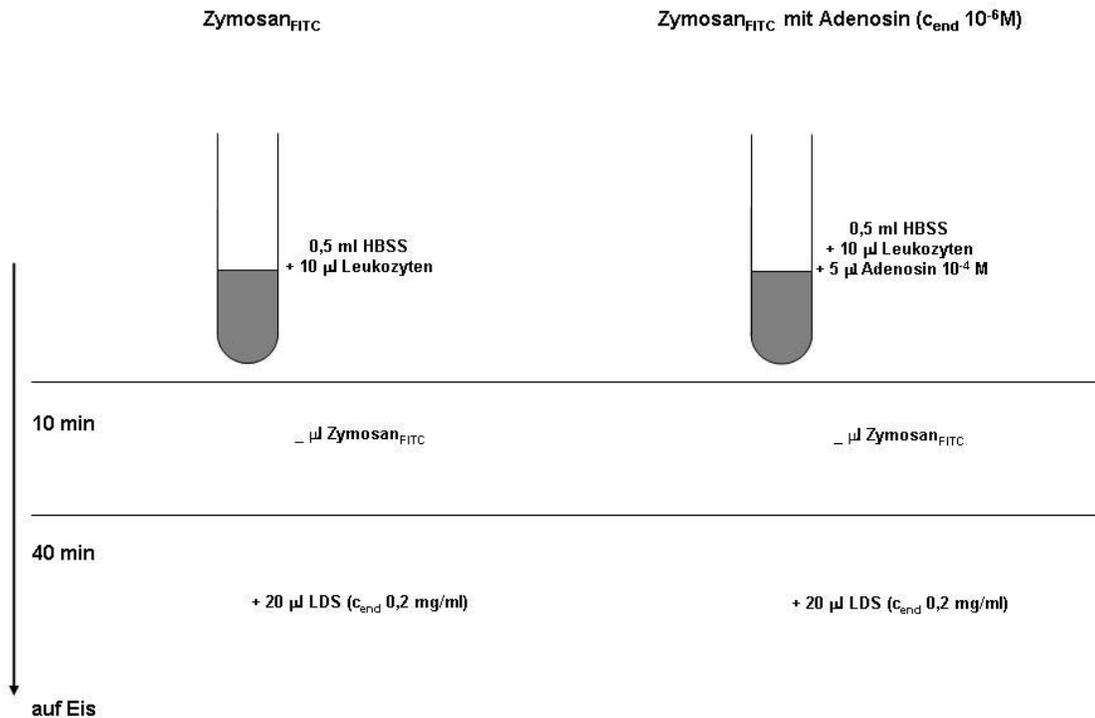
#### Gewinnung von leukozytenreichem Plasma und Messung der Leukozytenzahl

Es wurden 3 ml heparinisiertes Vollblut ( $c_{\text{end}} 10 \text{ IE/ml}$ ) auf 3 ml Histopaque  $1.077 \text{ g/cm}^3$  Dichtegradienten geschichtet. Nach einer Sedimentationsdauer von 45 Minuten bildete sich zwischen dem Histopaque und der darüberliegenden Plasmaschicht ein mononukleärer Zellring aus, von dem  $750 \mu\text{l}$  mit der Pipette entnommen wurden. Das gewonnene leukozytenreiche Plasma wurde bei Raumtemperatur gelagert. Zur Bestimmung der Leukozytenzahl wurden  $10 \mu\text{l}$  leukozytenreiches Plasma in 10 ml azidfreier stabilisierter Elektrolytlösung (Isoton II, Beckman Coulter) verdünnt und anschließend mit dem Gerät Coulter Counter (Coulter Electronics/ Krefeld, Germany) gemessen. Die Zellgröße wurde von  $5,2 \mu\text{m}$  bis  $15 \mu\text{m}$  Durchmesser für Leukozyten und das Messvolumen mit  $500 \mu\text{l}$  eingestellt. Um die Leukozytenzahl pro ml zu erhalten, muss man die ermittelte Zellzahl mit 2000 multiplizieren:

$$\text{Leukozyten / } 500 \mu\text{l} \times 2 \times 1000 \text{ (Verdünnungsfaktor)} = \text{Leukozyten / ml.}$$

#### Adhärenz und Phagozytose von PMNL

Nach einer Aufwärmphase (10 min. /  $37^\circ\text{C}$ ) wurden in die Probenröhrchen, vorgefüllt mit 0,5 ml HBSS und einmal plus  $10^{-4} \text{ M}$  Adenosin ( $c_{\text{end}} 10^{-6} \text{ M}$ ),  $10 \mu\text{l}$  leukozytenreiches Plasma aliquotiert und für weitere 10 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert (Abb. 9). Danach wurden der 0,5 ml Probenlösung FITC-markiertes Zymosan entsprechend der Leukozytenzahl (Berechnung siehe Anhang 7.3) zugesetzt. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei  $37^\circ\text{C}$  wurden die Proben mit LDS ( $c_{\text{end}} 0,2 \mu\text{g/ml}$ ) gefärbt und bis zur Messung mit dem Durchflußzytometer auf Eiswasser gestellt.



**Abbildung 9: Probenverarbeitung zur Adhärenz und Phagozytose von PMNL**

### Phagozytose-assoziierte $H_2O_2$ -Produktion von PMNL

Der Ansatz K enthält die Kontrollen, während der Ansatz A die Adenosinrezeptorantagonisten DPCPX ( $c_{\text{end}} 10^{-6} \text{ M}$ ), ZM 241385 ( $c_{\text{end}} 10^{-6} \text{ M}$ ) und VUF 5574 ( $c_{\text{end}} 2 \times 10^{-7} \text{ M}$ ), jeweils mit und ohne Adenosin ( $c_{\text{end}} 10^{-6} \text{ M}$ ), enthält (Abb. 10). Nachdem die Ansätze K und A für 10 Minuten bei  $37^\circ \text{C}$  gewärmt worden sind, wurden jedem Probenröhrchen  $10 \mu\text{l}$  leukozytenreiches Plasma und DHR ( $c_{\text{end}} 1,1 \mu\text{M}$ ) zugesetzt und für weitere 10 Minuten im Wärmeblock inkubiert. Nach der Inkubation wurden einer Probe von Ansatz K und den Proben von Ansatz A die der Leukozytenzahl entsprechende Menge an Zymosan (Berechnung siehe Anhang 7.3) hinzugefügt. Nach einer Inkubation für 30 Minuten bei  $37^\circ \text{C}$  wird den Proben LDS ( $c_{\text{end}} 0,2 \text{ mg/ml}$ ) zugesetzt. Anschließend erfolgt die Lagerung auf Eiswasser bis zur Messung mit dem Durchflusszytometer (Abb. 11).

Ansatz K:



Ansatz A:

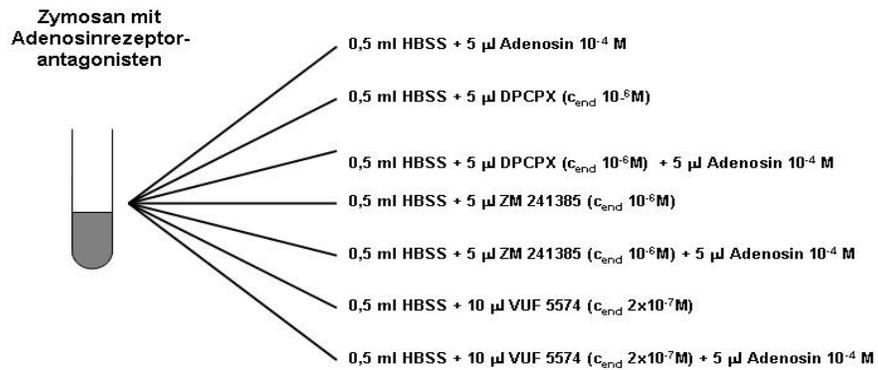


Abbildung 10: Testansatz zur Phagozytose-assoziierten  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Produktion

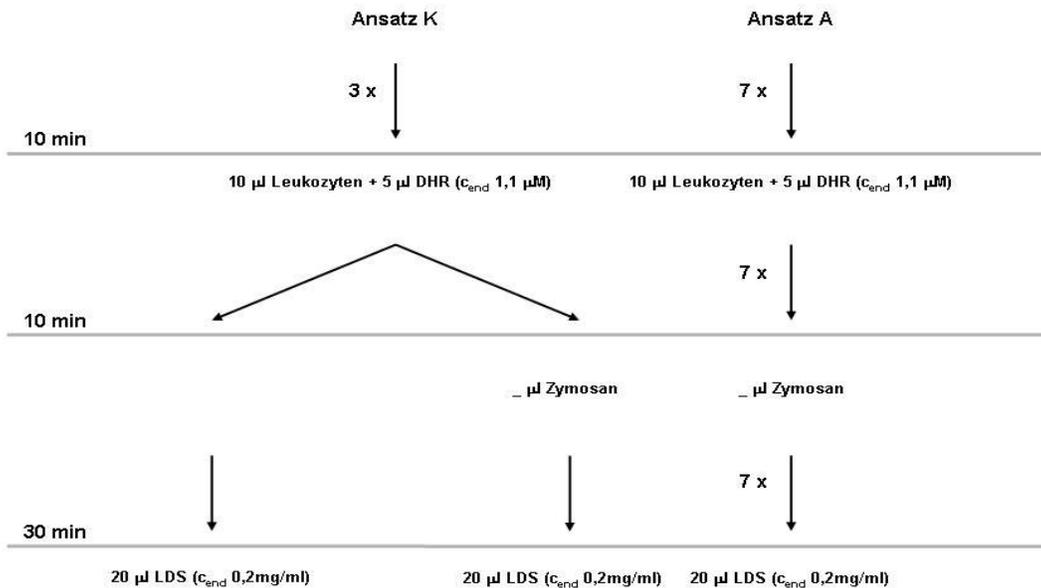
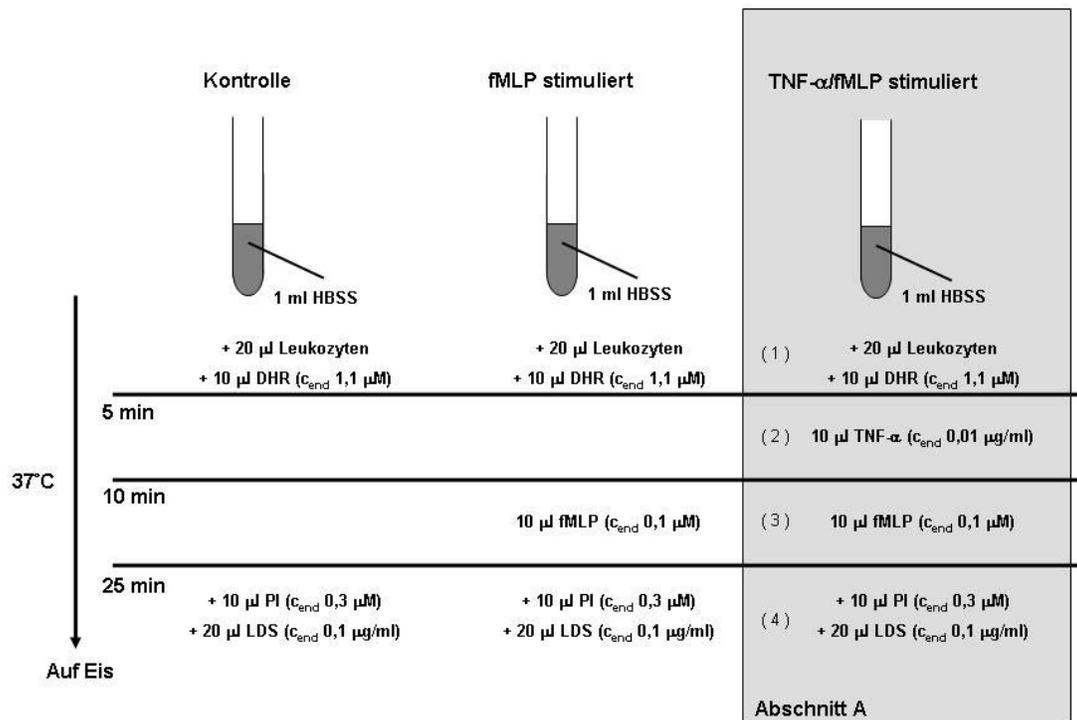


Abbildung 11: Probenverarbeitung zur Phagozytose-assoziierten  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Produktion

## Extrazelluläre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion von PMNL

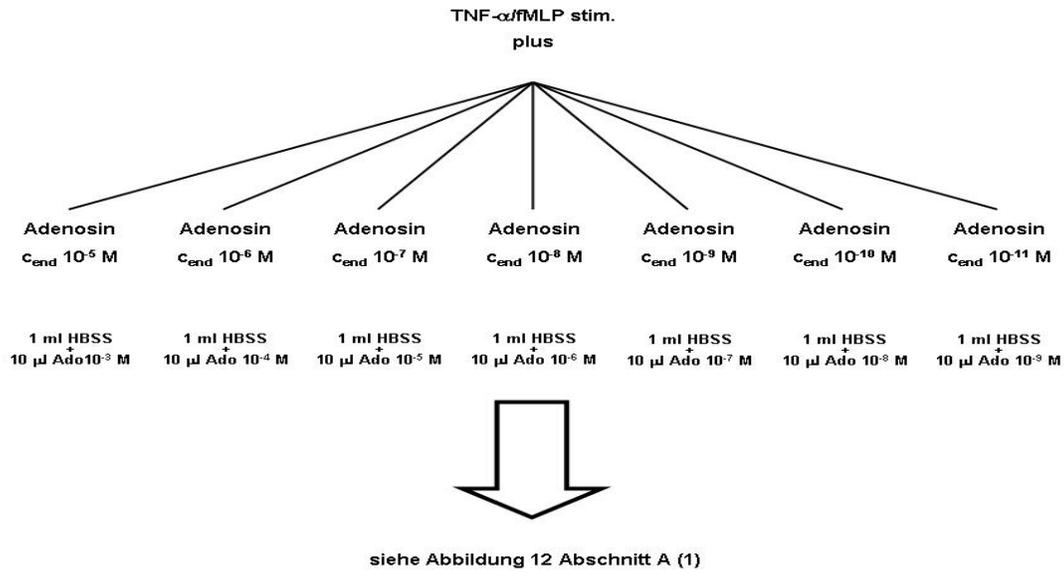
Nachdem die 1 ml HBSS-Lösung für 10 Minuten bei 37°C in einem Wärmeblock gewärmt worden ist, werden den Röhrchen 20 µl leukozytenreiches Plasma und der Farbstoff DHR (c<sub>end</sub> 1,1 µM) zugesetzt (Abb. 12). Die Kontrollprobe bleibt unstimuliert, während die anderen Proben mit fMLP (c<sub>end</sub> 0,1 µM), TNF-α (c<sub>end</sub> 0,01 µg/ml) und fMLP (c<sub>end</sub> 0,1 µM) stimuliert werden. Die Röhrchen werden 15 Minuten in dem Wärmeblock inkubiert und dann nach Zugabe von PI (c<sub>end</sub> 0,3 µM) und LDS (c<sub>end</sub> 0,1 µg/ml) bis zur Messung mit dem Durchflusszytometer auf Eis gesetzt.



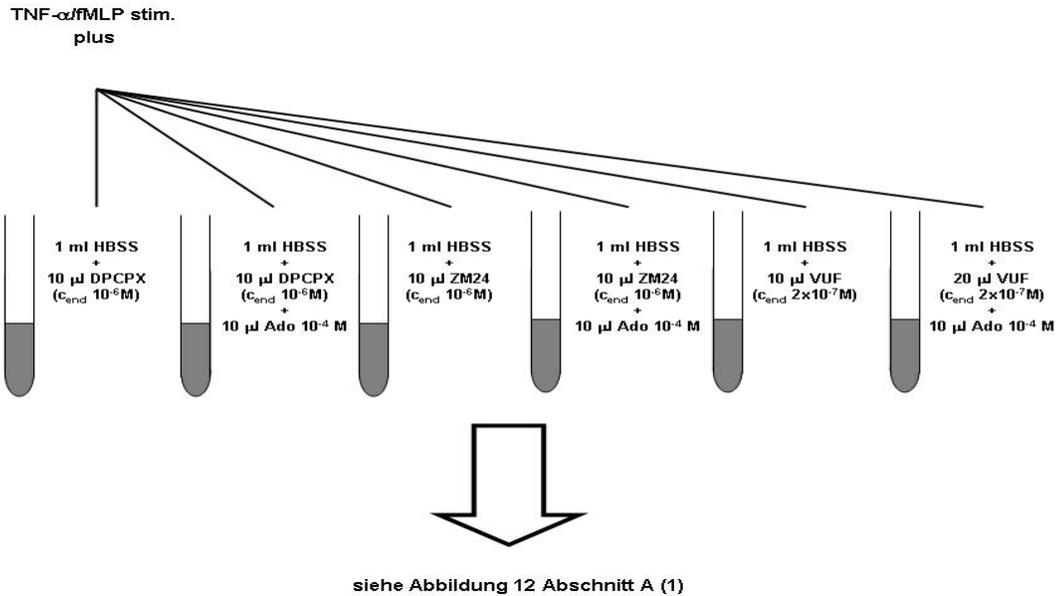
**Abbildung 12: Bestimmung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion der PMNL mit DHR**

Adenosin wird dem 1 ml HBSS-Puffer so zugesetzt, dass man Endkonzentrationen von 10<sup>-5</sup> M, 10<sup>-6</sup> M, 10<sup>-7</sup> M, 10<sup>-8</sup> M, 10<sup>-9</sup> M, 10<sup>-10</sup> M und 10<sup>-11</sup> M von Adenosin (Ado) in Lösung hat (Abb. 13), und je einmal die Rezeptorantagonisten DPCPX (c<sub>end</sub> 10<sup>-6</sup> M), ZM 241385

( $c_{\text{end}} 10^{-6} \text{ M}$ ) und VUF 5574 ( $c_{\text{end}} 2 \times 10^{-7} \text{ M}$ ) ohne und mit Adenosin ( $c_{\text{end}} 10^{-6} \text{ M}$ ) (Abb.14).  
 Es wird dann mit den Probenröhrchen fortgefahren, wie es in Abb. 12, Abschnitt A (1),  
 ersichtlich ist.



**Abbildung 13: Adenosinverdünnungsreihe**



**Abbildung 14: Adenosinrezeptorantagonisten**

## **4 Ergebnisse**

In der Kontrollgruppe konnten von 20 Patienten 19 ausgewertet werden. Patient 11 wurde aus der endgültigen Statistik vor Entblindung der Studie herausgenommen, da bei ihm während der CABG-OP eine Mitralklappenrekonstruktion erforderlich wurde.

### **4.1 Statistik**

Die deskriptive und vergleichende Statistik erfolgte mit der kommerziell erhältlichen Software SPSS 13.0 (SPSS INC., Chicago, IL, USA). Nach Prüfung auf Normalverteilung mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test wurden nicht normalverteilte, unverbundene Stichproben mit dem Kruskal-Wallis und post-hoc Mann-Whitney Test und normalverteilte Stichproben mit ANOVA und posthoc Students T-Test auf Unterschiede geprüft. Im Falle verbundener Stichproben wurde bei nicht vorliegender Normalverteilung ein Friedmann-Test mit post-hoc Wilcoxon Test und bei gegebener Normalverteilung ein ANOVA für Messwiederholungen mit anschließender Kontrastierung mittels einfachen Kontrasts sowie dem umgekehrtem Helmert-Kontrast analysiert. Bei Mehrfachvergleichen erfolgte eine Korrektur des Signifikanzniveaus nach Bonferoni. Die halbmaximalen Hemmkonzentrationen von Adenosin wurden durch nicht-lineare Regressionsanalysen der jeweiligen Hemmkurven anhand von GraphPad Prism 3.0 Software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) ermittelt. Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SE) dargestellt. Als signifikant wurden die Ergebnisse mit einem  $p < 0,05$  gewertet.

### **4.2 Patientencharakteristik**

Die in der Studie untersuchte Kontrollgruppe teilte sich in 12 männliche und 7 weibliche Patienten auf. Das Durchschnittsalter betrug 65 Jahre und in Bezug auf Körpergewicht und Körpergröße wiesen die Patienten eine leichte Adipositas Grad I auf (Tab. 5).

**Tabelle 5: Demographische Daten der untersuchten Patientenpopulation**

Patienten		$x \pm SE$	n
Geschlecht	männlich		12
	weiblich		7
Alter (Jahre)		$65,0 \pm 1,4$	19
Körpergewicht (kg)		$74,7 \pm 2,2$	19
Körpergröße (cm)		$170,1 \pm 1,9$	19
Body Mass Index (kg/m <sup>2</sup> )		$25,8 \pm 0,4$	19

In der präoperativen OP-Risikoabschätzung nach den aufgestellten Kriterien der American Society of Anesthesiology (ASA) lag der Durchschnitt der Patienten zwischen ASA 3 und ASA 4 (Tab. 6).

**Tabelle 6: Präoperatives OP-Risikoscore nach ASA-Klassifikation**

Patienten		$x \pm SE$	n	%
ASA-Klassifikation	3		9	47,4
	4		10	52,6
		$3,5 \pm 0,1$		

Für die in der klinischen Chemie gemessenen Laborparameter Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>++</sup>, ASAT, ALAT, Kreatinin, Harnstoff, LDH, Albumin, Glukose (kein Nüchternwert) und CRP hinsichtlich der Organfunktionen ergaben sich zum MZP 1 keine außerhalb der Norm liegenden Werte (Daten nicht gezeigt).

Die Patienten unterzogen sich alle einer CABG-OP mit der Herz-Lungen-Maschine. In der Gruppe war die Dauer für den kardiopulmonalen Bypass des Blutkreislaufs 92 Minuten, die Klemmzeit der Aorta 57 Minuten und die Dauer der Reperfusion 30 Minuten. Der Tiefpunkt der Temperatur des CPB lag bei 31,8 °C. Durchschnittlich wurden 3 Bypässe an die Koronararterien genäht. Der postoperative Aufenthalt auf der Intensivstation bis zur Verlegung auf die Normalstation betrug 2,5 Tage (Tab. 7).

**Tabelle 7: Dauer der Herz-Lungen-Maschinen-Bypasszeit und des Intensivaufenthalts, Anzahl der Bypässe**

Patienten		$x \pm SE$	n	%
Herz-Lungen-Bypasszeit (min)		$91,7 \pm 3,9$	19	
Aortenklemmzeit (min)		$56,9 \pm 2,6$	19	
Reperfusionzeit (min)		$29,8 \pm 2,3$	19	
Minimum CPB Temperatur (°C)		$31,8 \pm 0,3$	18	
Anzahl der Bypässe	2		2	10,0
	3		14	70,0
	4		4	20,0
Intensivaufenthalt (d)		$2,5 \pm 0,2$	19	

Im klinischen Verlauf zeigte sich postoperativ ein im Normbereich gelegener Anstieg der Leukozytenzahl und gegenüber präoperativ höhere Werte für Temperatur und Herzfrequenz. Das proinflammatorische Interleukin IL-6 stieg nach der OP an, mit einem Maximum bei MZP 3 (Tab. 8).

**Tabelle 8: Klinische SIRS-Verdachtsparameter im Verlauf**

( $p < 0,05$  für Temperatur, Herzfrequenz (HF), Diastolischen RR, Leukozyten bei Vergleich von MZP 1 zu MZP 3, MZP 4 und MZP 5;  
 $p < 0,05$  für IL-6 bei Vergleich von MZP 2 zu MZP 3, MZP4 und MZP 5;  
 $p < 0,05$  für TNF- $\alpha$  bei Vergleich von MZP 2 zu MZP 3)

	MZP 1 ( $\pm SE$ )	MZP 2 ( $\pm SE$ )	MZP 3 ( $\pm SE$ )	MZP 4 ( $\pm SE$ )	MZP 5 ( $\pm SE$ )
Temperatur [°C]	$36,7 \pm 0,1$	$36,0 \pm 0,1$	$37,3 \pm 0,1$	$37,3 \pm 0,1$	$37,4 \pm 0,1$
HF [ $\text{min}^{-1}$ ]	$68 \pm 2$	$60 \pm 2$	$89 \pm 2$	$80 \pm 2$	$88 \pm 3$
Syst. RR [mmHg]	$129 \pm 4$	$98 \pm 4$	$132 \pm 4$	$131 \pm 5$	$136 \pm 4$
Diast. RR [mmHg]	$74 \pm 2$	$53 \pm 2$	$62 \pm 2$	$61 \pm 3$	$65 \pm 2$
$p_a\text{CO}_2$ [mmHg]		$35,7 \pm 0,9$	$39,4 \pm 1,7$	$38,2 \pm 0,8$	$37,0 \pm 0,9$
Leukozyten [G/l]	$6,6 \pm 0,3$	$5,0 \pm 0,4$	$8,9 \pm 0,4$	$9,5 \pm 0,5$	$9,7 \pm 0,6$
IL-6 [pg/ml]		$4,0 \pm 0,5$	$322 \pm 37$	$234 \pm 36$	$158 \pm 24$
TNF- $\alpha$		$33,5 \pm 3,5$	$50,5 \pm 4,9$	$43,5 \pm 4,7$	$41,6 \pm 4,6$

### 4.3 Ex vivo Funktionen von PMNL

#### Adhäsion von Zymosan

Das Adhärenzverhalten der Zymosanpartikel an neutrophile Granulozyten war zum MZP 1 mit  $8,2 \pm 1,2 \%$  am höchsten und mit  $4,2 \pm 0,7 \%$  zum MZP 3 am niedrigsten. Im zeitlichen Verlauf über die 5 Messzeitpunkte zeigte sich eine signifikante Minderung der Adhäsion von MZP 1 bis 3 ( $p < 0,05$ ) und eine signifikante allmähliche Restitution mit  $6,8 \pm 0,9 \%$  bei MZP 5 ( $p < 0,05$ ). Ein Einfluß auf die Adhäsion von Zymosanpartikel unter Zugabe von  $10^{-6}$  M Adenosin konnte nicht nachgewiesen werden (Abb. 15).

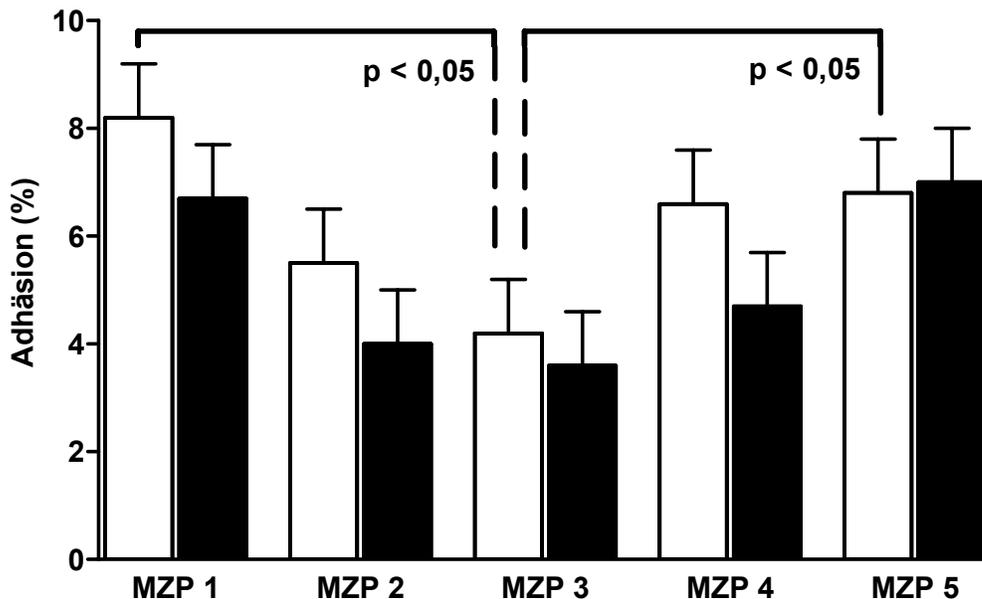


Abbildung 15: Adhäsion von Zymosanpartikeln an PMNL ohne und unter Einfluss von  $10^{-6}$  M Adenosin.

Weißer Balken: Zymosan,

Schwarzer Balken: Zymosan und  $10^{-6}$  M Adenosin.

## Phagozytose von Zymosan

Die Phagozytose der Zymosanpartikel durch neutrophile Granulozyten weist die gleiche Dynamik auf wie deren Adhäsion, mit signifikanten Unterschieden zwischen MZP 1 bis 3 ( $p < 0,05$ ) und MZP 3 bis 5 ( $p < 0,05$ ). Die Phagozytoserate betrug zum MZP 1  $22,2 \pm 3,1$  %, die niedrigste Rate lag bei MZP 3 mit  $12,3 \pm 2,9$  % und die höchste bei MZP 5 mit  $25,8 \pm 4,4$  %. Eine Zugabe von  $10^{-6}$  M Adenosin zeigte keinen Einfluß auf die Phagozytose von Zymosan (Abb. 16).

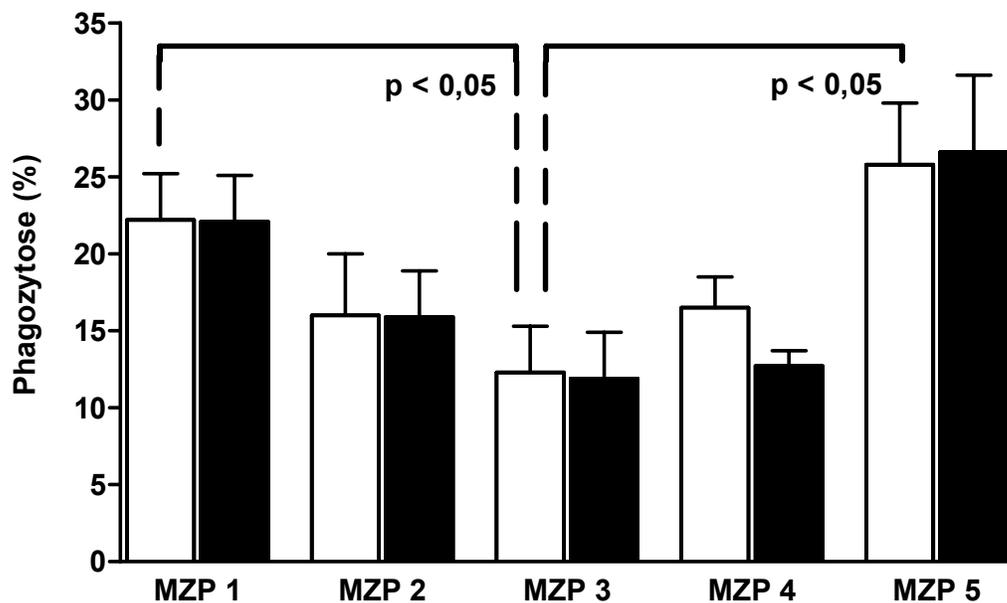


Abbildung 16: Phagozytose von Zymosanpartikel an PMNL ohne und unter Einfluss von  $10^{-6}$  M

Adenosin.

Weißer Balken: Zymosan,

Schwarzer Balken: Zymosan und  $10^{-6}$  M Adenosin.

## Phagozytose-assoziierte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion

Die Phagozytose-assoziierte Wasserstoffperoxidproduktion der neutrophilen Granulozyten gemessen in Einheiten relativer Fluoreszenz betrug bei MZP 1  $24,8 \pm 3,0$  MFU. Im Verlauf zeigte sich zu MZP 2 ein signifikanter Abfall ( $p < 0,05$ ) auf  $15,8 \pm 1,3$  MFU, und ein signifikanter Anstieg ( $p < 0,05$ ) von MZP 2 zu 5 auf  $28,1 \pm 4,2$  MFU. Einen signifikanten Einfluß ( $p < 0,05$ ) durch  $10^{-6}$  M Adenosin zeigte sich nur für MZP 1 mit einer Hemmung der Sauerstoffradikalproduktion auf  $17,2 \pm 1,7$  MFU (Abb. 17). Der A<sub>1</sub>-Rezeptorantagonist DPCPX, sowie der A<sub>2A</sub>-Rezeptorantagonist ZM241385 und der A<sub>3</sub>-Rezeptorantagonist VUF 5574 hatten keinen signifikanten Einfluß auf die Phagozytose-assoziierte Sauerstoffradikalproduktion der PMNL ohne und unter Einfluss von  $10^{-6}$  M Adenosin (Daten graphisch nicht dargestellt).

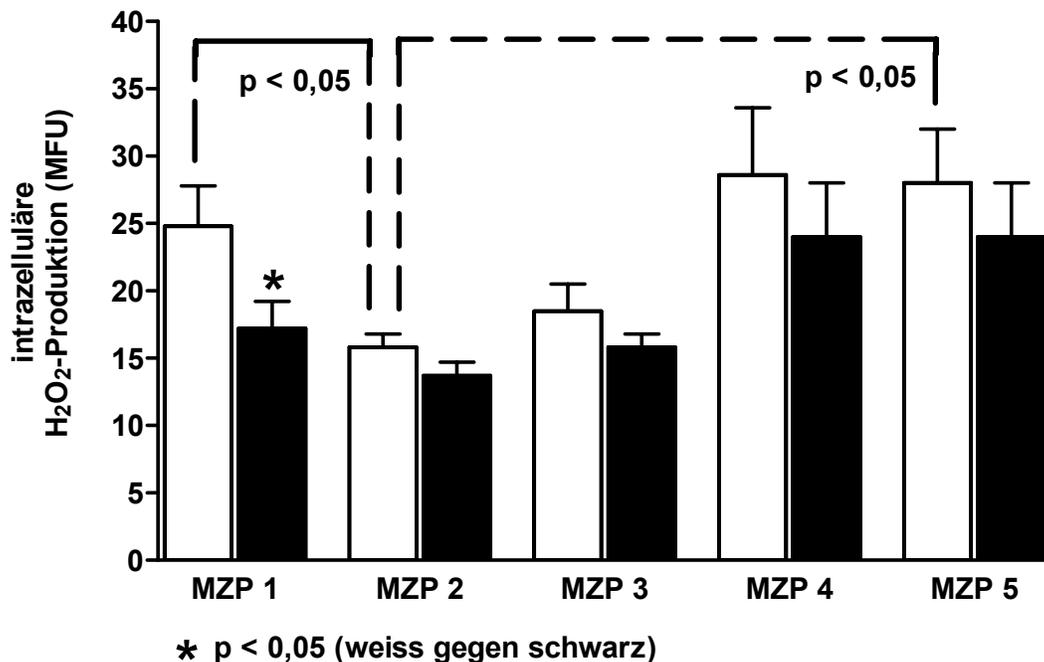


Abbildung 17: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion von PMNL nach Zymosangabe ohne und unter Einfluss von  $10^{-6}$  M Adenosin.

Weißer Balken: Zymosan,

Schwarzer Balken: Zymosan und  $10^{-6}$  M Adenosin.

## H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion unter dem Einfluss löslicher Stimuli

Bei der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion zeigte sich ein signifikanter Anstieg ( $p < 0,05$ ) von MZP 1 mit  $66,2 \pm 10,3$  MFU zu MZP 2 mit  $83,5 \pm 10,9$  MFU, der bei MZP 3 wieder auf ein Ausgangsniveau von  $63,5 \pm 7,8$  MFU ( $p < 0,05$ ) zurückfiel. Im weiteren Verlauf stieg die Sauerstoffradikalproduktion bis maximal  $94,0 \pm 8,4$  MFU bei MZP 5 und wies gegen MZP 1 ( $p < 0,05$ ) und MZP 3 ( $p < 0,05$ ) Signifikanz auf (Abb. 18: weisse Balken). Unter Zugabe von  $10^{-6}$  M Adenosin verringerte sich die Sauerstoffradikalproduktion signifikant ( $p < 0,05$ ) zu allen Messzeitpunkten (Abb. 18: schwarze Balken).

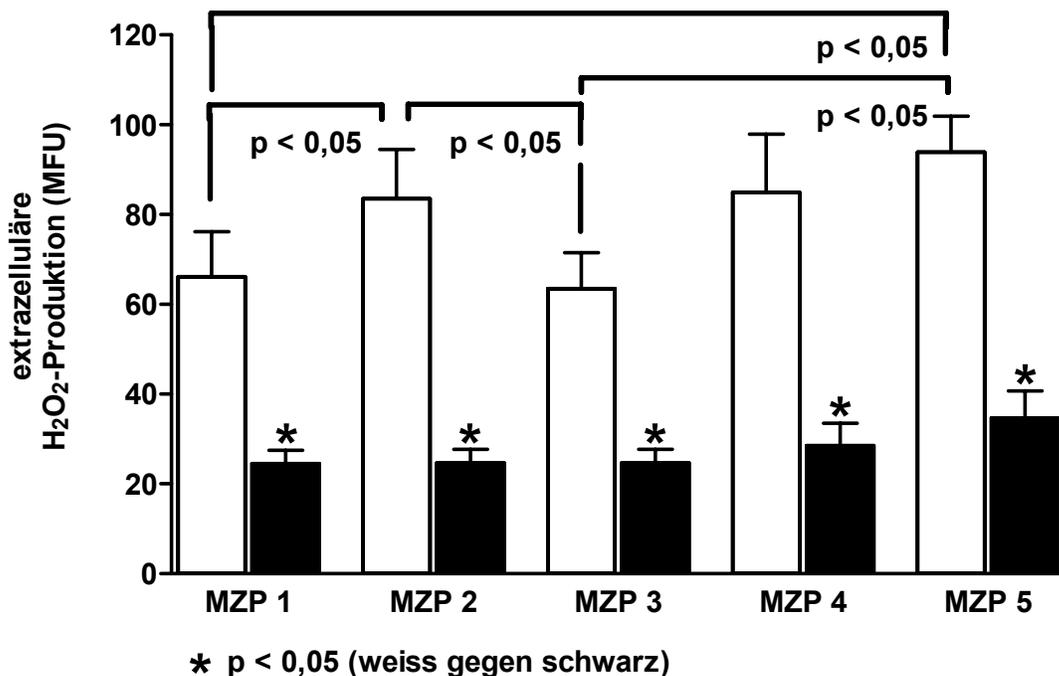


Abbildung 18: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion von PMNL nach Stimulation mit TNF- $\alpha$ /fMLP ohne und unter Einfluss von  $10^{-6}$  M Adenosin.

Weisse Balken: TNF- $\alpha$ /fMLP,

Schwarze Balken: TNF- $\alpha$ /fMLP und  $10^{-6}$  M Adenosin.

## Einfluß der Adenosinrezeptorantagonisten auf die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion

Für den A<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten DPCPX zeigte sich zu keinem Messzeitpunkt eine signifikante Veränderung der Wasserstoffperoxidproduktion zu alleiniger TNF $\alpha$ /fMLP Stimulation (Abb. 19: graue Balken). Die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion liess sich trotz Anwesenheit von DPCPX durch 10<sup>-6</sup> M Adenosin signifikant (p < 0,05) supprimieren (Abb. 19: schraffierte Balken).

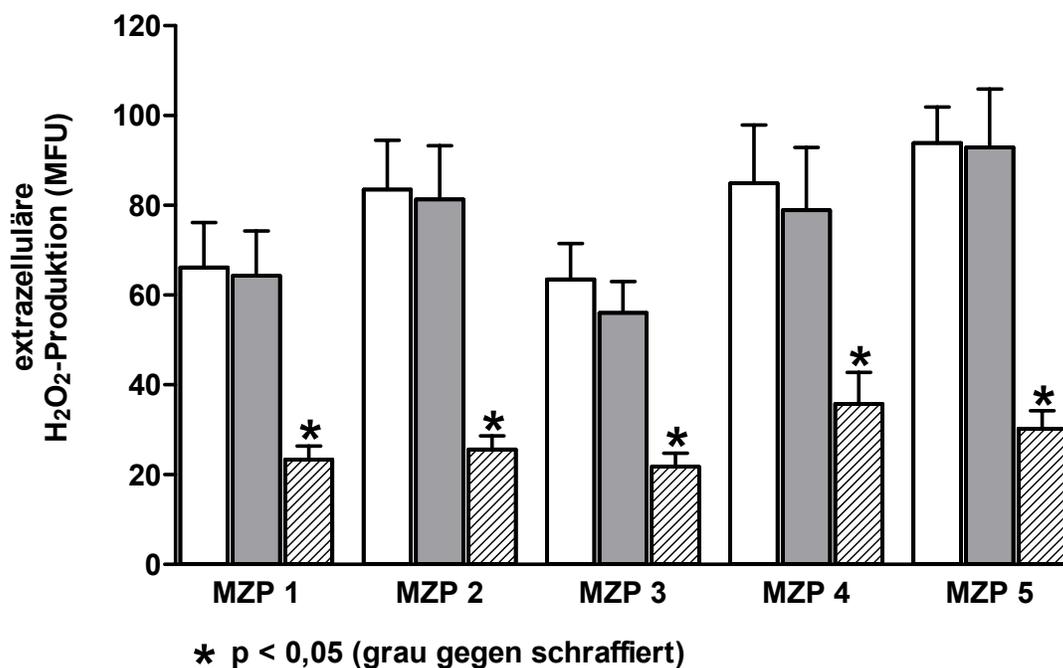


Abbildung 19: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion von PMNL nach Stimulation mit TNF- $\alpha$ /fMLP unter Einfluß von A<sub>1</sub>-

Rezeptorantagonisten DPCPX ohne und unter Einfluss von 10<sup>-6</sup> M Adenosin.

Weißer Balken: TNF- $\alpha$ /fMLP,

Grauer Balken: TNF- $\alpha$ /fMLP und DPCPX,

Schraffierter Balken: TNF- $\alpha$ /fMLP und DPCPX und 10<sup>-6</sup> M Adenosin.

Für den A<sub>2A</sub>-Rezeptorantagonisten ZM241385 zeigte sich zu keinem Messzeitpunkt eine signifikante Veränderung der Wasserstoffperoxidproduktion zu alleiniger TNF $\alpha$ /fMLP Stimulation (Abb. 20: graue Balken). Die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion liess sich in Anwesenheit von ZM241385 durch 10<sup>-6</sup> M Adenosin nicht supprimieren (Abb. 20: schraffierte Balken).

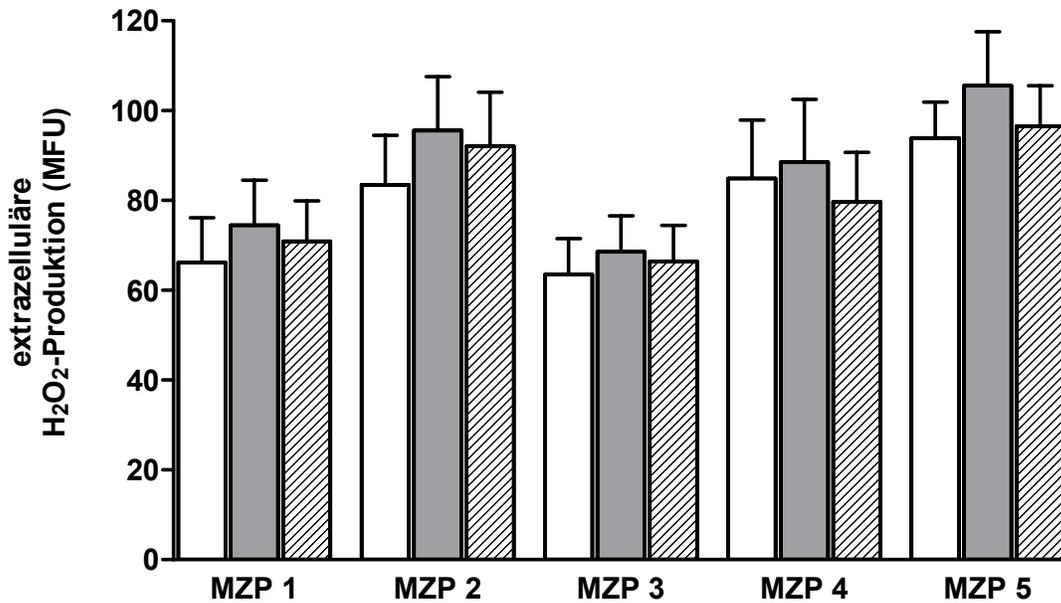


Abbildung 20: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion von PMNL nach Stimulation mit TNF- $\alpha$ /fMLP unter Einfluß von A<sub>2A</sub>-Rezeptorantagonist ZM241385 ohne und unter Einfluss von 10<sup>-6</sup> M Adenosin.

Weißer Balken: TNF- $\alpha$ /fMLP,

Grauer Balken: TNF- $\alpha$ /fMLP und ZM241385,

Schraffierter Balken: TNF- $\alpha$ /fMLP und ZM241385 und 10<sup>-6</sup> M Adenosin.

Für den A<sub>3</sub>-Rezeptorantagonisten VUF 5574 zeigte sich zu keinem Messzeitpunkt eine signifikante Veränderung der Wasserstoffperoxidproduktion zu alleiniger TNF $\alpha$ /fMLP Stimulation (Abb. 21: graue Balken). Die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion liess sich trotz Anwesenheit von VUF 5574 durch 10<sup>-6</sup> M Adenosin signifikant (p < 0,05) supprimieren (Abb. 21: schraffierte Balken).

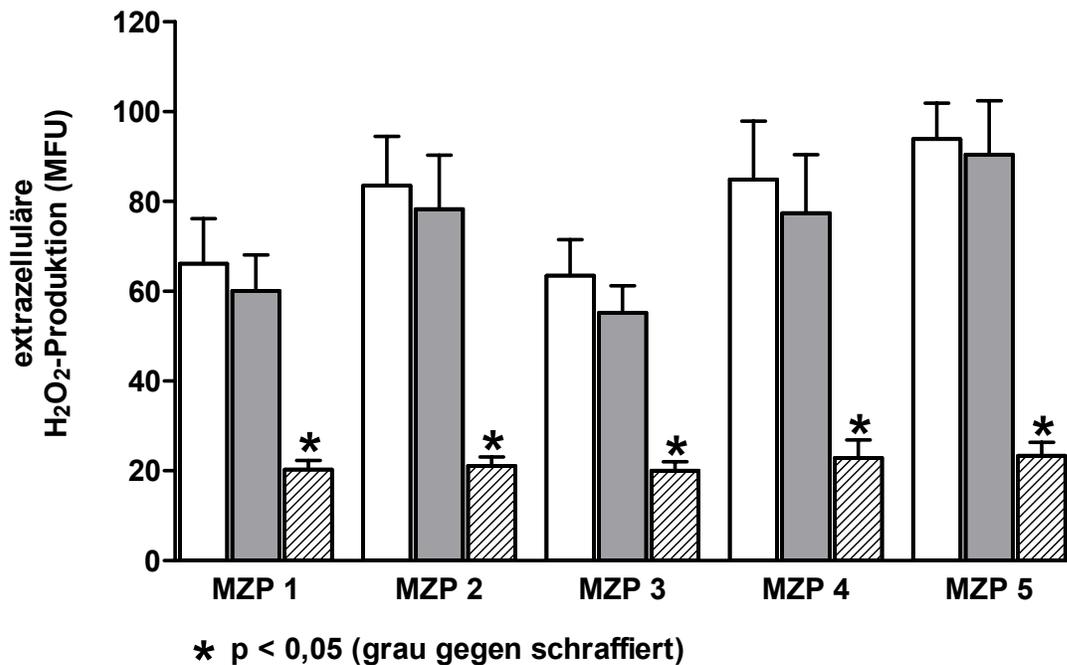


Abbildung 21: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion von PMNL nach Stimulation mit TNF- $\alpha$ /fMLP unter Einfluß von A<sub>3</sub>-

Rezeptorantagonist VUF 5574 ohne und unter Einfluss von 10<sup>-6</sup> M Adenosin.

Weiße Balken: TNF- $\alpha$ /fMLP,

Graue Balken: TNF- $\alpha$ /fMLP und VUF 5574,

Schraffierte Balken: TNF- $\alpha$ /fMLP und VUF 5574 und 10<sup>-6</sup> M Adenosin.

### Adenosinhemmkurve der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion

Die Dosis-Wirkungskurven der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktionshemmung von PMNL durch Adenosin am A<sub>2A</sub>-Rezeptor zeigen eine sigmoidale Form auf und verschieben sich von MZP 1 zu MZP 5 nach rechts zu höheren IC<sub>50</sub>-Werten (Abb. 22; Tab.9). Ein steiler Abfall der Wasserstoffperoxidproduktion zeigte sich bei Konzentrationen von Adenosin im Bereich zwischen 10<sup>-8</sup> M und 10<sup>-7</sup> M mit einer gesättigten maximalen Hemmung zwischen 10<sup>-6</sup> M und 10<sup>-5</sup> M Adenosin. Die IC<sub>50</sub> steigt von 38,4 ± 5,8 nM bei MZP 1 zu maximal 88,8 ± 23,9 nM bei MZP 4 an, und ist am MZP 5 mit 72,4 ± 15,9 nM immer noch erhöht (Abb. 23).

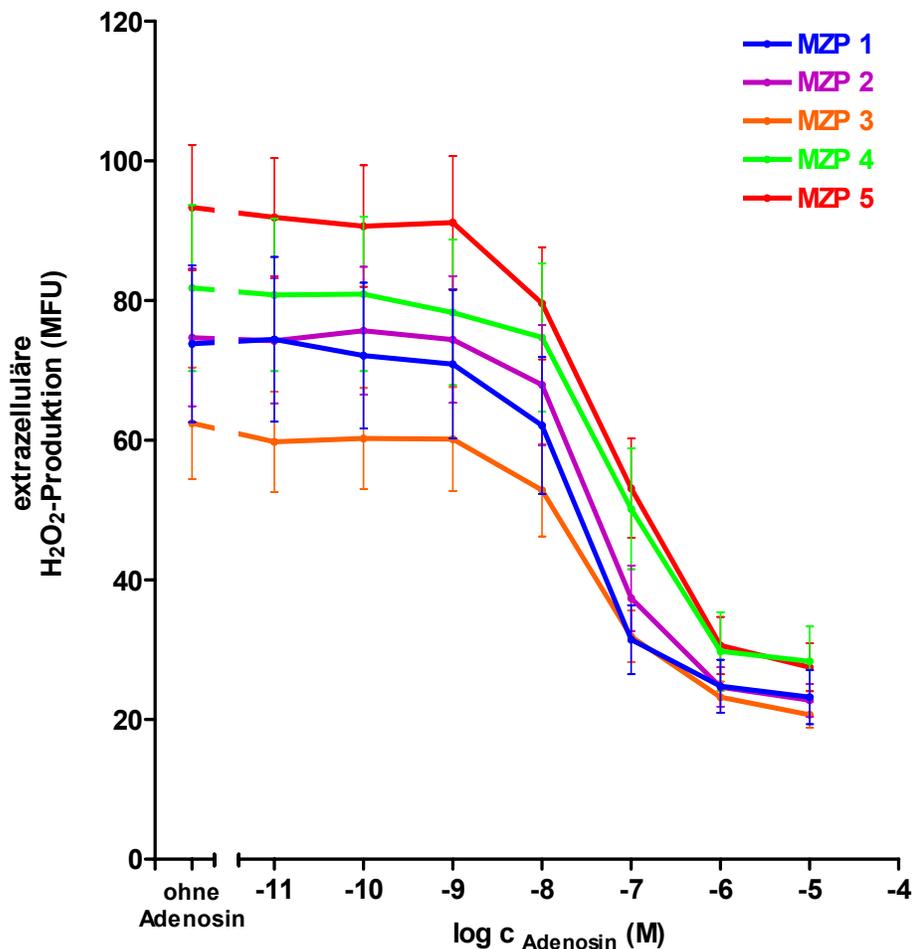


Abbildung 22: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion der MZP 1 bis 5 nach Stimulation mit TNF- $\alpha$ /fMLP und steigender

Adenosinkonzentration von 10<sup>-11</sup> – 10<sup>-5</sup> M.

Tabelle 9: IC<sub>50</sub>-Werte der verschiedenen Messzeitpunkte

	MZP 1 (± SE)	MZP 2 (± SE)	MZP 3 (± SE)	MZP 4 (± SE)	MZP 5 (± SE)
IC <sub>50</sub> [nM]	38,4 ± 5,8	53,9 ± 9,8	63,1 ± 27,3	88,8 ± 23,9	72,4 ± 15,9

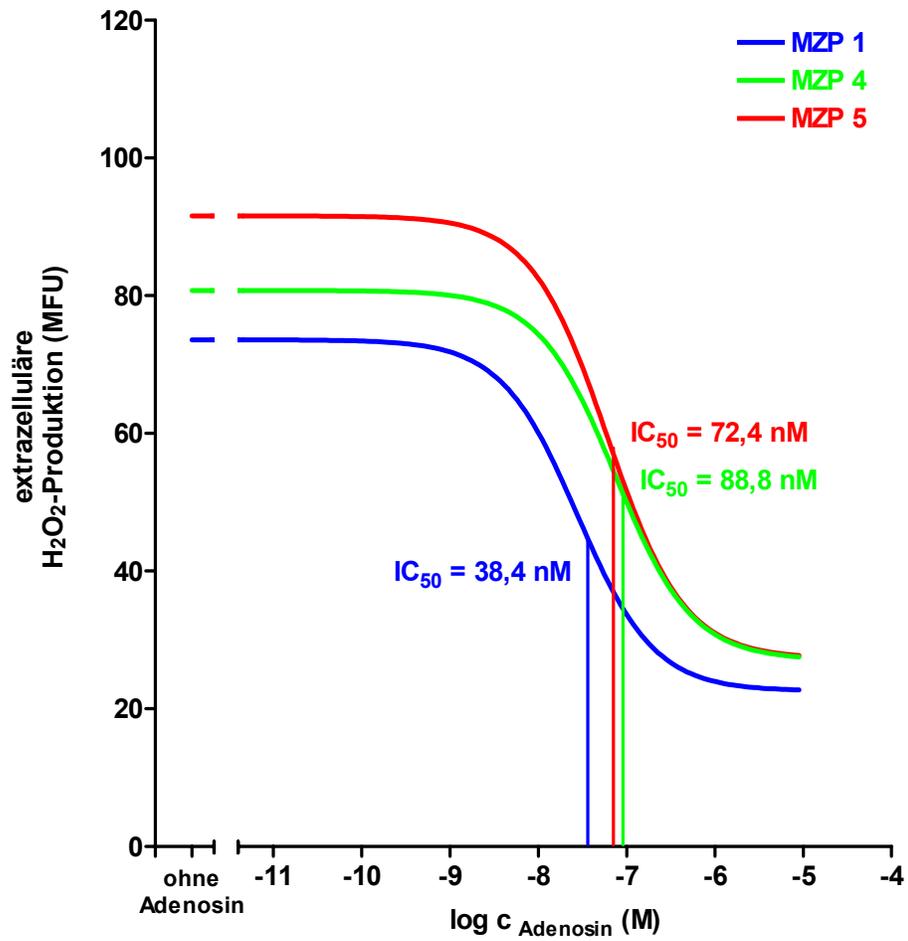


Abbildung 23: Errechnete Adenosinhemmkurven der MZP 1, 4 und 5

#### 4.4 Plasmakonzentrationen von Adenosin

Adenosin stieg tendenziell im Plasma von einem Ausgangsniveau bei MZP 1 von  $49,5 \pm 11,8$  nM zum MZP 2 auf  $67,2 \pm 16,1$  nM an, und fiel bis zum Zeitpunkt 5 stetig bis zu  $29,6 \pm 3,6$  nM ab. Zwischen den Messzeitpunkten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Adenosinplasmakonzentrationen (Abb. 23). Adenosin korrelierte negativ mit der Leukozytenzahl ( $p < 0,05$ ,  $r^2 = -0,5041$ ) für alle Messzeitpunkte und positiv mit IL-6 ( $p < 0,05$ ,  $r^2 = 0,5648$ ) für die postoperativen Zeitpunkte 3-5.

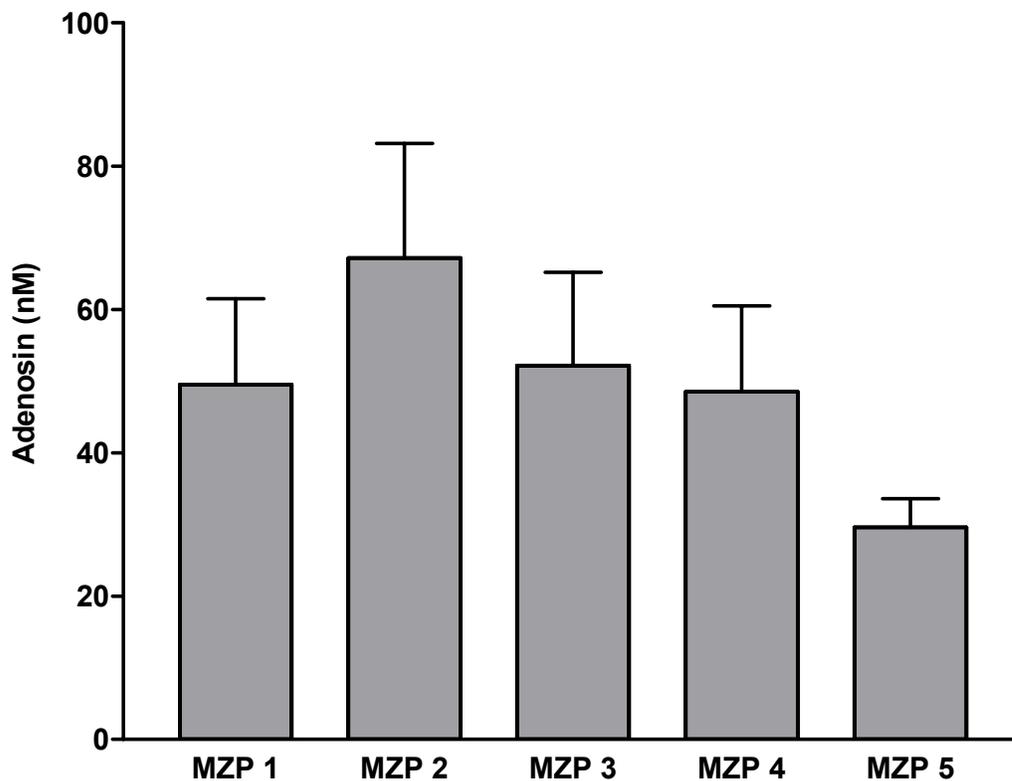


Abbildung 23: Adenosinplasmaspiegel im perioperativen Verlauf

## **5 Diskussion**

Die vorliegende Studie befasste sich mit der Auswirkung einer koronar-aortalen Bybass-Operation auf die Funktion von Granulozyten, die unter zu Hilfenahme extrakorporaler Zirkulation mit der Herz-Lungen-Maschine durchgeführt wurde. Dabei wurde die Phagozytosefunktion sowie die intra- und extrazelluläre Sauerstoffradikalbildung von PMNL der Patienten untersucht und ferner auf eine mögliche Regulierung und Alteration durch Adenosin getestet.

### **5.1 Biphasische Granulozytendysfunktion während CPB**

Unter den Bedingungen des CPB (z.B. Kontakt von Blut zu Fremdoberflächen, Hypothermie) und des dazu nötigen Abklemmens der Aorta (z.B. erhebliche Reduktion des kardiopulmonären Blutflusses, anschliessende Reperfusion) kommt es zur Komplementaktivierung und systemischen Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- $\alpha$  (Journois, Pouard et al. 1994) (Menasche, Haydar et al. 1994) (Teoh, Bradley et al. 1995) und IL-6 (Teoh, Bradley et al. 1995), die ihrerseits als Mediatoren für die inflammatorische Antwort nach CPB (Royston 1997) und Sepsis (Lowry 1993) assoziiert werden. Die Freisetzung von Komplement und Zytokinen führt zur Chemoattraktion von PMNL mit nachfolgender Adhärenz und Migration in der Mikrozirkulation. Die Verstopfung der Mikrozirkulation mit konsequenter Hypoperfusion (Engler, Schmid-Schonbein et al. 1983), die Produktion von toxischen Sauerstoffmetaboliten (ROS), die Freisetzung proteolytischer Enzyme und die Erhöhung der Gefässpermeabilität (Ito, Roth et al. 1990) (Go, Murry et al. 1988) tragen zum durch Neutrophile vermittelten Gewebeschaden bei. Schützende Mechanismen wie die Reparatur von oxidativ modifizierten biologischen Molekülen und Wirkung von Antioxidantien können durch eine exzessive ROS Bildung bei krankhaften Prozessen (z.B. SIRS, Sepsis) überwältigt werden. Somit führen die für die Immunabwehr als primäre Phagozyten essentiellen PMNL mit ihrer Produktion von ROS einerseits eine

anti-mikrobielle Funktion aus, die aber auch klare extrazelluläre oxidative proinflammatorische Konsequenzen (Melley, Evans et al. 2005) hat. Die hohe Mortalitätsrate von 30 bis 70% (Chenoweth, Cooper et al. 1981) (Kääb 1991) (Miholic, Hudec et al. 1985) bei herzchirurgischen Patienten verglichen mit 3 bis 5% in anderen chirurgischen Patientenpopulationen (Jay 1983) durch nosokomiale Infektionen weist auf erhebliche Beeinträchtigungen des menschlichen Körpers und seines Immunsystems durch den CPB hin (Wenisch, Bartunek et al. 1997). Zudem haben die Ergebnisse mehrerer Studien nahegelegt, dass PMNL und inflammatorische Mediatoren eine wichtige Rolle in der Pathogenese von postoperativen Komplikationen spielen. In Einklang damit steht die Tatsache, dass PMNL die ersten Zellen sind, die zum Ort des Geschehens rekrutiert werden, nachdem eine inflammatorische Antwort initiiert worden ist (Tonz, Mihaljevic et al. 1995).

Der initiale Schritt der PMNL Migration und der Erkennung von Bakterien ist die Adhärenz (Root and Cohen 1981) (Keller, Hess et al. 1982), dem die Phagozytose mit anschließender Zerstörung der aufgenommenen Pathogene folgt. Je nach Wahl des Rezeptors und des Bindungsmechanismus spricht man von opsonierter oder nicht-opsonierter Phagozytose. Der Komplement Rezeptor Typ 3 (CR3), auch Mac1 genannt, ist ein Mitglied der  $\beta$ 2-Integrinfamilie, der auf der Plasmamembran von Phagozyten exprimiert ist. Zusätzlich zu der Funktion als Opsoninrezeptor, der das auf Mikroorganismen deponierte Komplementfragment iC3b erkennt (Ross and Vetvicka 1993) (Sengelov 1995) (Le Cabec, Cols et al. 2000), dient der CR3 mit einer zweiten Bindungsdomäne der Erkennung von nicht-opsonierten Mikroben durch direkte Interaktion mit Molekülen auf deren Oberfläche (Wright and Jong 1986) (Russell and Wright 1988) (Reiman, Tuomanen et al. 1990) (Van Strijp, Russell et al. 1993) (Cywes, Hoppe et al. 1997) (Hetland and Wiker 1994) (Le Cabec, Carreno et al. 2002). Diese zweite Domäne, eine Kation-unabhängige Lektinbindungsstelle, bindet lösliche  $\beta$ -Glukane und vermittelt somit die Phagozytose von

Zymosan, welches hauptsächlich aus Mannan und  $\beta(1-3)$ -Glukan zusammengesetzt ist (Di Carlo and Fiore 1958). Durch Bindung seiner Glukankomponente an CR3 löst Zymosan die intrazelluläre Bildung von Superoxidanionen aus (Astarie-Dequeker, N'Diaye et al. 1999) (Czop and Austen 1985) (Kadish, Choi et al. 1986). Neben CR3 ist auch Dektin-1, ein muriner Typ II C-Typ Lektin-ähnlicher Rezeptor, in der Lage, nicht-opsonierte  $\beta$ -1,3 und  $\beta$ -1,6 verbundene Glukan-reiche Partikel zu erkennen (Herre, Gordon et al. 2004). Des Weiteren kooperiert Dektin-1 mit der toll-like Rezeptor (TLR) 2/6-MyD88 Signalkaskade, die durch Zymosan stimulierte Phagozytose und Zytokinproduktion vermittelt (Gantner, Simmons et al. 2003).

Bei unseren Patienten zeigte sich kurz vor bis zu 6 Stunden nach der Operation eine verminderte Adhäsion und Phagozytose der Zymosanpartikel durch PMNL. Eine Restitution dieser Funktionen trat mit Rückkehr zu den Ausgangswerten bei MZP 4 und 5 ein. Zusätzlich wiesen die PMNL eine verminderte durch Zymosan induzierte  $H_2O_2$ -Produktion im Zeitbereich kurz vor der HLM bis 6 Stunden danach auf. PMNL scheinen während und nach der Operation in dem Mechanismus der nicht-opsoninen Phagozytose von Pathogenen durch den CR-3 und/oder des Dektin-1 Rezeptors eingeschränkt zu sein.

Die beeinträchtigte Phagozytosefunktion der PMNL nach CPB wurde schon von mehreren Autoren (Tab. 10) beschrieben. Wenisch et al. zeigte eine signifikant herabgesetzte Phagozytose von FITC-markierten *E. coli* Bakterien direkt nach der Bypass-OP und dem 1. postoperativen Tag (Wenisch, Bartunek et al. 1997). Patienten anderer Studien von Demirciglu et al. und Hamano et al. wiesen auch eine herabgesetzte Phagozytose auf, die Erholung differierte aber von 24 Stunden (Hamano, Ito et al. 1996) bis zu 3 Tagen (Demirciglu 1989). Bei einer Studie in der pädiatrischen Herzchirurgie schlug die nach CPB beeinträchtigte Phagozytoseaktivität von innerhalb 24 bis 48 Stunden nach der Operation in eine überschüssige Aktivität um (Pasnik, Siniewicz et al. 2005). Rassias et al. stellte fest, nachdem er PMNL mit fluoreszierenden Mikrosphären inkubierte, dass die

prozentuale Phagozytoseaktivität kurz vor und 1 Stunde nach CPB signifikant abnahm (Rassias, Givan et al. 2002). In keiner der Studien wurde auf die Adhärenzfunktion eingegangen, man kann aber annehmen, dass mit der Phagozytoseaktivität gleichzeitig die Adhärenz eingeschränkt ist, da die Phagozytose davon zum Teil abhängt und sie mit dem Adhärenzpotential korreliert (Griswold and Maier 1988). Im Hinblick auf die mit der Phagozytose einhergehende ROS Produktion gibt es unterschiedliche Ergebnisse in der Literatur (Tab. 10). Ähnlich zu unseren Beobachtungen stellten Gessler et al. in pädiatrischen Herzpatienten fest, dass 2 Stunden nach CPB die *E. coli* stimulierte ROS Produktion signifikant abfiel (Gessler, Pfenninger et al. 2002), und bei Zilberstein et al. stieg die durch opsonierte Zymosanpartikel ausgelöste oxidative Antwort erst 48 Stunden nach der OP gegenüber den prä- und kurz postoperativen gemessenen Werten an (Zilberstein, Levy et al. 2002). Im Gegensatz zu unseren Werten stiegen bei Wenisch et al. die durch *E. coli* ausgelöste ROS Produktion während des Bypasses an und fielen am ersten postoperativen Tag wieder auf Ausgangswerte ab, was sich mit Ergebnissen von Pavelkova et al. gleicht, der einen Anstieg der spontanen und opsonierten Zymosan stimulierten Chemilumineszenz von kurz nach bis 24 Stunden nach CPB gemessen hatte (Pavelkova, Kubala et al. 2006).

**Tabelle 10: Studienübersicht von PMNL Funktionen bei Patienten mit herzchirurgischen Eingriffen (RV: rechter Herzventrikel, LV: linker Herzventrikel, AVR: Aortenklappenersatz, MVR: Mitralklappenersatz, ASD: Vorhofseptumdefekt, VSD: Herzventrikelseptumdefekt, Cor triatriatum: Herz mit 3 Vorhöfen, SOD: Superoxid-Dismutase)**

Autor	Patientenkollektiv	Methoden	Ergebnisse
Wenisch et al. (Wenisch, Bartunek et al. 1997)	CPB bei CABG Antibiot. Prophylaxe mit Cefuroxime (n = 30) Cefodizime (n = 30)	Phagozytäre Kapazität von PMNL: FITC-markierte <i>E. coli</i> und <i>Staphylococcus aureus</i> , Messung mit Durchflusszytometrie ROS Produktion von PMNL: Inkubation mit DHR nach Stimulation mit 25 ml nicht-markierten <i>Escherichia coli</i> ( $10^9$ /ml)	Signifikante Erniedrigung der Phagozytose beider Bakterien direkt post-OP und 1 Tag post-OP verglichen mit Ausgangswerten in beiden Gruppen. Erholung der Phagozytose nur in der Cefodizime-Gruppe am 5. Tag post-OP. ROS-Produktion stieg signifikant an während des CPB, Abfall zu Ausgangswerten am 1. Tag post-OP in beiden Gruppen.
Hamano et al. (Hamano, Ito et al. 1995)	CPB (n = 14)	Phagozytäre Kapazität von PMNL: Chemilumineszenz	Die Patienten zeigten eine eingeschränkte phagozytäre Funktion sofort nach der Operation bis 12 Stunden danach. Eine vollständige Erholung der phagozytären Funktion trat innerhalb 24 Stunden ein.
Pasnik et al. (Pasnik, Siniewicz et al. 2005)	CPB in pädiatrischer Herzchirurgie bei Transpos. gr. Art. (n = 3) bei Fallot Tetralogie (n = 7) bei Aortenstenose (n = 7) bei Pulmonalatresie (n = 4)	Phagozytäre Aktivität von PMNL: Inkubation mit FITC-markierten opsonierten <i>Escherichia coli</i>	Nach CPB zeigte sich eine erniedrigte phagozytäre Aktivität, die bei 24 Stunden nach OP in eine erhöhte Aktivität umschlug gegenüber präoperativen Werten. Sie blieb bis 48 Stunden erhöht, wies aber keine Signifikanz mehr auf.

Rassias et al. (Rassias, Givan et al. 2002)	CPB Kontrollgruppe (n = 15)	Phagozytäre Kapazität von PMNL: Inkubation mit 2.0 mm fluoreszierenden Mikropsheren Messung durch Durchflusszytometrie	Signifikante Abnahme der prozentualen Phagozytoseaktivität kurz vor und 60 min. nach CPB verglichen mit Ausgangswerten. Signifikanter Anstieg der totalen phagozytären Kapazität nach 60 min. nach CPB verglichen mit Ausgangswerten bei gleichzeitigen Anstieg der peripheren PMNL Zahl.
Gessler et al. (Gessler, Pfenninger et al. 2002)	CPB in pädiatrischer Herzchirurgie bei VSD (n = 5) bei AV-Kanal (n = 5) bei ASD (n = 3) bei Fallot Tetralogie (n = 3) bei double-outlet RV (n = 2) bei Aortenstenose (n = 1) bei Cor triatriatum (n = 1)	ROS Produktion von PMNL: Inkubation mit DHR nach Stimulation mit fMLP oder Escherichia coli MPO Plasma Konzentration: Immunsorbent Assay	Die fMLP-stimulierte ROS Produktion stieg 2 Stunden nach CPB im Vergleich zu präoperativen Werten an, während die E. Coli-stimulierte ROS Produktion signifikant abfiel. Die postoperativ gemessenen MPO Spiegel waren signifikant erhöht gegenüber den präoperativen Werten.
Zilberstein et al. (Zilberstein, Levy et al. 2002)	CPB bei CABG Kontrollgruppe (n = 19) Ketamin (n = 12)	Superoxid Anionen Produktion von PMNL: SOD-hemmbares Cytochrom C Reduktionsassay nach Stimulation mit 0,1 mg/M fMLP oder 1 mg/ml opsoniertem Zymosan	Kontrollgruppe: Die fMLP-stimulierte ROS Produktion stieg 72 Stunden nach OP signifikant an und blieb gegenüber den Ausgangswerten bis zum 6. Tag post-OP erhöht. Die opsonierte Zymosan Stimulation stieg bei 48 Stunden nach OP an mit einem signifikanten Maximum bei 72 Stunden und blieb gegenüber den Ausgangswerten erhöht bis zum 6. Tag postoperativ.
Pavelkova et al. (Pavelkova, Kubala et al. 2006)	CPB bei CABG (n = 19) bei AVR (n = 5) bei MVR (n = 6)	Oxidativer Stoffwechsel von Blutphagozyten: Luminol-verstärkte Chemilumineszenz nach Stimulation mit opsonierten Zymosanpartikeln	Signifikanter Anstieg der spontanen und opsonierter Zymosan stimulierter Chemilumineszenz von kurz bis 24 Stunden nach CPB verglichen mit dem Kontrollwert prä-OP.
Bourbon et al. (Bourbon, Vionnet et al. 2004)	CPB bei CABG Kontrollgruppe (n = 12) Methylprednisolon 5 mg/kg (n = 12) 10 mg/kg (n = 12)	ROS Produktion von PMNL: Inkubation mit Dichloro-Fluoreszein Di-Azetat (DCFH-DA) ohne Stimulation (Konzentrationen nicht angegeben)	Die Ausgangswerte der ROS Produktion stiegen progressiv an, mit einem Maximum 10 Minuten nach Lösen der Aortenklamme. Rückkehr zu Ausgangswerten nach 24 Stunden post-CPB.
Partrick et al. (Partrick, Moore et al. 1999)	CPB bei CABG (n = 6)	Superoxid-Anionen-Produktion von PMNL: SOD-hemmbares Cytochrom C Reduktionsassay nach Stimulation mit 1 mM fMLP	Keine Änderung der in vivo Superoxid-Anionen-Produktion verglichen mit dem Kontrollwert prä-OP. Signifikante Erhöhungen in der fMLP-induzierten O <sub>2</sub> <sup>-</sup> Produktion wurden nach 3, 6 und 12 Stunden nach CPB gemessen (verglichen mit dem Kontrollwert prä-OP). Nach 24 Stunden Rückkehr zu Kontrollwerten, danach wurde eine Erniedrigung der O <sub>2</sub> <sup>-</sup> Produktion bei 36 und 48 Stunden beobachtet.
Schwartz et al. (Schwartz, Shamamian et al. 1998)	CPB bei CABG (n = 8) bei CABG plus AVR (n = 2)	Superoxid-Anionen-Produktion von PMNL: SOD-hemmbares Cytochrom C Reduktionsassay nach Stimulation mit 1 mM fMLP	Keine Änderung der in vivo Superoxid-Anionen-Produktion verglichen mit dem Kontrollwert prä-OP. Erhöhung der fMLP induzierten O <sub>2</sub> <sup>-</sup> Produktion 6 Stunden nach CPB, aber keine Signifikanz gegenüber prä-OP Kontrolle. Nach 24 Stunden Rückkehr zu Kontrollwerten.
Kawahito et al. (Kawahito, Kobayashi et al. 2000)	CPB bei CABG (n = 5) bei ASD, VSD, MVR, AVR, LV Aneurysmaektomie, Mitralklappenplastie (je n = 1)	Aggregation von PMNL: Methode nach Craddock in silikonisierter Glasküvette nach Stimulation mit 10 mM fMLP Superoxid Anionen Produktion von PMNL: SOD-hemmbares Cytochrom C Reduktionsassay nach Stimulation mit 100 U/ml TNF- $\alpha$	Signifikante Anhebung der Aggregation nach 12 Stunden post-OP. Rückkehr zu Normalwerten am 7. post-OP Tag. Nach Ende des CPB signifikante Erniedrigung der TNF- $\alpha$ stimulierten O <sub>2</sub> <sup>-</sup> Produktion, gefolgt von einem signifikanten Anstieg bei 12 Stunden post-OP. Nach 7. Tagen Rückkehr zu Ausgangswerten.

Die Gründe für die genannten Unterschiede in der Literatur sind schwer zu ergründen, mögen aber durch verschiedene Patientengruppen, Methoden und inhomogen gelegenen Messzeitpunkten erklärbar sein.

In einer Studie, welche die Komplementaktivierung und Neutropenie während des CPB untersuchte, hatten PMNL, die spät im Bypass gewonnen worden sind, eine niedrigere Adhärenz zu Nylon und eine selektive chemotaktische sowie aggregatorische Insensitivität auf C5a, was der Autor Hammerschmidt auf Kontakt mit aktivierten Komplement zurück führte (Hammerschmidt, Stroncek et al. 1981). Die Aktivierung von Komplementsignalwegen, ein wichtiger Faktor für die leukozytäre Aktivierung während

offenen Herzoperationen (Struber, Cremer et al. 1999), fördert zwar die Adhäsion und Phagozytose, trägt aber gleichzeitig zur CPB verursachten systemischen Inflammation bei (Struber, Cremer et al. 1999) (Gu, Mariani et al. 1998). Neben Komplement sind eine Vielzahl anderer Mediatoren der Inflammation erhöht (IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-8), die als „priming“ Substanzen für PMNL agieren können. Neutrophiles „Priming“ wurde als eine Zustandsänderung beschrieben, nachdem die PMNL stärker auf einen zweiten aktivierenden Stimulus reagieren (Kawahito, Kobayashi et al. 2000), und es zu einer übermäßigen Freisetzung von freien Sauerstoffradikalen und Proteinasen kommt (Schwartz, Shamamian et al. 1998) (Walker and Ward 1992).

Zur Überprüfung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktionsfähigkeit von PMNL in Antwort auf lösliche inflammatorischen Mediatoren wurden sie in unserer Studie mit TNF- $\alpha$  „geprimed“ und durch das chemotaktische Tripeptid fMLP, welches die Aktivität von Bakterien-stammenden Peptiden mit formylierten n-terminalen Methionin imitiert, zur Bildung von ROS angeregt. Dabei zeigte sich, dass die PMNL bei MZP 3 im gleichen Status wie vor der OP sind. Erst nach 24 Stunden zeigte sich eine signifikant erhöhte Aktivierung, die nach 48 Stunden den maximalen Wert erreicht. Diese mag auf eine Hochregulierung von fMLP Rezeptoren auf der Zelloberfläche zurückzuführen sein, oder man kann auch annehmen, dass die PMNL durch lösliche Stimuli sensitiviert („geprimed“) worden sind.

Die Erhöhung der potentiellen Aktivität der PMNL nach einer Herzoperation durch Evaluierung der extrazellulären Freisetzung von ROS wird durch eine Anzahl von Autoren in der Literatur beschrieben (Tab. 10). Bei Bourbon et al. stieg die ROS Produktion ohne eine zusätzliche Stimulation während des CPBs zunehmend mit einem Maximum 10 Minuten nach Öffnen der Aortenklemme an und fiel dann innerhalb der ersten postoperativen 24 Stunden auf Ausgangswerte zurück (Bourbon, Vionnet et al. 2004). Mit einer alleinigen Stimulation mit TNF- $\alpha$  stellten Kawahito et al. einen signifikanten Anstieg 12 Stunden nach der OP fest (Kawahito, Kobayashi et al. 2000), während andere Autoren durch

alleinige Stimulation mit fMLP einen Anstieg bei 2 Stunden (Gessler, Pfenninger et al. 2002), 3 Stunden (Partrick, Moore et al. 1999), 6 Stunden (Schwartz, Shamamian et al. 1998) oder sogar erst bei 72 Stunden (Zilberstein, Levy et al. 2002) nach OP beobachteten. Ähnlich zu Kawahito et al. (Kawahito, Kobayashi et al. 2000) berichteten auch Menasché et al. (Menasche, Pasquier et al. 1988) und Prasad et al. (Prasad, Kalra et al. 1992), dass die potentielle Freisetzung von Sauerstoffradikalen bei CABG-Patienten erhöht ist. Simulierte extrakorporale Zirkulation ergab bei einer Untersuchung von Stahl et al. eine erhöhte Sensitivität der PMNL gegenüber fMLP (Stahl, Fisher et al. 1991).

Zusammengefasst stehen unsere Ergebnisse in Einklang mit der Mehrheit vergleichbarer Studien, die insgesamt für eine biphasische Entwicklung einer Granulozytendysfunktion während CPB sprechen. Die erste Phase betrifft den Zeitraum während und kurz nach der Operation, mit abgeschwächter Phagozytose und der damit assoziierten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion. Dieser schliesst sich unmittelbar eine Phase an, in der die PMNL bei *ex vivo* Stimulierung eine stärkere extrazelluläre Freisetzung potenziell gewebeschädigender ROS aufweisen.

In Zusammenhang mit der biphasischen Entwicklung einer Granulozytendysfunktion ist die Beobachtung interessant, dass Patienten in der Studie von Wenisch, die postoperatives Fieber und/oder eine lokalisierte Infektionen entwickelten, eine herabgesetzte Phagozytose und assoziierte Sauerstoffradikalproduktion am fünften Tag nach der OP hatten, was mit Ergebnissen von Patienten mit schweren Infektionen (Wenisch, Parschalk et al. 1995) oder Septikämie (Young 1981) (Zimmerman, Millard et al. 1989) übereinstimmt. Folglich zeigt der von uns beobachtete Defekt in den verschiedenen mikrobiziden Partialfunktionen der PMNL (Adhärenz, Phagozytose und assoziierter ROS Produktion) eine erhöhte Gefährdung für Infektionen auf, der erhebliche Bedeutung in Bereichen des

Körpers mit niedrigen Serumopsoninkonzentration, wie z.B. der Lunge oder der Mikrozirkulation, zukommt. In der zweiten Phase könnte eine Infektion, welche bekanntlich die Bildung eines breiten Spektrums an löslichen Entzündungsmediatoren induziert, eine massive extrazelluläre Freisetzung von ROS mit erheblichen negativen Folgen für den Patienten auslösen. Tatsächlich zeigten Patienten mit akuter Pankreatitis, die ein Multiorganversagen (MOV) und nachfolgenden Tod erlitten, eine persistierende Hochregulierung des oxidativen Stoffwechsels ihrer PMNL (Simms and D'Amico 1994), was auf die verheerende gewebeschädigende Wirkung der ROS hinweist. Mit dem Ziel der gleichzeitigen Prävention von Infektionen und oxidativen Schäden wäre daher ein Medikament wünschenswert, welches die mikrobiziden Eigenschaften von PMNL nicht beeinflusst und gleichzeitig eine überschüssige Freisetzung potenziell zytotoxischer O<sub>2</sub>-Radikale verhindert.

## **5.2 Selektive Modulation der Granulozytendysfunktion durch Adenosin**

Eine vielversprechende Substanz stellt dabei das körpereigen gebildete Nukleosid Adenosin dar. Wenngleich Adenosin viele der im Rahmen eines SIRS oder einer Sepsis betroffenen Organsysteme beeinflusst (Conlon, Ross et al. 2005), wurden in der vorliegenden Arbeit vor allem die Wirkungen des Nukleosids auf die mikrobiziden und potentiell gewebeschädigenden Partialfunktionen zirkulierender PMNL charakterisiert. Dabei können PMNL selbst direkt aber auch indirekt zur Bildung von Adenosin im Sinne einer Feedback-Regulation beitragen. Es wird angenommen, dass neutrophile Granulozyten und Endothelzellen bei Infektionen, Inflammation und metabolischem Stress sogar die Hauptquellen von Adenosin sind (Cronstein 1994). Aufgrund des an Endothelzellen verursachten Schadens durch PMNL wird ATP freigesetzt, was anhand einer hochaktiven Kaskade von Ektonukleotidasen auf der Endothelzelloberfläche zu Adenosin abgebaut wird (Pearson and Gordon 1985). Zusätzlich können PMNL selber

Adenosin während ihrer Aktivierung bilden (Newby and Holmquist 1981). Weitere Schäden an Strukturen der Mikrozirkulation reflektieren sich in der Unterbrechung der lokalen Blutzufuhr und tragen über die damit entstehende Gewebshypoxie mit der nachfolgender Degradierung von ATP und der Hypoxie-assoziierten Hemmung der Adenosinkinase zur vermehrter Entstehung von Adenosin bei (Decking, Schlieper et al. 1997) (Van Belle, Goossens et al. 1987). Aufgrund dieses Konzepts bietet sich die Bestimmung von Adenosin im Plasma als ein sensitiver Indikator für die Entwicklung von exzessiven Gewebsschäden an (Weigand, Michel et al. 1999).

Die Wirkung von extrazellulär freigesetzten Adenosins auf die Funktionen von Granulozyten richtet sich nach der Stimulierung des entsprechenden Rezeptorsubtyps sowie deren Dichte und Affinität zum Nukleosid ( $A_1\text{-R} \gg A_{2A}\text{-R}$ ), wobei zwischen  $A_1$  und  $A_{2A}$  Rezeptoren ein funktioneller Antagonismus besteht. Deswegen wird die Adhäsion an das vaskuläre Endothel durch niedrigere Konzentrationen von Adenosin durch  $A_1$  Rezeptoren auf den PMNL (Cronstein, Levin et al. 1992) (Felsch, Stocker et al. 1995) und Endothelzellen (Zahler, Becker et al. 1994) (Zahler 1998) verstärkt, wohingegen höhere, im mikromolaren Bereich gelegene Konzentrationen, die Adhäsion hemmen (Cronstein, Levin et al. 1986) (Grisham, Hernandez et al. 1989) (Lesch, Ferin et al. 1991). Letztere Wirkung beruht vermutlich nicht nur auf einer Aktivierung der  $A_{2A}$ , sondern auch von  $A_{2B}$  Rezeptoren (Sullivan, Carper et al. 1995) (Minamino, Kitakaze et al. 1996) (Thiel, Chambers et al. 1996) (Eltzschig, Thompson et al. 2004). Die Chemotaxis von PMNL wird durch nanomolare Konzentrationen des Nukleosids über die Stimulation des  $A_1$  Rezeptors begünstigt (Rose, Hirschhorn et al. 1988) (Cronstein, Daguma et al. 1990). Gleichermassen verhält es sich mit der Phagozytose, wo Adenosin die Phagozytose durch  $A_1$  Aktivierung verstärkt und durch den  $A_2$  Rezeptor hemmt (Salmon, Edberg et al. 1990) (Zalavary, Stendahl et al. 1994) (Zalavary and Bengtsson 1998). Entsprechenderweise reguliert Adenosin auch den oxidativen Stoffwechsel von PMNL, indem die ROS

Produktion durch den A<sub>1</sub> Rezeptor verstärkt wird (Salmon, Edberg et al. 1990) und durch den A<sub>2A</sub> Rezeptor gehemmt wird (Cronstein, Kramer et al. 1983) (Thiel and Bardenheuer 1992). Aufgrund der entgegengesetzten Effekte ist die regulatorische Rolle von Adenosin sehr wahrscheinlich von seiner Gewebekonzentration abhängig und bietet die Möglichkeit, gesundes Gewebe vor ROS-vermittelten Schaden zu schützen, ohne die intrazelluläre Destruktion von Pathogenen zu vermindern, was tierexperimentell beim Schwein gezeigt wurde (Thiel, Holzer et al. 1997). In dieser Studie wurde Schweinen mit hyperdynamer Endotoxinämie Adenosin intravenös kontinuierlich appliziert, wodurch eine überschießende extrazelluläre Superoxidanionproduktion stark gehemmt werden konnte, ohne die für die Abtötung von Mikroorganismen notwendige Phagozytose und die damit verbundene intrazelluläre ROS Produktion zu beeinträchtigen (Thiel, Holzer et al. 1997).

In Einklang mit den Ergebnissen dieser tierexperimentellen Studien zeigte sich in unserer klinischen Studie, dass zirkulierende PMNL, die zu verschiedenen Zeitpunkten während CPB entnommen wurden und *ex vivo* mit einer maximal-wirksamen Konzentration von Adenosin (10<sup>-6</sup> M) inkubiert wurden, keine Hemmung der Adhärenz- und ihrer Phagozytosefunktion aufwiesen. Auch die mit der Phagozytose-assoziierte Radikalproduktion der PMNL zeigte allenfalls nur eine geringe Reduktion. Indes hemmte die gleiche Adenosinkonzentration die nach Stimulation mit TNF- $\alpha$  und fMLP induzierte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion der PMNL zu jedem Zeitpunkt maximal. Damit bestätigt sich auch für Granulozyten, die von Patienten gewonnen wurden, dass Adenosin die mikrobiziden und potentiell gewebe-toxischen Partialfunktionen selektiv beeinflussen kann. Insbesondere zeigen die *ex vivo* Inkubationsstudien, dass Adenosin trotz Anwendung hoher Konzentration eine im Rahmen des CPB sich entwickelnde Beeinträchtigung der Mikrobizität nicht weiter verstärkt, sondern im Sinne der selektiven Modulation der Granulozytendysfunktion vorwiegend der Freisetzung zytotoxischer, potentiell gewebeschädigendem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ausgeprägt entgegen-wirkt.

### 5.3 Der Adenosin A<sub>2A</sub>-Rezeptor vermittelt den Hemmeffekt von Adenosin

Die Tatsache, dass Adenosin die Sauerstoffradikalproduktion von PMNL verschiedener Spezies *in vitro* hemmen kann, ist seit über 20 Jahren bekannt und gut erforscht. Cronstein et al. berichteten bereits 1983, dass Adenosin die fMLP-stimulierte ROS Bildung von PMNL in einer Konzentration von 1 bis 1000 nM nachweislich hemmte, mit einer halbmaximalen Inhibition bei 100 nM (Cronstein, Kramer et al. 1983). Zudem wurde gezeigt, dass eine zelluläre Aufnahme von Adenosin oder sein Metabolismus nicht für die beobachtete Hemmung der ROS Produktion verantwortlich ist, und dadurch seine Wirkung auf einem Rezeptor der Zelloberfläche beruhen musste (Cronstein, Kramer et al. 1983) (Roberts, Newby et al. 1985). Die stärkere Hemmung der ROS-Produktion durch die selektiven A<sub>2</sub>-Rezeptoragonisten NECA (Cronstein, Rosenstein et al. 1985) und CGS 21680 (Dianzani, Brunelleschi et al. 1994) demonstrierten ferner, dass Adenosin höchstwahrscheinlich über einen A<sub>2</sub>-Rezeptor die Hemmung der Radikalbildung ausübt. PMNL exprimieren zwei Arten von A<sub>2</sub>-Rezeptorsubtypen (A<sub>2A</sub> und A<sub>2B</sub>), wobei die Adenosin-induzierte Hemmung der fMLP aktivierten Leukozyten durch den A<sub>2A</sub>-Rezeptor hervorgerufen wird (Fredholm, Zhang et al. 1996). In Einklang damit konnte auch in unseren Testreihen aufgezeigt werden, dass bei der Zugabe des A<sub>2A</sub>-Rezeptor-antagonisten ZM 241385 der ausgeprägte Hemmeffekt von Adenosin auf die TNF- $\alpha$ /fMLP stimulierte Radikalproduktion vollständig aufgehoben worden ist. Im Gegensatz dazu konnte durch die Zugabe von Antagonisten für den A<sub>1</sub>- (DPCPX) oder den A<sub>3</sub>-Rezeptor (VUF 5574) die hemmende Wirkung von Adenosin nicht beseitigt werden, sodass diese Ergebnisse die hemmende Wirkung von Adenosin über den A<sub>2A</sub> Rezeptor indirekt bestätigten. Dies steht im Einklang mit den früheren Berichten.

#### 5.4 Desensitivierung des Adenosin A<sub>2A</sub>-Rezeptors während CPB

Berechnet man anhand der im Zeitverlauf der Messpunkte erhobenen Dosis-Wirkungskurven die halbmaximal wirksamen Hemmkonzentrationen von Adenosin auf die TNF- $\alpha$ /fMLP stimulierte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion, dann zeigt sich, dass es zu einer zunehmenden Verschiebung der Hemmkurven nach rechts und somit zu zunehmend höheren IC<sub>50</sub>-Werten kommt. Von MZP 1 nach MZP 4 nimmt die IC<sub>50</sub> um den Faktor 2,3 zu, und ist bei MZP 5 immer noch 2-fach erhöht. Eine Rechtsverschiebung der Hemmkurven nach OP bedeutet, dass die anti-inflammatorische Potenz von Adenosin auf die PMNL abgeschwächt ist, da entsprechend der Erhöhung der IC<sub>50</sub> auch 2,3 bzw. 2 mal höhere Adenosinspiegel nötig sind, um eine 50% Hemmung der ROS-Produktion im Vergleich zu den Werten vor der CABG-OP zu erreichen. Diese Ergebnisse sprechen für die Entwicklung einer Desensitivierung des A<sub>2A</sub>-Rezeptor-Signalweges auf den zirkulierenden PMNL von Patienten während CPB. Ursache hierfür ist keine funktionelle Hochregulation der zum A<sub>2A</sub> Rezeptor antagonistisch wirksamen A<sub>1</sub> und A<sub>3</sub> Rezeptoren, da zu keinem der MZP weder der A<sub>1</sub> - noch der A<sub>3</sub> Rezeptorantagonist DPCPX bzw. VUF 5574 die TNF- $\alpha$ /fMLP stimulierte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion im Vergleich zur Kontrollstimulation verminderte. Ähnliche Befunde, die für eine Desensitivierung des Adenosin – A<sub>2A</sub> Rezeptorsystems sprechen, wurden auch bei Patienten mit Sepsis von unserer Arbeitsgruppe erhoben. So zeigte sich eine um den Faktor 4,6 höhere IC<sub>50</sub> bei Patienten mit Sepsis gegenüber gesunden Probanden (Kaufmann, Hoelzl et al. 2007). Die Verminderung des Hemmeffektes von Adenosin auf überschießend aktivierte Granulozytenfunktionen bei Patienten mit SIRS, sei es infolge eines großen operativen Eingriffs unter Anwendung der HLM oder infolge einer Infektion, ist überraschend, denn viele inflammatorische Mediatoren können die Expression von A<sub>2A</sub> Rezeptoren steigern. So konnten mehrere Autoren (Tab. 11) nach Stimulierung mit wichtigen inflammatorischen Zytokinen wie IL-1 und TNF- $\alpha$  oder dem Endotoxin LPS eine Hochregulierung an A<sub>2A</sub>- Rezeptor mRNA und

Protein in PMNL (Fortin, Harbour et al. 2006) sowie in monozytären (Khoa, Montesinos et al. 2001), phäochromozytalen (Trincavelli, Costa et al. 2002), epithelialen (Morello, Ito et al. 2006), mesothelialen (Rogachev, Ziv et al. 2006) und endothelialen (Nguyen, Montesinos et al. 2003) Zelllinien feststellen. Die beschriebene Hochregulation des A<sub>2A</sub>-Rezeptors nach Aktivierung von Immunzellen mit pro-inflammatorischen Zytokinen *ex vivo* konnte auch *in vivo* am Modell des LPS-induzierten Lungenschadens demonstriert werden (Thiel, Chouker et al. 2005).

Interessant ist allerdings die Tatsache, dass die Hochregulierung des A<sub>2A</sub>-Rezeptors keinen Einfluss auf die durch den A<sub>2A</sub>-Rezeptoragonisten CGS 21680 induzierte Hemmung der Sauerstoffradikalbildung nach fMLP-Stimulierung hatte. Darüber hinaus führte das von T-Lymphozyten und NK Zellen im Körper produzierte IFN- $\gamma$  bei monozytären (Khoa, Montesinos et al. 2001), mesothelialen (Rogachev, Ziv et al. 2006) und endothelialen (Nguyen, Montesinos et al. 2003) Zelllinien zu einer verminderten Expression der A<sub>2A</sub>-Rezeptor mRNA und des Proteins und erhöhte gleichzeitig die A<sub>2B</sub>-Rezeptor-expression (Rogachev, Ziv et al. 2006) (Nguyen, Montesinos et al. 2003).

**Tabelle 11: Studienübersicht von Adenosinrezeptorexpression bei Inflammation (A<sub>2A</sub>-R: A<sub>2A</sub>-Rezeptor)**

Autor	Untersuchung/Modell	Ergebnisse
Fortin et al. (Fortin, Harbour et al. 2006)	Effekt von inflammatorischen Stimuli auf frisch isolierte PMNL	A <sub>2A</sub> -R mRNA ist maximal hochreguliert nach 4 Stunden Stimulation mit LPS, TNF- $\alpha$ > IL-1 $\beta$ , aber nicht die A <sub>2B</sub> -R mRNA; Abfall bei 21 Stunden. A <sub>2A</sub> -R Protein ist auch erhöht nach 4 Stunden LPS oder TNF- $\alpha$ Inkubation, Abfall der Proteinexpression nach 12 oder 16 Stunden. Die Hochregulierung des A <sub>2A</sub> -R hatte keinen Einfluss auf die CGS 21680-induzierte Hemmung der ROS-Produktion nach fMLP-Stimulierung der PMNL.
Khoa et al. (Khoa, Montesinos et al. 2001)	Effekt von Th-1 inflammatorischen Zytokinen auf Funktion und Expression von A <sub>2A</sub> -R in der humanen monozytischen Zelllinie THP-1	IL-1 und TNF- $\alpha$ erhöhten A <sub>2A</sub> -R mRNA und Protein. IFN- $\gamma$ regulierte die A <sub>2A</sub> -R mRNA und Proteinspiegel herunter.
Trincavelli et al. (Trincavelli, Costa et al. 2002)	Effekt von proinflammatorischen Zytokinen auf die A <sub>2A</sub> -R Genexpression im Phäochromozytom Klon PC12	IL-1 und TNF- $\alpha$ erhöhten A <sub>2A</sub> -R mRNA und Protein nach 3 Stunden mit einem Maximum zwischen 24 und 48 Stunden. A <sub>2A</sub> -R Dichte auf den PC12 war erhöht, eine Veränderung der Affinitätskonstante wurde nicht beobachtet.
Morello et al. (Morello, Ito et al. 2006)	Effekt von inflammatorischen Schlüsselmediatoren auf die Expression des A <sub>2A</sub> -Rezeptors in der epithelialen Lungenzelllinie A549	IL-1- $\beta$ und TNF- $\alpha$ erhöhten die Expression des A <sub>2A</sub> -R Gens auf mRNA und Proteinlevel; LPS hatte keinen Effekt auf die Expression des Rezeptors.
Nguyen et al. (Nguyen, Montesinos et al. 2003)	Effekt von IL-1, TNF- $\alpha$ und IFN- $\gamma$ auf Adenosinrezeptor-expression auf humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen (HMVEC)	HMVEC exprimieren A <sub>2A</sub> - und A <sub>2B</sub> -R mRNA und Protein, nicht aber von A <sub>1</sub> - und A <sub>3</sub> -R. IL-1 und TNF- $\alpha$ erhöhten A <sub>2A</sub> - und A <sub>2B</sub> -R mRNA und Proteinspiegel. IFN- $\gamma$ erhöhte die Expression von A <sub>2B</sub> -R, erniedrigte die Expression von A <sub>2A</sub> -R.
Thiel et al. (Thiel, Chouker et al. 2005)	Einfluss der Oxygenierung auf die Exazerbation der akuten inflammatorischen Lungenschädigung Mäusemodell: intratracheale Injektion von LPS	<i>in-vivo</i> LPS aktivierte Granulozyten wiesen erhöhte Werte von A <sub>2A</sub> -R mRNA auf, die A <sub>1</sub> -R mRNA war geringfügig niedriger verglichen mit Kontrollgranulozyten.
Rogachev et al. (Rogachev, Ziv et al. 2006)	Rolle von Adenosin während einer Peritonitis und Beteiligung von peritonealen Mesothelialzellen (PMC) in der Adenosinregulation Mäusemodell: <i>Escherichia coli</i> verursachte Peritonitis	A <sub>1</sub> -R Protein: Erhöht bei 12 Stunden, Abfall bei 24 Stunden nach Inokulation. A <sub>2A</sub> -R Protein: Erhöht bei 24 Stunden, zeitgleich mit erhöhten Adenosinspiegel. A <sub>2B</sub> -R Protein: langsame Erhöhung bis zu 48 Stunden nach Inokulation. In humanen PMC erhöhten IL-1 $\alpha$ und TNF- $\alpha$ den A <sub>2A</sub> - und A <sub>2B</sub> -R, jedoch erhöhte IFN- $\gamma$

	PMC von Mäusen und Menschen	den A <sub>2B</sub> -R und erniedrigte den A <sub>2A</sub> -R.
Kolachala et al. (Kolachala, Asamoah et al. 2005)	A <sub>2B</sub> -R Expression bei Kolitis und Effekte von TNF- $\alpha$ auf intestinale Epithelzellen	A <sub>2B</sub> -R Expression ist während aktiver Kolitis erhöht. TNF- $\alpha$ Vorbehandlung von intestinalen Epithelzellen erhöhte die A <sub>2B</sub> -R mRNA und Proteinspiegel.
Capecchi et al. (Capecchi, Camurri et al. 2005)	Rolle von A <sub>2A</sub> -R in der Modulation von TNF- $\alpha$ Produktion und ex vivo Effekt von TNF- $\alpha$ auf periphere mononukleäre Zellen im Blut (PBMC) bei Patienten mit kongestivem Herzversagen (CHF)	TNF- $\alpha$ Produktion nach LPS Stimulation in PBMC von CHF Patient ist verglichen mit der Kontrollgruppe erhöht. A <sub>2A</sub> -R Expression ist höher in CHF Patienten als in der Kontrollgruppe. TNF- $\alpha$ Stimulierung erhöhte die A <sub>2A</sub> -R Expression in der Kontrollgruppe, aber nicht in CHF Patienten.
Carrega et al. (Carrega, Fenouillet et al. 2007)	Einfluss von Hämodialyse (HD) und linksventrikulärem Herzversagen (LVF) auf Adenosinplasmaspiegel und A <sub>2A</sub> -R Expression von mononukleären Zellen des peripheren Blutes in Patienten mit chronischen Nierenversagen (CRF)	Die Anzahl von A <sub>2A</sub> -R war in CRF Patienten mit oder ohne LVF erniedrigt. A <sub>2A</sub> -R mRNA war in HD Patienten verglichen mit Kontrollen erhöht.

Eine unterschiedliche Expression von Adenosinrezeptoren wurde auch für Patienten mit chronischen Erkrankungen beschrieben. Kongestives Herzversagen erhöhte die A<sub>2A</sub>-Rezeptorexpression (Capecchi, Camurri et al. 2005), während chronisches Nierenversagen die Expression erniedrigte (Carrega, Fenouillet et al. 2007). Somit lässt sich aufgrund der aufgezeigten unterschiedlichen Regulierung durch Zytokine, Grunderkrankungen und Zeitverläufe über die absolute Rezeptorexpression auf den PMNL unserer Studienpatienten ohne mRNA- und Proteinbestimmungen wenig aussagen. Neben einer möglichen Verminderung der Zahl an A<sub>2A</sub>-Rezeptoren auf den PMNL ist womöglich auch eine Reduktion der Bindungsaffinität des Rezeptors oder der Beeinträchtigung der Signaltransduktion auf der Ebene der G-Protein-Interaktion durch allosterische Veränderungen des Rezeptors als Ursache einer Desensitivierung nicht auszuschließen. Das Phänomen der Desensitivierung von A<sub>2A</sub> Rezeptoren ist nicht neu, allerdings wurde es bisher nicht in *ex vivo* Untersuchungen beim Menschen, sondern nur in *in vitro* Untersuchungen nach Kurzzeit- (Palmer and Stiles 1997) und Langzeitexposition (Palmer, Gettys et al. 1994) (Chern, Lai et al. 1993) einzelner Zellarten mit höheren Agonistenkonzentrationen beschrieben. Bei schneller Desensitivierung vermag die Phosphorylierung des Rezeptors die G-Proteinkopplung beeinflussen und die Adenylatzyklase hemmen, während bei Langzeitstimulierung die Herunterregulierung der Rezeptoranzahl und des G<sub>s</sub>- $\alpha$  Proteins sowie der Hochregulierung der G<sub>i</sub>- $\alpha$ 2 und  $\alpha$ 3 Proteine und der Phosphodiesterase eine Rolle spielen (Palmer, Gettys et al. 1994) (Chern, Lai et al. 1993). Da die Plasmakonzentrationen von Adenosin jedoch eher im unteren

Normbereich blieben, scheidet eine zu intensive Exposition der PMNL mit Adenosin als Ursache für die beobachtete Rezeptordesensitivierung eher aus.

### **5.5 Plasmakonzentrationen von Adenosin**

Anhand der Literatur würde man erwarten, dass Patienten, die ein schweres SIRS- oder Sepsis-Syndrom entwickeln, erhöhte Spiegel an Adenosin aufweisen. In einer Studie von Martin et al. wurden im Vergleich zu Gesunden ( $0,8 \pm 0,3 \mu\text{M}$ ) erhöhte Adenosinwerte für die schwere Sepsis ( $3,9 \pm 1,9 \mu\text{M}$ ) und den septischen Schock ( $8,4 \pm 0,75 \mu\text{M}$ ) im Plasma gemessen (Martin, Leone et al. 2000). Kaufmann et al. ermittelten 3-fach signifikant erhöhte Spiegel von Adenosin im Plasma von Patienten im septischen Schock ( $125.6 \pm 18.2 \text{ nM}$ ) gegenüber Gesunden ( $42.5 \pm 2,9 \text{ nM}$ ) (Kaufmann, Hoelzl et al. 2007). Patienten, die einen mit CPB operierten Aortenklappenersatz erhielten und eine operative Vasoplegie und ein schweres postoperatives SIRS ( $1.6 \mu\text{M}$  gegenüber  $0.4 \mu\text{M}$  bei unkompliziertem Verlauf) entwickelten, hatten signifikant erhöhte Adenosinspiegel vor und während der OP (Kerbaul, Collart et al. 2006). Die in unserer Studie gemessenen Adenosinspiegel im Blutplasma befinden sich im Bereich von 10 bis 100 nM. Ausgehend von MZP 1 steigt der Adenosinplasmaspiegel bei der Narkoseeinleitung an, um dann bis zu 48 Stunden nach der Operation stetig abzufallen. Trotz der insgesamt niedrigen Adenosinwerte unserer Patienten im Vergleich zu Werten bei Sepsis und schwerem SIRS anderer Studien korrelieren die Werte in der postoperativen Phase mit dem Interleukin-6, was bedeutet, dass Patienten, die eine ausgeprägtere proinflammatorische Antwort auf den CABG-Eingriff aufwiesen, auch erhöhte Adenosinspiegel im Plasma hatten. Erhöhte Adenosinspiegel zeigten einen prognostischen Wert bei kritisch kranken Sepsispatienten (Martin, Leone et al. 2000) an, und erhöhte IL-6 Spiegel nach der HLM haben einen prädiktiven Wert für Infektionen (Sander, von Heymann et al. 2006). Aufgrund der Höhe und des Verlaufs der von uns bestimmten Plasmaspiegel für Adenosin und IL-6 kann man

davon ausgehen, dass unsere Patienten, trotz der dysregulierten PMNL Funktionen, ein nur mildes SIRS aufwiesen. Da andererseits der Adenosin  $A_{2A}$  Rezeptor in seiner Funktion aufgrund der Desensitivierung während CPB zunehmend beeinträchtigt wurde und die Plasmakonzentrationen von Adenosin tendenziell in den subnormalen Wertebereich absanken, kann spekuliert werden, dass das endogene Adenosin  $A_{2A}$  Rezeptor System eine nur unzureichende Kontrolle auf die systemische Inflammation ausübte. Basierend auf diesen Befunden einer  $A_{2A}$  Rezeptordesensitivierung bei relativ niedrigen Adenosinplasmakonzentrationen könnte die kontinuierliche Infusion des Nukleosids sinnvoll erscheinen, um der Entwicklung eines SIRS bei herzchirurgischen Eingriffen mit CPB vorzubeugen. Dies wird in zukünftigen Studien zu prüfen sein.

## **5.6 Einfluß der Anästhesie und anderer Variablen**

Bei der Interpretation unsere Ergebnisse sollte der Einfluss der Anästhetika berücksichtigt werden. Anästhetika können eine leichte Immunsuppression bewirken. Das zur Prämedikation der Patienten verwendete Benzodiazepin Midazolam beeinflusst in klinisch relevanten Dosen die neutrophile Polarisation jedoch nicht (O'Donnell, McSharry et al. 1992) und hat nur minimale Effekte auf die Phagozytoseeigenschaft der PMNL und die nachfolgende ROS-Produktion (Heine, Leuwer et al. 1996). Allerdings vermindert das volatile Anästhetikum Isofluran die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) von mononukleären Zellen (Mitsuhata, Shimizu et al. 1995) und scheint die Hydroxylradikalproduktion konzentrationsabhängig zu reduzieren (Nakamura, Kashimoto et al. 1999). Um verfälschende Effekte von langen Transport- und Liegezeiten auf die abgenommenen Blutproben zu minimieren, wurde die Dauer zwischen Entnahme und Analytik der Blutproben auf eine Stunde standardisiert. Zusätzlich wurde die Temperatur und die Zentrifugation der gewonnenen Proben standardisiert. Nach abgeschlossener Verarbeitung wurden die Proben nach dem letzten Inkubationsschritt sofort gemessen.

## 6.0 Zusammenfassung

In unserer klinischen Studie wurde der Einfluss der Herz-Lungen-Maschine bei kardiochirurgischem Herzbybypasseingriff auf die mikrobiziden und zytotoxischen Funktionen von zirkulierenden PMNL untersucht und deren Regulation durch das Adenosin –  $A_{2A}$  Rezeptorsystem im Rahmen eines postoperativen SIRS analysiert.

Dabei wurde versucht, folgende Fragen zu beantworten:

1. Wie werden die mikrobiziden Partialfunktionen, die Adhäsion, Phagozytose und die Phagozytose-assoziierte Sauerstoffradikalproduktion sowie die extrazelluläre Freisetzung potentiell gewebschädigender Sauerstoffradikale (ROS) der PMNL durch den CPB beeinflusst?
2. Welche Auswirkungen hat Adenosin auf diese PMNL Funktionen *in vitro*?
3. Wie verändert sich die  $A_{2A}$ -Rezeptorfunktion im Hinblick auf die Regulation der potentiell zytotoxischen Sauerstoffradikalproduktion bzw. wie verändert sich die funktionelle Expression des  $A_{2A}$ -Rezeptors durch den CPB?
4. Wie verhalten sich die Plasmaspiegel von Adenosin im perioperativen Verlauf?

Dabei haben sich folgende Ergebnisse gezeigt:

- Die Adhärenz sowie die Phagozytose von nicht-opsonierten Zymosanpartikeln und die damit einhergehende intrazelluläre  $H_2O_2$ -Produktion zeigten eine Reduktion während der Operation, die bis zu 6 Stunden danach noch ersichtlich war. Die durch lösliche Stimuli induzierbare potentiell gewebschädigende extrazelluläre  $H_2O_2$ -Produktion stieg 24 bis 48 Stunden nach der OP an.
- Die Zugabe von einer im maximalen Hemmbereich gelegenen Adenosinkonzentration beeinflusste die mikrobiziden Funktionen der PMNL *in vitro* nicht, sondern

hemmte im Gegensatz dazu die potentiell gewebeschädigende extrazelluläre  $H_2O_2$ -Produktion zu jedem Zeitpunkt.

- Der Hemmeffekt von Adenosin auf die extrazelluläre Freisetzung von potentiell gewebeschädigendem  $H_2O_2$  nahm im postoperativen Verlauf ab, erkennbar an der Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungskurven mit einem 2,3 bzw. 2 fachen Anstieg der halbmaximalen Hemmkonzentration ( $IC_{50}$ ) am 1. bzw. 2. postoperativen Tag. Dementsprechend wären 2,3 bzw. 2 mal höhere Adenosinkonzentrationen nötig, um einen im Vergleich zur präoperativen Situation gleich stark ausgeprägten Hemmeffekt 24 bzw. 48 Stunden nach OP zu erzielen.
- Die Adenosinplasmaspiegel stiegen transient tendenziell an und fielen mit den geringsten Werten 48 Stunden nach der OP ab.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass es bei Patienten, die sich einem koronarchirurgischen Eingriff mit der Herz-Lungen-Maschine unterziehen, zur Entwicklung einer Dysfunktion der PMNL kommt. Diese PMNL-Dysfunktion manifestiert sich in einer transienten Abschwächung der mikrobiziden Partialfunktionen der Granulozyten und einer an Intensität im postoperativen Verlauf zunehmenden Erhöhung der Fähigkeit der PMNL, potenziell gewebeschädigende ROS zu bilden. Adenosin ist in der Lage, selektiv auf diese Störungen einzuwirken, indem es über eine Aktivierung des  $A_{2A}$ -Rezeptors eine wünschenswerte Hemmung der extrazellulären Freisetzung von gewebetoxischen ROS ausübt, ohne dabei die mikrobiziden Partialfunktionen der PMNL zu beeinträchtigen. Im zeitlichen Verlauf konnten wir allerdings eine zunehmende Desensitivierung des  $A_{2A}$ -Rezeptors beobachten. So zeigte sich die Desensitivierung des Adenosin –  $A_{2A}$  Rezeptorsystems an dem mit Beginn der Operation einsetzenden und zunehmenden Anstieg der halb-maximalen Hemmkonzentration des Nukleosids auf die fMLP stimulierte zytotoxische  $H_2O_2$ -Produktion. Bei der im Vergleich zur präoperativen Situation

beobachteten Erhöhung der  $IC_{50}$  um den Faktor 2,3 bis 2 am 1. und 2. postoperativen Tag wären damit mindestens doppelt so hohe Konzentrationen im Plasma der Patienten notwendig, um vor einer überschüssigen Bildung von toxischen Sauerstoffradikalen zu schützen. Die Analyse der Konzentrationen von Adenosin im Plasma zeigen jedoch eine Abnahme des Nukleosids, so dass das endogene anti-inflammatorisch wirksame Adenosin –  $A_{2A}$  Rezeptorsystem im Verlauf an regulierendem Einfluss verliert.

In weiterführenden Untersuchungen wäre es somit interessant zu prüfen, ob man durch eine intravenöse Adenosininfusion Patienten vor der Entstehung von inflammatorischen Organschäden beim Einsatz der Herz-Lungen-Maschine schützen kann, ohne jedoch dabei die für die Abwehr von Mikroorganismen wichtigen mikrobiziden Partialfunktionen von zirkulierenden PMNL zu beeinträchtigen. Es wird Ziel zukünftiger Studien sein, die therapeutische Effektivität von Adenosin zur selektiven Modulation einer perioperativ erworbenen PMNL Dysfunktion aufzuzeigen.

## 7 Anhang

### 7.1 Material

#### Gerätschaften

• *Durchflußzytometer:*

FACScan™ – Becton Dickinson Immunocytometry Systems, Kalifornien, U.S.A.

Serien-Nr. 81614

CELLQuestPro Software – Becton Dickinson Biosciences, Kalifornien, U.S.A

• *Zellzähler:*

Coulter Counter Multisizer II – Coulter Electronics Ltd, Luton, England

Serien-Nr. Y0200074

• *Chromatograph:*

HPLC

• *Ultraschallbad:*

Sonorex Super Rk 510 H – Bandelin Electronic, Berlin, Deutschland

Serien-Nr. 321117155

• *Blockthermostat:*

BT 3 – Grant Instruments (Cambridge) Ltd, Cambridge, England

Serien-Nr. 729113008

• *Zentrifuge:*

Heraeus Multifuge 3 S-R – Kendro Laboratory Products, Osterode, Deutschland

Serien-Nr. 40121305

• *Probenschüttler:*

VF 2 – Janke & Kunkel GmbH & Co KG, Staufen, Deutschland

Serien-Nr. 751092

• *Destillierungsanlage (Aqua<sub>Bidest.</sub>):*

Milli - Q Water System – Millipore S.A., Molsheim, Frankreich

Serien-Nr. F5P25539Q

### Utensilien

• *Spritzen:*

Injekt 10 ml – B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

Injekt 20 ml – B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

• *Pipetten:*

Eppendorf Reference (Bereich: 0,5 µl - 10 µl; 10 µl - 100 µl; 100 µl -1000 µl)

Pipettenspitzen (Größen: 0,5 µl - 10 µl; 10 µl - 100 µl; 250 µl -1000 µl)

Eppendorf Multipette plus

Combitips (Größen: 0,5 ml; 1 ml; 10 ml)

– Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

• *Probenbehälter:*

FALCON Polypropylene Round Bottom Tubes (Größe: 5 ml)

– Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

Polypropylene Röhrrchen (Größe: 12 ml)

– Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

Eppendorfhütchen (Größen: 1,5 ml; 2 ml) in weiß und braun

– Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Messkuevette für Coulter Counter

– Coulter Electronics Ltd, Luton, England

### Gebrauchslösungen

• *Histopaque®-1077:*

– Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland

• *Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS):*

- Sigma Diagnostics, Inc., St. Louis, U.S.A.
- *Phosphate Buffered Saline (PBS):*  
Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
- *FACSFlow™:*  
– Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
- *ISOTON II:*  
– Beckman Coulter Euro Diagnostics GmbH, Krefeld, Deutschland
- *Heparin-Natrium Braun:*  
– B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
- *Dipyridamol-Stopplösung:*  
– Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Ingelheim, Deutschland
- *Perchlorsäure 70 % - 72 %:*  
– Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

### Reagenzien

- *Dihydrorhodamin 123 (DHR):*  
– MoBiTec, Göttingen, Deutschland
- *Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ):*  
– Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
- *n-Formyl-Methionyl-L-Leucyl-L-Phenylalanin (fMLP):*  
– Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
- *Propidiumjodid (PI):*  
– Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
- *Quinolinium, 6-(dimethylamino)-2-[4-[4-(dimethylamino)phenyl]-1,3-butadienyl]-1-ethyl, Perchlorate (LDS):*  
– MoBiTec, Göttingen, Deutschland

- *Adenosin*:
  - Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
- *8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (DPCPX)*:
  - Biotrend Chemikalien GmbH (Tocris), Köln, Deutschland
- *4-(2-[7-Amino-2-(2-furyl)[1,2,4]triazolo[2,3-a][1,3,5]triazin-5-ylamino]ethyl)phenol (ZM 241385)*:
  - Biotrend Chemikalien GmbH (Tocris), Köln, Deutschland
- *N-(2-Methoxyphenyl)-N'-[2-(3-pyrindinyl)-4-quinazoliny]-urea (VUF 5574)*:
  - Biotrend Chemikalien GmbH (Tocris), Köln, Deutschland
- *Zymosan A von Saccharomyces cerevisiae*:
  - Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
- *Fluoreszeinthiocyanat (FITC) markiertes Zymosan A von Saccharomyces cerevisiae*:
  - FITC Fluos – Roche Diagnostik GmbH, Mannheim, Deutschland
  - Zymosan A – Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
- *Salzsäure (HCl)*:
  - Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

## 7.2 Dipyridamol-Stopplösung

Dipyridamol hemmt die Aufnahme von Adenosin in Erythrozyten. Zur Herstellung der Lösung werden in 1 l NaCl 0,9 % 6,3 mg EHNA, 7,446 g Na<sub>2</sub>EDTA, 7,608 g EGTA, 6,482 g D,L- $\alpha$ -Glycerophosphat, 100  $\mu$ l 2-chloro-Adenosin-Stammlösung (c = 1 mM) und 10 Ampullen Dipyridamol (c = 200  $\mu$ M) gelöst und mit 1 M NaOH auf einen pH-Wert von 6 eingestellt. Die Lösung wird mit Vollblut im Verhältnis 1:1 gemischt.

### 7.3 Zymosanformel

Es wird die zwanzigfache Menge an Zymosanpartikel entsprechend der mit dem Coulter Counter gemessenen Leukozytenzahl dazugegeben. Die Zymosanprobe wies eine Konzentration von 152000 Partikel/ $\mu$ l, die FITC-markierte Zymosanprobe eine von 70000 Partikel/ $\mu$ l. Das dazuzugebende Volumen berechnet sich folgenderweise:

$$V = (\text{Leukozytenzahl}/\mu\text{l} \times 20) \div \text{Partikel}/\mu\text{l}$$

### 7.4 Geräteeinstellung des Durchflußzytometers

**Tabelle 12: FACS-Einstellung für den Farbstoff FITC**

	Datenmodus	Detektor	Verstärker	Schwellenwert	Kompensation
FSC	Linear	E00	1.00	156	FL1-FL2: 0.0%
SSC	Linear	323	1.62	0	FL2-FL1: 0.0%
FL1	LOG	299	LOG	0	FL2-FL3: 0.0%
FL2	LOG	459	LOG	0	FL3-FL2: 0.0%
FL3	LOG	404	LOG	0	

**Tabelle 13: FACS-Einstellung für den Farbstoff DHR**

	Datenmodus	Detektor	Verstärker	Schwellenwert	Kompensation
FSC	Linear	E00	1.07	164	FL1-FL2: 0.0%
SSC	Linear	323	1.00	0	FL2-FL1: 0.0%
FL1	LOG	506	LOG	0	FL2-FL3: 0.0%
FL2	LOG	459	LOG	0	FL3-FL2: 0.0%
FL3	LOG	333	LOG	92	

## 7.5 Charakterisation des Referenzmedikaments

Zusammensetzung der 2,5% Lipidemulsion pro 100 ml (% w/v):

Sojabohnenöl	2,50 g
Phospholipide	0,3 g
Ölsäure	0,02 g
Glyzerol	2,0 g
Wasser für Injektion	ad 100ml
pH Wert	8,0

Die Infusionsrate sollte individuell auf 0,2 g pro Kilogramm Körpergewicht über 4 Stunden basierend auf der 10 % Lipidemulsion Omegaven eingestellt werden.

## 8 Literaturverzeichnis

Arch, J. R. and E. A. Newsholme (1978). "The control of the metabolism and the hormonal role of adenosine." Essays Biochem 14: 82-123.

Armstrong, J. M., J. F. Chen, et al. (2001). "Gene dose effect reveals no Gs-coupled A2A adenosine receptor reserve in murine T-lymphocytes: studies of cells from A2A-receptor-gene-deficient mice." Biochem J 354(Pt 1): 123-30.

Astarié-Dequeker, C., E. N. N'Diaye, et al. (1999). "The mannose receptor mediates uptake of pathogenic and nonpathogenic mycobacteria and bypasses bactericidal responses in human macrophages." Infect Immun 67(2): 469-77.

Babior, B. M. (2000). "Phagocytes and oxidative stress." Am J Med 109(1): 33-44.

Bellavite, P., P. Dri, et al. (1983). "The measurement of superoxide anion production by granulocytes in whole blood. A clinical test for the evaluation of phagocyte function and serum opsonic capacity." Eur J Clin Invest 13(4): 363-8.

Berne, R. M. and R. Rubio (1974). "Adenine nucleotide metabolism in the heart." Circ Res 35 Suppl 3: 109-20.

Bjerknes, R. and C. F. Bassoe (1983). "Human leukocyte phagocytosis of zymosan particles measured by flow cytometry." Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [C] 91(5): 341-8.

Bokoch, G. M. (1995). "Chemoattractant signaling and leukocyte activation." Blood 86(5): 1649-60.

Bone, R. C., R. A. Balk, et al. (1992). "Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine." Chest 101(6): 1644-55.

Bouma, M. G., T. M. Jeunhomme, et al. (1997). "Adenosine inhibits neutrophil degranulation in activated human whole blood: involvement of adenosine A2 and A3 receptors." J Immunol 158(11): 5400-8.

Bourbon, A., M. Vionnet, et al. (2004). "The effect of methylprednisolone treatment on the cardiopulmonary bypass-induced systemic inflammatory response." Eur J Cardiothorac Surg 26(5): 932-8.

Bruns, R. F. (1991). "Role of adenosine in energy supply/demand balance." Nucleosides Nucleotides(10): 931–943.

Capecchi, P. L., A. Camurri, et al. (2005). "Upregulation of A2A adenosine receptor expression by TNF-alpha in PBMC of patients with CHF: a regulatory mechanism of inflammation." J Card Fail 11(1): 67-73.

Carrega, L., E. Fenouillet, et al. (2007). "Influence of haemodialysis and left ventricular failure on peripheral A(2A) adenosine receptor expression." Nephrol Dial Transplant 22(3): 851-6.

Chenoweth, D. E., S. W. Cooper, et al. (1981). "Complement activation during cardiopulmonary bypass: evidence for generation of C3a and C5a anaphylatoxins." N Engl J Med 304(9): 497-503.

Chern, Y., H. L. Lai, et al. (1993). "Multiple mechanisms for desensitization of A2a adenosine receptor-mediated cAMP elevation in rat pheochromocytoma PC12 cells." Mol Pharmacol 44(5): 950-8.

Christenson, J. T., J. M. Aeberhard, et al. (1996). "Adult respiratory distress syndrome after cardiac surgery." Cardiovasc Surg 4(1): 15-21.

Conlon, B. A., J. D. Ross, et al. (2005). "Advances in understanding adenosine as a plurisystem modulator in sepsis and the systemic inflammatory response syndrome (SIRS)." Front Biosci 10: 2548-65.

Cronstein, B. N. (1994). "Adenosine, an endogenous anti-inflammatory agent." J Appl Physiol 76(1): 5-13.

Cronstein, B. N., L. Daguma, et al. (1990). "The adenosine/neutrophil paradox resolved: human neutrophils possess both A1 and A2 receptors that promote chemotaxis and inhibit O<sub>2</sub> generation, respectively." J Clin Invest 85(4): 1150-7.

Cronstein, B. N., S. B. Kramer, et al. (1983). "Adenosine: a physiological modulator of superoxide anion generation by human neutrophils." J Exp Med 158(4): 1160-77.

Cronstein, B. N., R. I. Levin, et al. (1986). "Adenosine: an endogenous inhibitor of neutrophil-mediated injury to endothelial cells." J Clin Invest 78(3): 760-70.

Cronstein, B. N., R. I. Levin, et al. (1992). "Neutrophil adherence to endothelium is enhanced via adenosine A1 receptors and inhibited via adenosine A2 receptors." J Immunol 148(7): 2201-6.

Cronstein, B. N., E. D. Rosenstein, et al. (1985). "Adenosine; a physiologic modulator of superoxide anion generation by human neutrophils. Adenosine acts via an A2 receptor on human neutrophils." J Immunol 135(2): 1366-71.

Cywes, C., H. C. Hoppe, et al. (1997). "Nonopsonic binding of Mycobacterium tuberculosis to complement receptor type 3 is mediated by capsular polysaccharides and is strain dependent." Infect Immun 65(10): 4258-66.

Czop, J. K. and K. F. Austen (1985). "A beta-glucan inhibitable receptor on human monocytes: its identity with the phagocytic receptor for particulate activators of the alternative complement pathway." J Immunol 134(4): 2588-93.

Decking, U. K., G. Schlieper, et al. (1997). "Hypoxia-induced inhibition of adenosine kinase potentiates cardiac adenosine release." Circ Res 81(2): 154-64.

Demircioglu, F. F. (1989). "Leukocyte phagocytosis during cardiopulmonary bypass in adolescents." Turk J Pediatr 31(2): 127-35.

Di Carlo, F. J. and J. V. Fiore (1958). "On the composition of zymosan." Science 127(3301): 756-7.

Dianzani, C., S. Brunelleschi, et al. (1994). "Adenosine modulation of primed human neutrophils." Eur J Pharmacol 263(1-2): 223-6.

El-Benna, J., P. M. Dang, et al. (2005). "Phagocyte NADPH oxidase: a multicomponent enzyme essential for host defenses." Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 53(3): 199-206.

Eltzschig, H. K., L. F. Thompson, et al. (2004). "Endogenous adenosine produced during hypoxia attenuates neutrophil accumulation: coordination by extracellular nucleotide metabolism." Blood 104(13): 3986-92.

Engler, R. L., G. W. Schmid-Schonbein, et al. (1983). "Leukocyte capillary plugging in myocardial ischemia and reperfusion in the dog." Am J Pathol 111(1): 98-111.

Falleni, A., M. L. Trincavelli, et al. (1999). "A(1) adenosine receptors in human neutrophils: direct binding and electron microscope visualization." J Cell Biochem 75(2): 235-44.

Felsch, A., K. Stocker, et al. (1995). "Phorbol ester-stimulated adherence of neutrophils to endothelial cells is reduced by adenosine A2 receptor agonists." J Immunol 155(1): 333-8.

Fortin, A., D. Harbour, et al. (2006). "Differential expression of adenosine receptors in human neutrophils: up-regulation by specific Th1 cytokines and lipopolysaccharide." J Leukoc Biol 79(3): 574-85.

Fozard, J. R., H. J. Pfannkuche, et al. (1996). "Mast cell degranulation following adenosine A3 receptor activation in rats." Eur J Pharmacol 298(3): 293-7.

Fredholm, B. B., I. J. AP, et al. (2001). "International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors." Pharmacol Rev 53(4): 527-52.

Fredholm, B. B., Y. Zhang, et al. (1996). "Adenosine A2A receptors mediate the inhibitory effect of adenosine on formyl-Met-Leu-Phe-stimulated respiratory burst in neutrophil leucocytes." Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol 354(3): 262-7.

Gantner, B. N., R. M. Simmons, et al. (2003). "Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2." J Exp Med 197(9): 1107-17.

Gessi, S., K. Varani, et al. (2002). "A(3) adenosine receptors in human neutrophils and promyelocytic HL60 cells: a pharmacological and biochemical study." Mol Pharmacol 61(2): 415-24.

Gessler, P., J. Pfenninger, et al. (2002). "Inflammatory response of neutrophil granulocytes and monocytes after cardiopulmonary bypass in pediatric cardiac surgery." Intensive Care Med 28(12): 1786-91.

Go, L. O., C. E. Murry, et al. (1988). "Myocardial neutrophil accumulation during reperfusion after reversible or irreversible ischemic injury." Am J Physiol 255(5 Pt 2): H1188-98.

Grisham, M. B., L. A. Hernandez, et al. (1989). "Adenosine inhibits ischemia-reperfusion-induced leukocyte adherence and extravasation." Am J Physiol 257(5 Pt 2): H1334-9.

Griswold, J. and R. V. Maier (1988). "Neutrophil phagocytosis during endotoxin-induced lung injury." J Surg Res 44(4): 417-24.

Grover, F. L. (1999). "The Society of Thoracic Surgeons National Database: current status and future directions." Ann Thorac Surg 68(2): 367-73; discussion 374-6.

Gu, Y. J., M. A. Mariani, et al. (1998). "Reduction of the inflammatory response in patients undergoing minimally invasive coronary artery bypass grafting." Ann Thorac Surg 65(2): 420-4.

Hagemeier, E., K. Kemper, et al. (1983). "On-line high-performance liquid affinity chromatography-high-performance liquid chromatography analysis of monomeric ribonucleoside compounds in biological fluids." J Chromatogr 282: 663-9.

Hamano, K., H. Ito, et al. (1996). "Granulocyte phagocytic function is impaired during cardiopulmonary bypass." Ann Thorac Surg 62(6): 1820-4.

Hammerschmidt, D. E., D. F. Stroncek, et al. (1981). "Complement activation and neutropenia occurring during cardiopulmonary bypass." J Thorac Cardiovasc Surg 81(3): 370-7.

Hannon, J. P., H. J. Pfannkuche, et al. (1995). "A role for mast cells in adenosine A3 receptor-mediated hypotension in the rat." Br J Pharmacol 115(6): 945-52.

Hed, J. and O. Stendahl (1982). "Differences in the ingestion mechanisms of IgG and C3b particles in phagocytosis by neutrophils." Immunology 45(4): 727-36.

Heine, J., M. Leuwer, et al. (1996). "Flow cytometry evaluation of the in vitro influence of four i.v. anaesthetics on respiratory burst of neutrophils." Br J Anaesth 77(3): 387-92.

Herre, J., S. Gordon, et al. (2004). "Dectin-1 and its role in the recognition of beta-glucans by macrophages." Mol Immunol 40(12): 869-76.

Hetland, G. and H. G. Wiker (1994). "Antigen 85C on Mycobacterium bovis, BCG and M. tuberculosis promotes monocyte-CR3-mediated uptake of microbeads coated with mycobacterial products." Immunology 82(3): 445-9.

Hiramoto, R., J. Bernecky, et al. (1964). "The Effect Of Hydrogen Ion Concentration On Fluorescent Labelled Antibodies." J Histochem Cytochem 12: 271-4.

Ito, B. R., D. M. Roth, et al. (1990). "Thromboxane A2 and peptidoleukotrienes contribute to the myocardial ischemia and contractile dysfunction in response to intracoronary infusion of complement C5a in pigs." Circ Res 66(3): 596-607.

Jay, S. J. (1983). "Nosocomial infections." Med Clin North Am 67(6): 1251-77.

Journois, D., P. Pouard, et al. (1994). "Hemofiltration during cardiopulmonary bypass in pediatric cardiac surgery. Effects on hemostasis, cytokines, and complement components." Anesthesiology 81(5): 1181-9; discussion 26A-27A.

Kääb, S., G. Pilz, E. Kreuzer, and K. Werdan (1991). "Apache II score in the early diagnosis of septic complications after cardiac surgery." Circ. Shock(34): 44.

Kadish, J. L., C. C. Choi, et al. (1986). "Phagocytosis of unopsonized zymosan particles by trypsin-sensitive and beta-glucan-inhibitable receptors on bone marrow-derived murine macrophages." Immunol Res 5(2): 129-38.

Kaufmann, I., A. Hoelzl, et al. (2007). "Effects of adenosine on functions of polymorphonuclear leukocytes from patients with septic shock." Shock 27(1): 25-31.

Kaufmann, I., A. Hoelzl, et al. (2006). "Polymorphonuclear leukocyte dysfunction syndrome in patients with increasing sepsis severity." Shock 26(3): 254-61.

Kawahito, K., E. Kobayashi, et al. (2000). "Enhanced responsiveness of circulatory neutrophils after cardiopulmonary bypass: increased aggregability and superoxide producing capacity." Artif Organs 24(1): 37-42.

Keller, H. U., M. W. Hess, et al. (1982). "Leucocyte activation and the assessment of leucocyte locomotion." Adv Exp Med Biol 141: 9-17.

Kerbaul, F., F. Collart, et al. (2006). "Role of endogenous adenosine as a predictive marker of vasoplegia during cardiopulmonary bypass and postoperative severe systemic inflammatory response." Crit Care Med 34(3): 640-5.

Khoa, N. D., M. C. Montesinos, et al. (2001). "Inflammatory cytokines regulate function and expression of adenosine A(2A) receptors in human monocytic THP-1 cells." J Immunol 167(7): 4026-32.

Kinsey, B. M., A. I. Kassis, et al. (1987). "Synthesis and biological studies of iodinated (127/125I) derivatives of rhodamine 123." J Med Chem 30(10): 1757-61.

Klebanoff, S. J. (1999). "Myeloperoxidase." Proc Assoc Am Physicians 111(5): 383-9.

Kleihues, P., K. Kobayashi, et al. (1974). "Purine nucleotide metabolism in the cat brain after one hour of complete ischemia." J Neurochem 23(2): 417-25.

Kolachala, V., V. Asamoah, et al. (2005). "TNF-alpha upregulates adenosine 2b (A2b) receptor expression and signaling in intestinal epithelial cells: a basis for A2bR overexpression in colitis." Cell Mol Life Sci 62(22): 2647-57.

Kollef, M. H., T. Wragge, et al. (1995). "Determinants of mortality and multiorgan dysfunction in cardiac surgery patients requiring prolonged mechanical ventilation." Chest 107(5): 1395-401.

Laffey, J. G., J. F. Boylan, et al. (2002). "The systemic inflammatory response to cardiac surgery: implications for the anesthesiologist." Anesthesiology 97(1): 215-52.

Le Cabec, V., S. Carreno, et al. (2002). "Complement receptor 3 (CD11b/CD18) mediates type I and type II phagocytosis during nonopsonic and opsonic phagocytosis, respectively." J Immunol 169(4): 2003-9.

Le Cabec, V., C. Cols, et al. (2000). "Nonopsonic phagocytosis of zymosan and Mycobacterium kansasii by CR3 (CD11b/CD18) involves distinct molecular determinants and is or is not coupled with NADPH oxidase activation." Infect Immun 68(8): 4736-45.

Lehmann, A. K., S. Sornes, et al. (2000). "Phagocytosis: measurement by flow cytometry." J Immunol Methods 243(1-2): 229-42.

Lesch, M. E., M. A. Ferin, et al. (1991). "The effects of (R)-N-(1-methyl-2-phenylethyl) adenosine (L-PIA), a standard A1-selective adenosine agonist on rat acute models of inflammation and neutrophil function." Agents Actions 34(1-2): 25-7.

Lowry, S. F. (1993). "Cytokine mediators of immunity and inflammation." Arch Surg 128(11): 1235-41.

Mangano, C. M., L. S. Diamondstone, et al. (1998). "Renal dysfunction after myocardial revascularization: risk factors, adverse outcomes, and hospital resource utilization. The Multicenter Study of Perioperative Ischemia Research Group." Ann Intern Med 128(3): 194-203.

Mangano, D. T. (1997). "Effects of adenosine on myocardial infarction, stroke, and death following surgery. A meta-analysis of the 5 international randomized trials. The Multicenter Study of Perioperative Ischemia (McSPI) Research Group." Jama 277(4): 325-32.

Marquardt, D. L., L. L. Walker, et al. (1994). "Cloning of two adenosine receptor subtypes from mouse bone marrow-derived mast cells." J Immunol 152(9): 4508-15.

Martin, C., M. Leone, et al. (2000). "High adenosine plasma concentration as a prognostic index for outcome in patients with septic shock." Crit Care Med 28(9): 3198-202.

Martinez-Pellus, A. E., P. Merino, et al. (1997). "Endogenous endotoxemia of intestinal origin during cardiopulmonary bypass. Role of type of flow and protective effect of selective digestive decontamination." Intensive Care Med 23(12): 1251-7.

Martini, C., L. Trincavelli, et al. (1998). "A1 adenosine receptors in human neutrophils. Electron microscope localization." Adv Exp Med Biol 431: 107-11.

Meldrum, D. R. and K. K. Donnahoo (1999). "Role of TNF in mediating renal insufficiency following cardiac surgery: evidence of a postbypass cardiorenal syndrome." J Surg Res 85(2): 185-99.

Melley, D. D., T. W. Evans, et al. (2005). "Redox regulation of neutrophil apoptosis and the systemic inflammatory response syndrome." Clin Sci (Lond) 108(5): 413-24.

Menasche, P., S. Haydar, et al. (1994). "A potential mechanism of vasodilation after warm heart surgery. The temperature-dependent release of cytokines." J Thorac Cardiovasc Surg 107(1): 293-9.

Menasche, P., C. Pasquier, et al. (1988). "Deferoxamine reduces neutrophil-mediated free radical production during cardiopulmonary bypass in man." J Thorac Cardiovasc Surg 96(4): 582-9.

Miholic, J., M. Hudec, et al. (1985). "Risk factors for severe bacterial infections after valve replacement and aortocoronary bypass operations: analysis of 246 cases by logistic regression." Ann Thorac Surg 40(3): 224-8.

Miller, B. J., J. H. Gibbon, Jr., et al. (1953). "The production and repair of interatrial septal defects under direct vision with the assistance of an extracorporeal pump-oxygenator circuit." J Thorac Surg 26(6): 598-616; discussion 631-2.

Minamino, T., M. Kitakaze, et al. (1996). "Adenosine inhibits leukocyte-induced vasoconstriction." Am J Physiol 271(6 Pt 2): H2622-8.

Mitsuhata, H., R. Shimizu, et al. (1995). "Suppressive effects of volatile anesthetics on cytokine release in human peripheral blood mononuclear cells." Int J Immunopharmacol 17(6): 529-34.

Mollhoff, T., H. M. Loick, et al. (1999). "Milrinone modulates endotoxemia, systemic inflammation, and subsequent acute phase response after cardiopulmonary bypass (CPB)." Anesthesiology 90(1): 72-80.

Morello, S., K. Ito, et al. (2006). "IL-1 beta and TNF-alpha regulation of the adenosine receptor (A2A) expression: differential requirement for NF-kappa B binding to the proximal promoter." J Immunol 177(10): 7173-83.

Nakamura, T., S. Kashimoto, et al. (1999). "Hydroxyl radical formation during inhalation anesthesia in the reperfused working rat heart." Can J Anaesth 46(5 Pt 1): 470-5.

Nathan, C., S. Srimal, et al. (1989). "Cytokine-induced respiratory burst of human neutrophils: dependence on extracellular matrix proteins and CD11/CD18 integrins." J Cell Biol 109(3): 1341-9.

Newby, A. C. (1991). "Adenosine: origin and clinical roles." Adv Exp Med Biol 309A: 265-70.

Newby, A. C. and C. A. Holmquist (1981). "Adenosine production inside rat polymorphonuclear leucocytes." Biochem J 200(2): 399-403.

Nguyen, D. K., M. C. Montesinos, et al. (2003). "Th1 cytokines regulate adenosine receptors and their downstream signaling elements in human microvascular endothelial cells." J Immunol 171(8): 3991-8.

O'Donnell, N. G., C. P. McSharry, et al. (1992). "Comparison of the inhibitory effect of propofol, thiopentone and midazolam on neutrophil polarization in vitro in the presence or absence of human serum albumin." Br J Anaesth 69(1): 70-4.

Ontyd, J. and J. Schrader (1984). "Measurement of adenosine, inosine, and hypoxanthine in human plasma." J Chromatogr 307(2): 404-9.

Palmer, T. M., T. W. Gettys, et al. (1994). "Desensitization of the canine A2a adenosine receptor: delineation of multiple processes." Mol Pharmacol 45(6): 1082-94.

Palmer, T. M. and G. L. Stiles (1995). "Adenosine receptors." Neuropharmacology 34(7): 683-94.

Palmer, T. M. and G. L. Stiles (1997). "Identification of an A2a adenosine receptor domain specifically responsible for mediating short-term desensitization." Biochemistry 36(4): 832-8.

Partrick, D. A., E. E. Moore, et al. (1999). "Cardiopulmonary bypass renders patients at risk for multiple organ failure via early neutrophil priming and late neutrophil disability." J Surg Res 86(1): 42-9.

Pasnik, J., K. Siniewicz, et al. (2005). "Effect of cardiopulmonary bypass on neutrophil activity in pediatric open-heart surgery." Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 53(3): 272-7.

Pavelkova, M., L. Kubala, et al. (2006). "Blood phagocyte activation during open heart surgery with cardiopulmonary bypass." Physiol Res 55(2): 165-73.

Pearson, J. D. and J. L. Gordon (1985). "Nucleotide metabolism by endothelium." Annu Rev Physiol 47: 617-27.

Pillemer, L., L. Blum, et al. (1956). "The properdin system and immunity. III. The zymosan assay of properdin." J Exp Med 103(1): 1-13.

Plagemann, P. G., R. M. Wohlhueter, et al. (1985). "Adenosine uptake, transport, and metabolism in human erythrocytes." J Cell Physiol 125(2): 330-6.

Poulsen, S. A. and R. J. Quinn (1998). "Adenosine receptors: new opportunities for future drugs." Bioorg Med Chem 6(6): 619-41.

Prasad, K., J. Kalra, et al. (1992). "Increased oxygen free radical activity in patients on cardiopulmonary bypass undergoing aortocoronary bypass surgery." Am Heart J 123(1): 37-45.

Rassias, A. J., A. L. Givan, et al. (2002). "Insulin increases neutrophil count and phagocytic capacity after cardiac surgery." Anesth Analg 94(5): 1113-9, table of contents.

Relman, D., E. Tuomanen, et al. (1990). "Recognition of a bacterial adhesion by an integrin: macrophage CR3 (alpha M beta 2, CD11b/CD18) binds filamentous hemagglutinin of Bordetella pertussis." Cell 61(7): 1375-82.

Richter, J. (1992). "Effect of adenosine analogues and cAMP-raising agents on TNF-, GM-CSF-, and chemotactic peptide-induced degranulation in single adherent neutrophils." J Leukoc Biol 51(3): 270-5.

Roach, G. W., M. Kanchuger, et al. (1996). "Adverse cerebral outcomes after coronary bypass surgery. Multicenter Study of Perioperative Ischemia Research Group and the Ischemia Research and Education Foundation Investigators." N Engl J Med 335(25): 1857-63.

Roberts, P. A., A. C. Newby, et al. (1985). "Inhibition by adenosine of reactive oxygen metabolite production by human polymorphonuclear leucocytes." Biochem J 227(2): 669-74.

Rogachev, B., N. Y. Ziv, et al. (2006). "Adenosine is upregulated during peritonitis and is involved in downregulation of inflammation." Kidney Int 70(4): 675-81.

Root, R. K. and M. S. Cohen (1981). "The microbicidal mechanisms of human neutrophils and eosinophils." Rev Infect Dis 3(3): 565-98.

Rose, F. R., R. Hirschhorn, et al. (1988). "Adenosine promotes neutrophil chemotaxis." J Exp Med 167(3): 1186-94.

Ross, G. D. and V. Vetvicka (1993). "CR3 (CD11b, CD18): a phagocyte and NK cell membrane receptor with multiple ligand specificities and functions." Clin Exp Immunol 92(2): 181-4.

Rothe, G., A. Oser, et al. (1988). "Dihydrorhodamine 123: a new flow cytometric indicator for respiratory burst activity in neutrophil granulocytes." Naturwissenschaften 75(7): 354-5.

Rothe, G. and G. Valet (1994). "Flow cytometric assays of oxidative burst activity in phagocytes." Methods Enzymol 233: 539-48.

Royston, D. (1997). "The inflammatory response and extracorporeal circulation." J Cardiothorac Vasc Anesth 11(3): 341-54.

Russell, D. G. and S. D. Wright (1988). "Complement receptor type 3 (CR3) binds to an Arg-Gly-Asp-containing region of the major surface glycoprotein, gp63, of *Leishmania promastigotes*." J Exp Med 168(1): 279-92.

Salmon, J. E., J. C. Edberg, et al. (1990). "Fc gamma receptor III on human neutrophils. Allelic variants have functionally distinct capacities." J Clin Invest 85(4): 1287-95.

Sander, M., C. von Heymann, et al. (2006). "Increased interleukin-6 after cardiac surgery predicts infection." Anesth Analg 102(6): 1623-9.

Schubert, P., W. Komp, et al. (1979). "Correlation of 5'-nucleotidase activity and selective transneuronal transfer of adenosine in the hippocampus." Brain Res 168(2): 419-24.

Schwartz, J. D., P. Shamamian, et al. (1998). "Cardiopulmonary bypass primes polymorphonuclear leukocytes." J Surg Res 75(2): 177-82.

Sengelov, H. (1995). "Complement receptors in neutrophils." Crit Rev Immunol 15(2): 107-31.

Simms, H. H. and R. D'Amico (1994). "Polymorphonuclear leukocyte dysregulation during the systemic inflammatory response syndrome." Blood 83(5): 1398-407.

Sollevi, A. (1986). "Cardiovascular effects of adenosine in man; possible clinical implications." Prog Neurobiol 27(4): 319-49.

Stahl, R. F., C. A. Fisher, et al. (1991). "Effects of simulated extracorporeal circulation on human leukocyte elastase release, superoxide generation, and procoagulant activity." J Thorac Cardiovasc Surg 101(2): 230-9.

Stevens P, H. D. (1984). "The role of myeloperoxidase and superoxide anion in the luminol and lucigenin-dependent chemiluminescence of human neutrophils." Microchem J(30): 135-146.

Struber, M., J. T. Cremer, et al. (1999). "Human cytokine responses to coronary artery bypass grafting with and without cardiopulmonary bypass." Ann Thorac Surg 68(4): 1330-5.

Sullivan, G. W., H. T. Carper, et al. (1995). "The specific type IV phosphodiesterase inhibitor rolipram combined with adenosine reduces tumor necrosis factor-alpha-primed neutrophil oxidative activity." Int J Immunopharmacol 17(10): 793-803.

Takahashi, T., F. Kunimoto, et al. (1996). "Gastric intramucosal pH and hepatic venous oximetry after cardiopulmonary bypass in valve replacement patients." Cardiovasc Surg 4(3): 308-10.

Teoh, K. H., C. A. Bradley, et al. (1995). "Steroid inhibition of cytokine-mediated vasodilation after warm heart surgery." Circulation 92(9 Suppl): II347-53.

Terstappen, L. W., V. O. Shah, et al. (1988). "Discriminating between damaged and intact cells in fixed flow cytometric samples." Cytometry 9(5): 477-84.

Thiel, M. and H. Bardenheuer (1992). "Regulation of oxygen radical production of human polymorphonuclear leukocytes by adenosine: the role of calcium." Pflugers Arch 420(5-6): 522-8.

Thiel, M., J. D. Chambers, et al. (1996). "Effect of adenosine on the expression of beta(2) integrins and L-selectin of human polymorphonuclear leukocytes in vitro." J Leukoc Biol 59(5): 671-82.

Thiel, M. and A. Chouker (1995). "Acting via A2 receptors, adenosine inhibits the production of tumor necrosis factor-alpha of endotoxin-stimulated human polymorphonuclear leukocytes." J Lab Clin Med 126(3): 275-82.

Thiel, M., A. Chouker, et al. (2005). "Oxygenation inhibits the physiological tissue-protecting mechanism and thereby exacerbates acute inflammatory lung injury." PLoS Biol 3(6): e174.

Thiel, M., K. Holzer, et al. (1997). "Effects of adenosine on the functions of circulating polymorphonuclear leukocytes during hyperdynamic endotoxemia." Infect Immun 65(6): 2136-44.

Tonz, M., T. Mihaljevic, et al. (1995). "Acute lung injury during cardiopulmonary bypass. Are the neutrophils responsible?" Chest 108(6): 1551-6.

Trincavelli, M. L., B. Costa, et al. (2002). "Up-regulation of A(2A) adenosine receptors by proinflammatory cytokines in rat PC12 cells." Biochem Pharmacol 64(4): 625-31.

Ueland, P. M., S. Helland, et al. (1984). "Homocysteine in tissues of the mouse and rat." J Biol Chem 259(4): 2360-4.

Van Belle, H., F. Goossens, et al. (1987). "Formation and release of purine catabolites during hypoperfusion, anoxia, and ischemia." Am J Physiol 252(5 Pt 2): H886-93.

van Pelt, L. J., R. van Zwieten, et al. (1996). "Limitations on the use of dihydrorhodamine 123 for flow cytometric analysis of the neutrophil respiratory burst." J Immunol Methods 191(2): 187-96.

Van Strijp, J. A., D. G. Russell, et al. (1993). "Ligand specificity of purified complement receptor type three (CD11b/CD18, alpha m beta 2, Mac-1). Indirect effects of an Arg-Gly-Asp (RGD) sequence." J Immunol 151(6): 3324-36.

von Andrian, U. H., J. D. Chambers, et al. (1991). "Two-step model of leukocyte-endothelial cell interaction in inflammation: distinct roles for LECAM-1 and the leukocyte beta 2 integrins in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A 88(17): 7538-42.

Walker, B. A. and P. A. Ward (1992). "Priming and signal transduction in neutrophils." Biol Signals 1(5): 237-49.

Walrand, S., S. Valeix, et al. (2003). "Flow cytometry study of polymorphonuclear neutrophil oxidative burst: a comparison of three fluorescent probes." Clin Chim Acta 331(1-2): 103-10.

Weigand, M. A., A. Michel, et al. (1999). "Adenosine: a sensitive indicator of cerebral ischemia during carotid endarterectomy." Anesthesiology 91(2): 414-21.

Wenisch, C., A. Bartunek, et al. (1997). "Prospective randomized comparison of cefodizime versus cefuroxime for perioperative prophylaxis in patients undergoing coronary artery bypass grafting." Antimicrob Agents Chemother 41(7): 1584-8.

Wenisch, C., B. Parschalk, et al. (1995). "Effect of cefodizime and ceftriaxone on phagocytic function in patients with severe infections." Antimicrob Agents Chemother 39(3): 672-6.

Westhuyzen, J., A. D. Cochrane, et al. (1997). "Effect of preoperative supplementation with alpha-tocopherol and ascorbic acid on myocardial injury in patients undergoing cardiac operations." J Thorac Cardiovasc Surg 113(5): 942-8.

Williams, M. (1989). "Adenosine: the prototypic neuromodulator." Neurochem. Inter.(14): 249-64.

Winn, H. R., T. S. Park, et al. (1980). "Incorporation of adenosine and its metabolites into brain nucleotides." Am J Physiol 239(2): H212-9.

Winn, H. R., R. Rubio, et al. (1981). "Brain adenosine concentration during hypoxia in rats." Am J Physiol 241(2): H235-42.

Winn, H. R., J. E. Welsh, et al. (1980). "Brain adenosine production in rat during sustained alteration in systemic blood pressure." Am J Physiol 239(5): H636-41.

Witko-Sarsat, V., P. Rieu, et al. (2000). "Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects." Lab Invest 80(5): 617-53.

Wright, S. D. and M. T. Jong (1986). "Adhesion-promoting receptors on human macrophages recognize Escherichia coli by binding to lipopolysaccharide." J Exp Med 164(6): 1876-88.

Yamashita, C., H. Wakiyama, et al. (1998). "Hepatic microcirculation during transient hepatic venous occlusion--intravital microscopic observation using hepatic vein clamp model in the mouse." Kobe J Med Sci 44(5-6): 199-203.

Young, L. S. (1981). "Nosocomial infections in the immunocompromised adult." Am J Med 70(2): 398-404.

Zahler, S., B. F. Becker, et al. (1994). "Stimulation of endothelial adenosine A1 receptors enhances adhesion of neutrophils in the intact guinea pig coronary system." Cardiovasc Res 28(9): 1366-72.

Zahler, S., Becker, B.F. (1998). "Adhesion of neutrophils to cultured human endothelial cells is enhanced by stimulation of adenosine A1-receptors." Drug Dev Res(45): 350-355.

Zalavary, S. and T. Bengtsson (1998). "Adenosine inhibits actin dynamics in human neutrophils: evidence for the involvement of cAMP." Eur J Cell Biol 75(2): 128-39.

Zalavary, S., O. Stendahl, et al. (1994). "The role of cyclic AMP, calcium and filamentous actin in adenosine modulation of Fc receptor-mediated phagocytosis in human neutrophils." Biochim Biophys Acta 1222(2): 249-56.

Zilberstein, G., R. Levy, et al. (2002). "Ketamine attenuates neutrophil activation after cardiopulmonary bypass." Anesth Analg 95(3): 531-6, table of contents.

Zimmerman, J. J., J. R. Millard, et al. (1989). "Septic plasma suppresses superoxide anion synthesis by normal homologous polymorphonuclear leukocytes." Crit Care Med 17(12): 1241-6.

Zimmermann, H. (1992). "5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects."  
Biochem J 285 (Pt 2): 345-65.

## Abkürzungen

ALAT	Alanin-Amino-Transferase
AMP	Adenosin-Mono-Phosphat
ASAT	Aspartat-Amino-Transferase
ATP	Adenosin-Tri-Phosphat
BMI	Body Mass Index
cAMP	Zyklisches Adenosin-Mono-Phosphat
C5a	Komplementfaktor 5 a
Ca	Kalzium
CABG-OP	Coronary Artery Bypass Grafting - Operation
$C_{END}$	Endkonzentration
CPB	Cardio Pulmonary Bypass
CR3	Komplement Rezeptor Typ 3
CRP	C-reaktives Protein
DHR	Dihydrorhodamin
DPCPX	8-Cyclopentyl-1, 3-Dipropylxanthin
FACScan	Fluorescence Activated Cell Sorter
FITC	Fluorescein-Iso-Thio-Zyanat
fMLP	n-Formyl-Methionyl-L-Leucyl-L-Phenylalanin
FSC	Vorwärts-Streuung
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HCl	Salzsäure
HLM	Herz-Lungen-Maschine
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
IC <sub>50</sub>	Halbmaximale Hemmkonzentration
IL-1	Interleukin-1
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
IP <sub>3</sub>	Inositol 1,4,5-trisphosphat
K	Kalium
K <sub>i</sub>	thermodynamische Gleichgewichtskonstante
KOH	Kaliumlauge
KG	Körpergewicht

LDH	Lactatdehydrogenase
LDS	Quinolinium, 6-(dimethylamino)-2-[4-[4-(dimethylamino)phenyl]-1,3-butadienyl]-1-ethyl- perchlorat
LPS	Lipopolysaccharid
MAC	Minimale Alveoläre Konzentration
MFU	mittlere Fluoreszenz Einheit
MODS	Multiorgan-dysfunktions-Syndrom
MOV	Multiorganversagen
MPO	Myeloperoxidase
MZP	Messzeitpunkt
Na	Natrium
NADPH/ NAD(P)H	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid(-Phosphat)
NECA	5' N-Ethylcarboxamidoadenosin
NO	Stickoxid
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superoxidanion
OP	Operation
PI	Propidiumjodid
PMNL	polymorphkernige Leukozyten
ROS	reaktive Sauerstoffradikalspezies
SE	Standardfehler
SIRS	systemisches Inflammations-Syndrom
SSC	Seitwärts-Streuung
TG	Triglyzeride
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
VUF 5574	N-(2-Methoxyphenyl)-N'-[2-(3-pyrindinyl)-4-quinazolinyl]-urea
ZM241385	4-(2-[7-Amino-2-(2-furyl)[1,2,4]triazolo[2,3-a][1,3,5]triazin-5-ylamino]ethyl)phenol

## **Danksagung**

Ich möchte mich hiermit bei allen bedanken, die das Zustandekommen dieser Arbeit ermöglicht haben.

Besonderen Dank schulde ich Prof. Dr. med. Manfred Thiel, der mir jederzeit mit seiner Weitsicht, fachlichen Exzellenz und intensiver Unterstützung zur Seite stand, und Dr. med. Ines Kaufmann, die mich von den ersten Schritten bis zu der Fertigstellung dieser Arbeit mit viel Elan und Geduld betreute. Bei PD Dr. med. Alex Chouker für den Optimismus, um auch in schwierigen Phasen die Hoffnung und Zuversicht nicht zu verlieren.

Den Labormitarbeitern Marion Höhrl, Gabi Gröger, Ursula Göttler, Stefan Meindl und Hans Wageneder gilt mein Dank für die Einarbeitung, die Hilfsbereitschaft und freundliche Atmosphäre im Labor.

Ich bedanke mich auch bei meinem Kollegen Peter Richter, bei Prof. Dr. med. Alwin Götz und Dr. med. Matthias Göpfert, bei allen Mitarbeitern der Anaesthesie und Herzchirurgie der Stiftsklinik am Augustinum für die reibungslose und erfolgreiche Durchführung der Studie.

Mein grösster Dank gilt meiner Familie, meinen Eltern Dorothee und Anton Eisner, so wie meinen beiden Geschwistern Sophie und Severin, und nicht zuletzt meiner Prinzessin Marta, die mir jeden Tag soviel Kraft gibt und mich bei allem unheimlich unterstützt.

## Lebenslauf

**Name:** Eisner, Christoph Benedikt  
**Anschrift:** Wachterweg 2  
82061 Neuried  
**Geburtsdatum/-ort:** 2. März 1979 in München  
**Familienstand:** verheiratet mit Marta Eisner, geb. Despot

### Schulbildung

09/1985 – 07/1989 Volksschule Neuried  
09/1989 – 07/1995 Feodor-Lynen-Gymnasium Planegg, Mathem.-naturwiss. Zweig  
08/1995 – 05/1996 McGill-Toolen High School in Mobile, Alabama (USA)  
09/1996 – 06/1998 Nymphenburger Gymnasium München, Mathem.-naturwiss.  
Zweig  
06/1998 Allgemeine Hochschulreife

### Wehrdienst

07/1998 – 09/1998 Grundausbildung beim II. Luftausbildungsregiment 3 Bayreuth  
09/1998 – 04/1999 Wehrdienst 3./Flugabwehrraketengruppe 33 Lenggries

### Studium

05/1999 – 05/2005 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-  
Universität München  
03/2001 Ärztliche Vorprüfung  
03/2002 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
03/2004 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
04/2004 – 08/2004 1. PJ-Tertial Chirurgie in Houston, Texas (USA)  
Texas Heart Institute, Texas Medical Center Houston

08/2004 – 11/2004	2. PJ-Tertial Innere Medizin in München Städtisches Krankenhaus München-Harlaching
11/2004 – 03/2005	3. PJ-Tertial Wahlfach Anaesthesie in München Klinikum der Universität München Großhadern
05/2005	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
05/2005	Approbation als Arzt

### **Fachweiterbildung**

07/2005 – 03/2006	Assistenzarzt an der Klinik für Anaesthesiologie, Klinikum Innenstadt der Universität München
Seit 04/2006	Visiting Research Fellow am National Institutes of Health, NIDDK in Bethesda, Maryland (USA)