

**Aus der Universitätsklinik für
Anaesthesiologie und Intensivmedizin**

**Protektive Effekte von Pentoxifyllin
bei LPS-induzierter pulmonaler Inflammation
in Abhängigkeit des Adenosin-Rezeptor-Subtyps A_{2a}**

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

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

vorgelegt von

Neudeck, Gianna Katharina

2018

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth
1. Berichterstatter: Professor Dr. J. Reutershan
2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. V. Steger

Tag der Disputation: 24.09.2018

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis	
1	Einleitung 7
1.1	Acute respiratory distress syndrome ARDS 7
	Definition 7
	Epidemiologie 8
	Klinik..... 8
	Therapie..... 9
1.2	Pathophysiologie des ARDS..... 9
	Neutrophile Granulozyten (PMN)..... 11
	Inflammation 12
	Zytokine 12
	Chemokine 12
	PMN-Migration..... 13
1.3	Adenosin 15
1.4	Adenosinrezeptoren 16
	Der A ₁ -Rezeptor 18
	Der A _{2b} -Rezeptor..... 18
	Der A ₃ -Rezeptor 18
1.5	Der A _{2a} -Rezeptor 18
	Überblick..... 18
	Wirkmechanismus..... 19
	A _{2a} ^{-/-} -Tiere 21
1.6	Pentoxifyllin PTX 21
	Überblick..... 21
	PTX als Medikament..... 22
	Anwendung von PTX in der Forschung..... 24
1.7	Fragestellungen dieser Dissertation 24
2	Material und Methoden 26
2.1	Material 26

Tierlinien	26
Geräte	26
Verbrauchsmaterialien	27
Chemikalien	29
Medien.....	29
Medikamente.....	30
Enzyme.....	30
Antikörper	30
2.2 Lösungen und Medikamente.....	31
Anästhetikum	31
PTX	32
Applikation von Placebo und PTX.....	32
Inhalation.....	32
2.3 Analyse der PMN-Migration in die Lungenkompartimente mittels Transmigrationsassay in vivo und Durchflusszytometrie FACS.....	33
Vorbehandlung	33
Applikation von Antagonist und Agonist des A _{2a} -Rezeptors	34
Zeit-abhängige Gabe von PTX.....	34
Organentnahme	35
Weiterverarbeitung bronchoalveoläre Lavage (BAL).....	36
Weiterverarbeitung Lunge.....	36
Zellverarbeitung und -analyse	37
Prinzip der Durchflusszytometrie.....	38
2.4 Quantifizierung der mikrovaskulären Leckage mittels Evans blue- Extravasation	40
Vorbehandlung	40
Versuchsdurchführung	41
Analyse.....	42
2.5 Darstellung der PMN und Lungenstruktur mittels Immunhistochemie.....	42
Vorbehandlung und Probengewinnung.....	42

Anfertigung von histologischen Schnitten	43
Immunhistologische Färbung	43
2.6 Quantifizierung der Zytokine in der BAL mittels enzyme-linked immunosorbent assay ELISA	45
Prinzip	45
Probengewinnung.....	45
Versuchsdurchführung	46
2.7 Erstellung von Blutbildern.....	47
2.8 Statistische Analyse	47
3 Ergebnisse	48
3.1 Quantifizierung der PMN-Migration in die Lungenkompartimente mittels Transmigrationsassay in vivo und Durchflusszytometrie FACS.....	48
3.2 Quantifizierung der mikrovaskulären Leckage mittels Evans blue-Extravasation	55
Lungenpräparate von Wildtyp-Tieren im Rahmen des Evans blue-Versuchs	56
3.3 Immunhistochemische Darstellung der PMN und der Lungenstruktur	57
3.4 Quantifizierung der Zytokine in der BAL mittels ELISA	59
3.5 Blutbilder	61
4 Diskussion	62
5 Zusammenfassung.....	72
6 Abkürzungsverzeichnis	74
7 Tabellenverzeichnis.....	76
8 Abbildungsverzeichnis	77
9 Literaturverzeichnis.....	79
10 Erklärung zum Eigenanteil	86
11 Veröffentlichung.....	87
12 DFG	88
13 Danksagung	89

1 Einleitung

1.1 Acute respiratory distress syndrome ARDS

ARDS ist ein potentiell lebensbedrohliches Lungenversagen mit vielen unterschiedlichen Auslösern nach dem Ausschluss kardialer Genese.

Definition

ARDS wurde erstmals 1967 von Ashbaugh ^{et al} beschrieben als Symptomkomplex mit akut einsetzender Tachypnoe, Hypoxämie und bilateralen Infiltraten im Röntgen-Thorax bei 12 sonst gesunden, jungen Individuen [1].

1994 erstellte die American-European Consensus Conference AECC eine Definition von ALI – acute lung injury – und ARDS mit folgenden Kriterien: 1) akuter Beginn, 2) Nachweis von bilateralen Infiltraten im Röntgen-Thorax, 3) ein Wedge-Druck < 18mmHg und 4) ein Hypoxämie-Index von $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 200\text{mgHg}$ für ARDS und 200-300mmHg für ALI (PaO_2 = Sauerstoffpartialdruck im arteriellen Blut, FiO_2 = Sauerstoffanteil der Atemluft) [2].

2012 wurde die Berlin-Definition unter Mitwirkung von der European Society of Intensive Care Medicine, der American Thoracic Society und der Society of Critical Care Medicine entwickelt. Auf die Unterscheidung zwischen ALI und ARDS in Abhängigkeit des Hypoxämie-Indexes wurde verzichtet. Als Neuerung wurde ARDS in drei Schweregrade abhängig von der Hypoxämie eingeteilt (mild: $\text{PaO}_2 / \text{FiO}_2$ 201-300 mit positivem end-expiratorischem Druck (PEEP) ≥ 5 cm H₂O, moderat: $\text{PaO}_2 / \text{FiO}_2$ 101-200 mit PEEP ≥ 5 cm H₂O, schwer: $\text{PaO}_2 / \text{FiO}_2 \leq 100$ mit PEEP ≥ 5 cm H₂O). Beibehalten wurde der Nachweis von bilateralen Verdichtungen im Röntgen-Thorax oder CT-Thorax, der Ausschluss einer kardialen Ursache des pulmonalen Ödems und der akute Beginn innerhalb einer Woche [3].

Epidemiologie

Die Angaben zur Inzidenz von ALI und ARDS schwanken in der Literatur zwischen 13,5 – 79 pro 100.000 Personen-Jahren. So wurde die Inzidenz für die USA 1999-2000 mit 79 pro 100.000 Personen-Jahren [4] und 17-64 pro 100.000 Personen-Jahren [5] angegeben, während für Skandinavien 18 pro 100.000 Personen-Jahren für ALI und 13,5 für ARDS nach der AECC-1994 Definition angegeben wurden [6]. In einer großen internationalen, multizentrischen, prospektiven Kohorten-Studie von 2016 betrug die Prävalenz für ARDS mit Erfüllung der Berlin-Definition von 2012 10,4% der Intensivstation-Einweisungen. Die Aufteilung in die drei Schweregrade ergab 30% mit mildem, 46,6% mit moderatem und 23,4% mit schwerem ARDS. Die Mortalität bei ARDS ist hoch und lag in dieser Studie bei zunehmender Schwere des Krankheitsbildes zwischen 34,9% (mild) und 46,1% (schwer) [7].

Klinik

Die Patienten präsentieren sich klinisch mit Dyspnoe, Zyanose und Tachypnoe. Es besteht eine milde bis schwere Hypoxämie. Radiologisch sind bilaterale Lungeninfiltrate nachweisbar. Zu den auslösenden Faktoren gehören unter anderem Schock, Sepsis, Pneumonie, schwere Traumata, Aspiration und Pankreatitis [8].

Klinisch können durch Anwendung des hoch negativ prädiktiven „lung injury prediction score“ (LIPS) Patienten mit einem hohen Risiko für die Entwicklung von ALI/ARDS identifiziert werden. Der LIPS berechnet sich aus verschiedenen Faktoren mit unterschiedlicher Wertung; ein höherer LIPS geht mit einem höheren Risiko für die Entwicklung eines ALI/ ARDS einher. Zu den einwirkenden Faktoren gehören u.a. das Vorliegen von Schock, Aspiration, Sepsis, Pneumonie, Hoch-Risiko-Chirurgie (z.B. Chirurgie bei akutem Abdomen) und Hoch-Risiko-Trauma (z.B. multiple Frakturen, traumatische Hirnschädigung) sowie Vordiagnosen wie z.B. Alkoholabusus, Adipositas mit BMI > 30, Hypoalbuminämie, Chemotherapie, Tachypnoe und Azidose [9].

Nach überstandener Krankheit bleiben häufig Einschränkungen bestehen; so weisen Überlebende auch nach 5 Jahren noch eine körperliche Minderbelastung und psychische Residuen im Vergleich zu gesunden Gleichaltrigen auf [10].

Therapie

Aktuell ist noch kein Medikament zur kausalen Therapie bei ARDS zugelassen. Zurzeit behandelt man ARDS zum einen durch Therapie des entsprechenden Auslösers, zum anderen werden supportive Maßnahmen zur Verbesserung der Oxygenierung und des Gasaustausches, eine balancierte Flüssigkeitszufuhr sowie lungenprotektive Beatmung wie „low tidal volume ventilation“ eingesetzt [11, 12].

Duggal^{et al} beschrieben 2015 in einem systematischen Review zur pharmakologischen Therapie des ARDS das Fehlen eines spezifischen therapeutischen Wirkstoffs. Sie führten eine Meta-Analyse von 58 Studien durch, in denen verschiedene pharmakotherapeutische Ansätze wie niedrig dosierte Glukokortikoide, Surfactant, Neutrophile Elastase-Inhibitor, Salbutamol oder Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor GM-CSF keinen Effekt zeigten [13]. Als potenzielles zukünftiges Medikament erwies sich cis-Atracurium, welches in der Meta-Analyse bei mildem bis moderatem ARDS zu einer reduzierten Mortalitätsrate nach 28 Tagen führte. Aufgrund fehlender Verblindung in zwei der drei inkludierten Studien zu cis-Atracurium wurde jedoch die Durchführung weiterer klinischer Forschung empfohlen [13].

1.2 Pathophysiologie des ARDS

ARDS verläuft in mehreren Phasen. In der akuten Phase kommt es beim ARDS zu einer übermäßigen Einwanderung von polymorphonukleären Neutrophilen (PMN) in die verschiedenen Lungenkompartimente sowie zu einer Zunahme der mikrovaskulären Permeabilität mit Ausbildung eines pulmonalen Ödems. Es folgt eine fibroproliferative Phase mit Umbau der Lungenstruktur durch Proliferation von Pneumozyten Typ II, Fibroblasten und Myofibroblasten [14]. Zur Überwindung des ARDS sind eine Resorption des Ödems, ein Export der intraalveolären Zellen und eine Rekonstruktion der endothelialen und epithelialen Membran erforderlich.

Die vom Kapillarendothel, Interstitium und Alveolarepithel gebildete alveolo-kapilläre Barriere unterliegt im ARDS einer Dysfunktion mit erhöhter Permeabilität [15]. Erhöhte para- und transzelluläre Permeabilität mit Störungen der Zell-Zell-Verbindungen des Endothels (tight und adhaerens junctions) und Formation von interzellulären Lücken

durch Zellretraktion führen zu einem Übertritt von Proteinen und Flüssigkeit mit Bildung eines interstitiellen Ödems [16]. Als Folge besteht eine Störung des pulmonalen Gasaustausches mit Hypoxämie. Durch eine Dysfunktion der Mechanismen zum Abtransport des alveolären Ödems - wie beispielsweise der Wegfall des für den Flüssigkeitsabtransport relevanten Na^{2+} -Gradienten über das Alveolarepithel durch Beeinträchtigung der Na^{2+} - K^{+} -ATPase - persistiert das Ödem [16]. Zur Hypoxämie tragen die Ausbildung hyaliner Membranen in den Alveolen, die Zerstörung des Surfactant mit Erhöhung der Oberflächenspannung und die Zerstörung der Alveolarzellen Typ I bei. Pathohistologisch zeigt sich Stadien-abhängig eine Zerstörung der Lungenstruktur mit Aufbau von hyalinen Membranen, Proliferation von Typ II Lungenepithelzellen und fibrotischem Umbau des Interstitiums [17] (siehe folgende Abbildung 1-1).

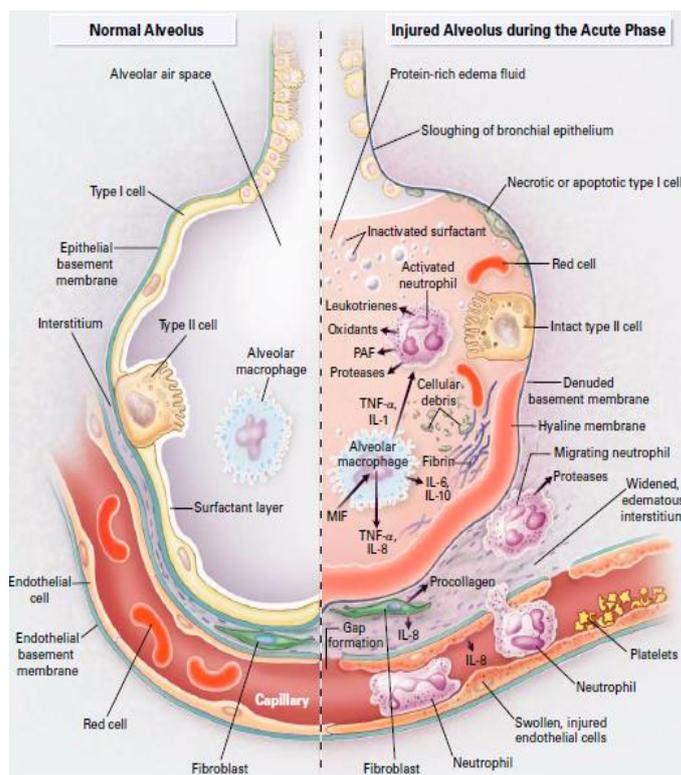


Abbildung 1-1: Darstellung eines normalen Alveolus und eines erkrankten Alveolus in der Akutphase von ARDS, entnommen aus [6]

Abbildung mit gesundem Alveolus links, pathologischem Alveolus rechts. In der akuten Phase kommt es zu einer Nekrose der Typ I Zellen, durch vermehrte Durchlässigkeit der Kapillaren zu einem interstitiellen und intraalveolären Ödem, zum Durchtritt von Zellen in das verbreiterte Interstitium und in die Alveolen, zur Aktivierung von PMN, und im Verlauf zur Entwicklung von hyaloiden Membranen.

Neutrophile Granulozyten (PMN)

PMN spielen eine wichtige Rolle in der Entwicklung und dem Ablauf des ARDS. Die übermäßige Migration von PMN in die Lungenkompartimente mit Aktivierung und konsekutiver Schädigung der Lungenstruktur und -funktion gehören zu den Hauptmerkmalen des ARDS [12, 18, 19]. In der bronchoalveolären Lavage (BAL) von ARDS-Patienten wurden bis zu 70% PMN gefunden im Vergleich zu 4% bei mechanisch ventilierten, nicht an ARDS erkrankten Patienten und 0—2% bei der gesunden Kontrollgruppe [20]. In Studienmodellen für ARDS wurde bei Tieren nach Induktion einer pulmonalen Entzündung diese PMN-Migration nachgewiesen [21, 22]. Eine Verminderung der PMN-Migration führt zu einer Reduktion der Lungenschädigung [23, 24].

Neutrophile Granulozyten gehören als Teil der zellulären, angeborenen Immunantwort zur ersten Linie der Verteidigung gegen Mikroorganismen. Ihr Durchmesser beträgt 9-12µm, sie machen beim Menschen 40-60% und bei Mäusen ca. 10-25% der Leukozyten aus [25]. PMN werden im Knochenmark gebildet, beim Menschen am Tag ca. 10^{11} , und haben eine Lebensdauer von 1-4 Tagen. Im menschlichen Blut zirkuliert ca. die Hälfte der PMN, während die andere Hälfte an Gefäßwänden vor allem von Milz und Lunge haftet, um dort als Pool bei Bedarf sehr zügig in das Blut freigesetzt zu werden.

PMN wirken über Phagozytose (Aufnahme / „Fressen“ des Schädling), Degranulation von antimikrobiellen Substanzen und Auslegen von neutrophilen extrazellulären Fallen (NETs). Bei der Phagozytose erfolgt, nach Aufnahme des Schädling in ein Phagosom, über Sekretion verschiedener bakterizider Substanzen, die Abtötung. Hierzu gehören die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) über ein NO-Synthase-System, ein NADPH-Oxidasesystem mit Bildung reaktiver Sauerstoffmetabolite (ROS) sowie proteolytische Gewebs- und Erregerabbausysteme [26, 27]. ROS können zudem durch Freisetzung in das Zytosol durch Oxidation von Proteinen und Lipiden als Signalvermittler fungieren [28, 29].

Neutrophile Granulozyten können unterschiedliche Granulae sezernieren, zu deren Inhaltsstoffen u.a. Myeloperoxidase, neutrophile Elastase, Lysozym, Cathepsin und Histaminase gehören [28]. NETs sind von PMN ausgelegte extrazelluläre, aus

Chromatin und Proteinase aus den Granulae bestehende Fäden, die als Fänger von Pathogenen dienen [26].

Eine unzulängliche Kontrolle dieser Vorgänge oder übermäßige Aktivierung von PMN führen zu Angriff und Zerstörung körpereigener Matrix [30].

Inflammation

Inaktive neutrophile Granulozyten bilden im Blutstrom und an Gefäßwänden vor allem von Milz und Lunge einen bei Bedarf schnell zu rekrutierenden Pool.

Nach einem Trauma werden von Makrophagen und Mastzellen Botenstoffe ausgeschüttet, die chemotaktisch und aktivierend auf PMN und weitere Entzündungszellen wirken. Es erfolgen die Antigenpräsentation für Lymphozyten und die Rekrutierung und Aktivierung von PMN über die Ausschüttung von Chemokinen und Tumornekrosefaktor TNF. Von PMN sezernierte Zyto- und Chemokine führen zur Unterhaltung und Vermehrung der Entzündungsreaktion. Von Mastzellen sezernierte pro-inflammatorische Botenstoffe wirken zusätzlich aktivierend und chemotaktisch auf PMN und weitere Lymphozyten. Aktivierte PMN wirken anschließend bakterizid über Phagozytose, Degranulation und NETs [27].

Zytokine

Zytokine sind kleine (5-20kDa) Proteine, die an der Zelldifferenzierung, am Zellwachstum und an der Zellproliferation beteiligt sind. Die pro-inflammatorischen Zytokine Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α) und Interleukin 6 (IL-6) werden u.a. von Mastzellen, PMN und Makrophagen sezerniert. TNF- α und IL-6 induzieren die Expression von für die Migration relevanten Molekülen wie vascular cell adhesion protein 1 (VCAM-1), intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), E- und P-Selektin und tragen dadurch zur Leukozytenmigration bei [31, 32].

Chemokine

Chemokine sind kleine Proteine (70-125 Aminosäuren, 6-14kDa). Sie stellen eine Untergruppe von Zytokinen dar, die anlockend (= chemotaktisch) auf ihre Zielzellen wirken. Chemokin-Rezeptor tragende Zellen wandern zum Ort der höchsten Chemokin-

Konzentration. Zu den für die PMN-Migration in die Lunge relevanten Chemokinen bei Mäusen gehören CXCL-1 (Synonym keratinocyte-derived chemokine KC) und CXCL-2/3 (Synonym macrophage inflammatory proteine-2 MIP-2). Beide Chemokine binden an den von PMN, Mastzellen, Monozyten, Makrophagen sowie nicht-hämatopoetischen Zellen wie pulmonalen Endothelzellen exprimierten Rezeptor CXCR-2 [28, 33]. Seine Aktivierung führt bei PMN zur Degranulation, respiratory burst, Phagozytose, Chemotaxis und Transmigration; bei Lipopolysaccharid-induziertem ALI führt die Aktivierung von CXCR-2 zu pulmonaler Einwanderung von PMN und Entwicklung einer Lungenläsion [24].

PMN-Migration

Der chemotaktisch wirkende Gradient von pro-inflammatorischen Zyto- und Chemokinen führt zu einer Migration von PMN an den Ort der Schädigung. Bei einer pulmonalen Entzündung sind in mehreren gut regulierten Zwischenschritten eine Überwindung von Kapillarendothel, Interstitium und Alveolarepithel nötig. Üblicherweise findet die transendotheliale Migration von PMN in postkapillären Venolen mit hoher Flussgeschwindigkeit statt, unter Involvierung einiger Zwischenschritte wie Andocken (capture/ tethering) an das Endothel, Rollen mit Ausbildung einer Adhäsionsbindung an das Endothel, Verstärkung der Adhäsionskräfte und para- und transzellulärer Migration und Migration durch die Basalmembran [34].

In der Lunge findet die Migration aus dem Gefäßbett der Kapillaren heraus statt [35], die segment-abhängig einen deutlich kleineren Durchmesser als die PMN haben (PMN: 6-8µm, Kapillaren: 2-15µm), sodass es bei den PMN zu einer Gestaltänderung und Verlängerung der Transitzeit kommt [36].

Selektine werden als Oberflächenproteine von verschiedenen Zellen wie Leukozyten und Epithelzellen exprimiert und vermitteln den ersten Schritt des capture und rolling. E-, L-, und P-Selektine interagieren mit dem von fast allen Leukozyten exprimierten P-Selektin Glykoproteinligand 1 und vermitteln den Kontakt zwischen L-Selektin exprimierenden PMN und entzündetem E- und P-Selektin exprimierenden Endothel, wodurch das entzündete Endothel aktiv zum Leukozyten-Rolling beiträgt [36, 37].

Die von allen Zellen - bis auf Erythrozyten - exprimierten Transmembranproteine Integrine verstärken die Adhäsion durch Bindung mit endothelialen Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1,-2 und VCAM-1. Chemokine tragen zur Aktivierung der PMN und Verstärkung der Adhäsion durch Integrine bei [34].

ICAM-1 (Synonym: CD54) ist ein bekannter Ligand für das Integrin CD11b/CD18, gehört zur IgG-Familie und wird exprimiert von Endothel, Epithel und Leukozyten. Funktionell spielt ICAM-1 eine Rolle bei der Herstellung von Zell-Zell-Adhäsion, Migration von PMN über Endothelien und das bronchiale Epithel, jedoch nicht über das alveoläre Epithel aufgrund seiner apikalen Lokalisation [30]. Inflammation induziert die Expression von ICAM-1 auf Alveolarzellen [38]. Weitere Stimuli sind TNF- α und IL-1.

Nach para- oder transzellulärer endothelialer Transmigration und Durchquerung des Interstitiums erfolgt die epitheliale Transmigration mit Unterscheidung von Adhäsion, Migration und postmigratorischen Ereignissen. Von PMN exprimiertes β 2-Integrin CD11b/CD18 ist hauptsächlich für die initiale Adhäsion am pulmonalen Epithel verantwortlich [39] und interagiert mit verschiedenen epithelialen Liganden wie JAM-C. Die transepitheliale Migration erfolgt im Unterschied zur transendothelialen an basolateral-apikaler Zellausrichtung und parazellulär. Ort der Migration sind trizelluläre Ecken, gebildet von zwei Alveolartyp II Zellen und einer Typ I Zelle. Die PMN bleiben anschließend über u.a. ICAM-1 vermittelt im Alveolarlumen am Epithel haften [30] (siehe Abbildung 1-2).

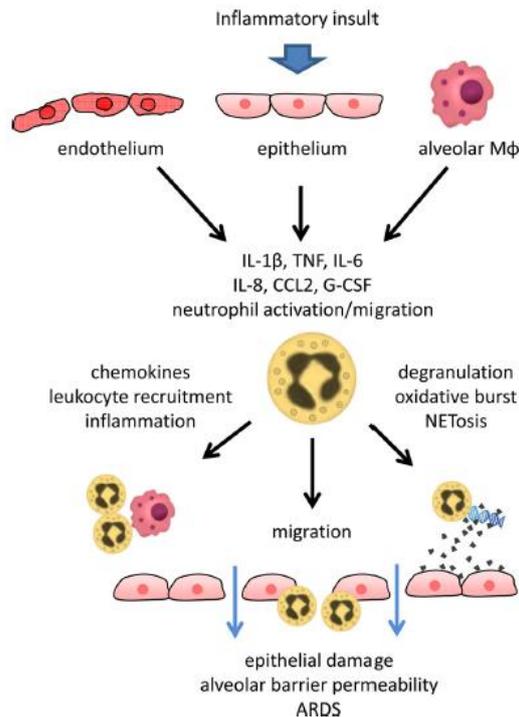


Abbildung 1-2: Die Rolle der PMN bei ARDS, entnommen aus [40]

Nach einem entzündlichen Stimulus werden nach Ausschüttung pro-inflammatorischer Zyto- und Chemokine PMN aktiviert. Es kommt zur Degranulation, Auslegen von NETs und Entstehen reaktiver Sauerstoffspezies durch die PMN. Die PMN migrieren aus dem Gefäßbett in das Interstitium und in die Alveolen, es entsteht ein Epithelschaden, eine erhöhte mikrovaskuläre Permeabilität und das klinische Bild des ARDS.

1.3 Adenosin

Adenosin ist ein aus Adenin und Ribose bestehendes Nukleosid. Im Körper ist es beteiligt am Energiestoffwechsel als Teil der Verbindungen Adenosinmono-/-di- und -triphosphat (AMP, ADP, ATP), am Aufbau der RNA und – als Desoxyadenosin – am Aufbau der DNA. Es ist Bestandteil einiger Cofaktoren (Bsp. Co-Enzym A) und fungiert als extrazellulärer Botenstoff.

In Stresssituationen wie Hypoxie oder Inflammation erfolgt durch unterschiedliche Gewebe die Bildung und Sezernierung von Adenosin-Vorstufen [41]; PMN und Endothelzellen setzen in solchen Situationen viel Adenosin frei [42]. Die Vorläufer ATP, ADP oder AMP werden durch extrazelluläre, membrangebundene Enzyme CD39 (ATP/ADP > AMP) und CD73 zu Adenosin hydrolysiert (AMP > Adenosin) [43]. Bei einem Membranschaden (z.B. durch Lyse, Nekrose, Inflammation) steigt aufgrund einer physiologisch hohen intrazellulären ATP-Konzentration die lokale extrazelluläre ATP-

Konzentration mit konsekutiver Umwandlung zu Adenosin. Zu weiteren Quellen für extrazelluläres Adenosin zählen Membrankanäle, Freisetzung aus Transportvesikeln, und Lysosomen [44] (siehe Abbildung 1-3).

Extrazelluläres Adenosin besitzt eine sehr kurze Halbwertszeit von 1,5 Sekunden, bedingt durch schnelle intrazelluläre Wiederaufnahme, durch Abbau zu Inosin durch Adenosin-Deaminase oder durch Rephosphorylierung durch Adenosin-Kinase. Es fungiert als Botenstoff über vier verschiedene, extrazellulär auf Zellmembranen lokalisierte Adenosinrezeptoren A_1 , A_{2a} , A_{2B} und A_3 mit unterschiedlicher Wirkung je nach exprimiertem Rezeptorsubtyp. Zu den klinischen Anwendungsmöglichkeiten von Adenosin gehört die intravenöse Bolusgabe zur Konversion von paroxysmalen supraventrikulären Tachykardien.

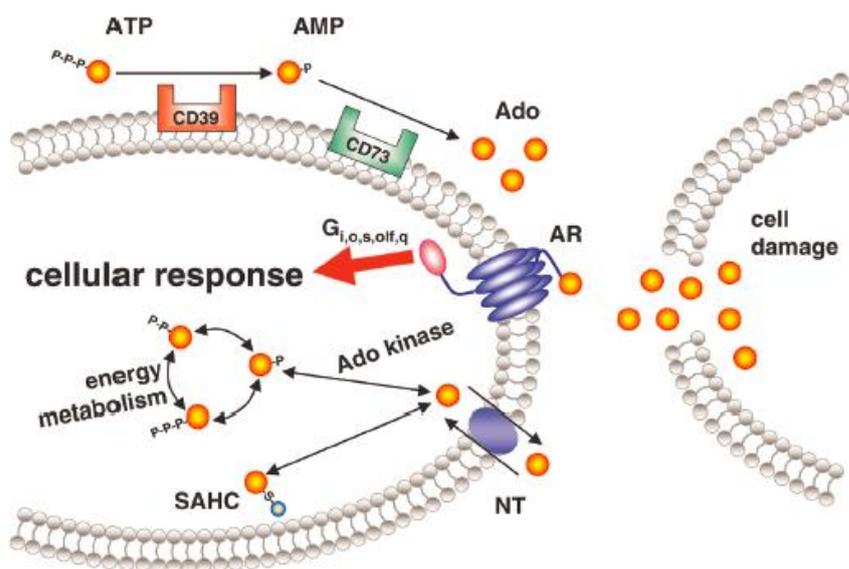


Abbildung 1-3: Entstehung von extrazellulärem Adenosin, entnommen aus [45]

Abkürzungen: Ado – Adenosin, AMP – Adenosinmonophosphat, AR – Adenosin-Rezeptor, ATP – Adenosintriphosphat, NT – Nucleosid Transporter, SAHC – S-adenosylhomocystein. Entstehung von extrazellulärem Adenosin durch Hydrolyse von Vorläufermolekülen über die Enzyme CD39 und CD73 oder aus intrazellulärem SAHC mit Transport via NT in den extrazellulären Raum und Bindung an einen Adenosinrezeptor.

1.4 Adenosinrezeptoren

Die vier bekannten Adenosinrezeptoren A_1 , A_{2a} , A_{2b} und A_3 gehören zu den G-Proteingekoppelten Rezeptoren (GPCR). GPCR bestehen aus sieben Transmembrandomänen

mit extrazellulären Bindungsstellen für den entsprechenden Liganden und intrazellulärer Kopplung an G-Proteine zur Signaltransduktion. Die heterotrimeren G-Proteine bestehen aus den drei Untereinheiten α , β und γ . Die α -Untereinheit G_α bindet und hydrolysiert Guanosin triphosphat (GTP) und wird in weitere Subfamilien (G_i , G_s , G_q und $G_{12/13}$) mit Subklassen eingeteilt. Nach Bindung von GTP an die α -Untereinheit und Komplexbildung mit der β - und γ -Untereinheit erfolgt die Aktivierung oder Inhibition von Enzymen. Durch die Hydrolyse des GTP durch die G_α -Untereinheit nimmt das G-Protein anschließend seinen inaktiven Zustand wieder an [46].

Die Aktivierung eines G_s -, G_{olf} - oder $G_{15/16}$ -gekoppelten G-Proteinrezeptors führt zur Synthese des second messenger zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) aus zellulärem Adenosin triphosphat (ATP) durch das Enzym Adenylylcyclase. Die anschließende Aktivierung einer Proteinkinase Typ A (PKA) durch cAMP führt zur Phosphorylierung und Aktivierung verschiedener Kanäle und Enzyme. Der Abbau von cAMP erfolgt durch das Enzym Phosphodiesterase zu Adenosinmonophosphat (AMP). Die Aktivierung von G_i - oder G_o -gekoppelten Rezeptoren bewirkt durch Inhibition der Adenylylcyclase eine Reduktion von cAMP. Die Aktivierung von G_q -gekoppelten Rezeptoren führt zur Aktivierung der Phospholipase C mit Vermittlung der weiteren Signaltransduktion durch Erhöhung der sekundären Botenstoffe Inositoltrisphosphat (IP3) und Diacylglycerol (DAG).

Adenosin-Rezeptoren werden von vielen hämatopoietischen und nicht-hämatopoietischen Zellen exprimiert wie Leukozyten, Endothelzellen und Epithelzellen. PMNs exprimieren alle vier Rezeptor-Subtypen [42]. In Mausmodellen wurde eine pulmonale Expression von ebenfalls allen vier Rezeptoren festgestellt [47].

Die Adenosinrezeptoren zeigen eine unterschiedliche Affinität zu Adenosin. Während die EC_{50} (die mittlere effektive Wirkkonzentration) zur Aktivierung von A_1 , A_{2a} und A_3 zwischen 0,1-1 μ mol liegt, wird zur Aktivierung von A_{2b} eine bei pathophysiologischen Zuständen herrschende EC_{50} von 24 μ mol benötigt [48]. Die physiologische Konzentration von Adenosin liegt $< 1 \mu$ M.

Für die Rezeptoren existieren spezifische Agonisten und Antagonisten wie z. B. Methylxanthine, Koffein und Theophyllin.

Der A₁-Rezeptor

Der A₁-Rezeptor wirkt über G_i und G₀. Über Inhibition der Adenylylcyclase kommt es zu einer Reduktion von cAMP, über eine Aktivierung der Phospholipase C kommt es zu einer Erhöhung von Inositoltriphosphat-3/ Diacylglycerol (IP3/DAG), es werden Ca²⁺-Kanäle inhibiert und K⁺-Kanäle aktiviert. Zu seinen physiologischen Wirkungen gehören u.a. Bradykardie, Antinozizeption, eine Reduktion der Lipolyse und der glomerulären Filtrationsrate [49] [45].

Der A_{2b}-Rezeptor

Der A_{2b}-Rezeptor bewirkt über G_s und G_q eine Aktivierung der Adenylylcyclase und Phospholipase C und darüber eine Erhöhung von cAMP und IP3/DAG. Zu den physiologischen Wirkungen gehören eine Relaxation von glatten Muskelzellen und die Stimulation von Mastzellen zur Mediatorfreisetzung [45].

Der A₃-Rezeptor

Der A₃-Rezeptor erzielt seine Signalwirkung über G_i und G_q, führt über eine Inhibition der Adenylylcyclase zu einer Senkung von cAMP, aktiviert die Phospholipase C und erhöht darüber die IP3/DAG Spiegel. Zu seinen physiologischen Funktionen gehören die Freisetzung von Mediatoren aus Mastzellen und ischämischem Preconditioning [50].

1.5 Der A_{2a}-Rezeptor

Überblick

Der Adenosinrezeptor A_{2a} wird vor allem auf Immunzellen exprimiert, führt über unterschiedliche Signalwege zu verschiedensten physiologischen Effekten und ist Gegenstand intensiver Forschung diverser Fachgebiete. Zur Untersuchung des A_{2a}-

Rezeptors existieren spezifische Rezeptor-Agonisten und -Antagonisten sowie genetisch veränderte $A_{2a}^{-/-}$ -Tiere [51-53].

Der A_{2a} -Rezeptor wird in hoher Konzentration exprimiert im Striatum, im Thymus, in der Milz, von Leukozyten und Thrombozyten sowie in mittlerer Konzentration in der Lunge, im Herz und in Blutgefäßen [45, 54]. Für die anti-inflammatorischen und immun-modulatorischen Effekte ist die Expression des Rezeptors auf Zellen wie Monozyten, Makrophagen, Mastzellen, PMN, Lymphozyten und Endo- und Epithelzellen bedeutsam [53].

Wirkmechanismus

Die Aktivierung des A_{2a} -Rezeptors führt über die Kopplung mit einem G_s -Protein zu einer Aktivierung der Adenylylcyclase mit Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels. cAMP leitet das Signal über verschiedene Wege wie Aktivierung der PKA oder EPAC (exchange protein) weiter. Weitere Signalwege gehen über die Aktivierung von MAP-Kinasen oder Protein - Phosphatasen. Zu den Funktionen der PKA gehören die Modulation von Transkriptionsfaktoren und Enzymen über Phosphorylierung [55].

So wird der Transkriptionsfaktor „cAMP response element-binding Protein“ CREB, der an Gene mit einer cAMP response element – tragenden Promotorregion bindet und die Transkription des entsprechenden Gens moduliert, von der PKA aktiviert. CREB kann auch indirekt über die Konkurrenz an der Promotorregion mit „nuclear factor kappa B“ NF κ B wirken [55]. Der PKA-CREB-Signalweg ist u.a. bei der Schmerzmodulation und der Bildung des Langzeitgedächtnisses involviert [56]. Zu den Genen mit CREB- und NF κ B- bindenden Promotorregionen gehören diejenigen für TNF α , IL-1 β und IL-6 [57].

Der pro-inflammatorische Transkriptionsfaktor NF κ B ist fast ubiquitär im Zytosol in inaktiver Form als Komplex mit dem inhibitorischen Protein I κ B vorhanden. Nach Stimulation durch Faktoren wie TNF- α , IL-1 oder LPS wird I κ B phosphoryliert, ubiquitiniert und im Proteasom degradiert, sodass NF κ B in aktiver Form vorliegt und im Zellkern als Transkriptionsfaktor wirken kann [58, 59]. Adenosin und die

Aktivierung des A_{2a} -Rezeptors greifen über mehrere Mechanismen inhibitorisch in den NF κ B-Signaltransduktionsweg ein [59] (siehe Abbildung 1-4).

Eine weitere pro-inflammatorische Signalkaskade verläuft über den JAK/STAT-Weg. Januskinasen (JAKs) sind an der Regulation von Zellentwicklung und Wachstumskontrolle beteiligt. JAKs führen nach Stimulation zur Phosphorylierung und Aktivierung von Transkriptionsfaktoren STAT (signal transducers and activators of transcription) mit Hochregulation der entsprechenden Gene. Zu den Stimuli gehört das pro-inflammatorische, an der Akute-Phase-Reaktion beteiligte Zytokin IL-6. Der A_{2a} -Rezeptor wirkt über unterschiedliche Angriffsstellen inhibierend auf die JAK/STAT-Kaskade [59] (siehe folgende Abbildung 1-4).

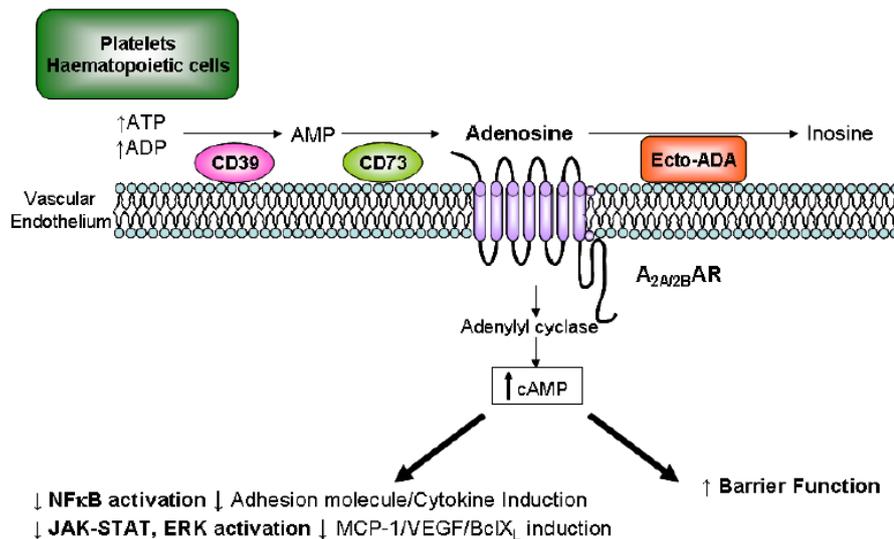


Abbildung 1-4: Entstehung und Interaktion von extrazellulärem Adenosin, entnommen aus [59]

Abkürzungen: ADP – Adenosindiphosphat, AMP – Adenosinmonophosphat, AR – Adenosinrezeptor, ATP – Adenosintri-phosphat, Ecto-ADA – Ecto-Adenosin-Deaminase, cAMP – cyclo-Adenosinmonophosphat, JAK – Januskinasen, NF κ B - nuclear factor kappa B, STAT - signal transducers and activators of transcription. Entstehung und Interaktion von extrazellulärem Adenosin mit dem Adenosinrezeptor, hier beispielhaft $A_{2a/2b}$, mit konsekutivem Anstieg von cAMP und Inhibition der pro-inflammatorischen NF κ B- und JAK-STAT-Signalwege.

Der A_{2a} -Rezeptor wirkt anti-inflammatorisch und immun-modulatorisch über seine Expression auf den Immunzellen [53]. Die Produktion und Sezernierung von TNF- α und IL-12 werden A_{2a} -abhängig inhibiert [60]. In vitro und in vivo erfolgt die Produktion und Freisetzung des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 durch Makrophagen nach Stimulation durch E. coli A_{2a} -Rezeptor-abhängig [61]. Der A_{2a} -

Rezeptor wirkt protektiv bei Ischämie-bedingtem Reperfusionsschaden am Herzen [62, 63], in der Niere [64], in der Leber [53] und in der Lunge [65]. Zu den physiologischen Wirkungen nach Aktivierung gehören zudem die arterielle Vasodilatation und Plättchenhemmung [43]; durch das Vorkommen im Gehirn führt der A_{2a} -Rezeptor zu Neuromodulation und zeigt Einfluss bei Parkinson [54]; im Tiermodell wurde eine Abhängigkeit der β -Zellproliferation des Pankreas bei erhöhtem Insulinbedarf vom A_{2a} -Rezeptor aufgezeigt [66]. In der Lunge ist der A_{2a} -Rezeptor u.a. beteiligt an der Modulation von Atemwegshyperreagibilität und Inflammation bei Asthma und COPD [53, 59]. Im Mausmodell mit Wildtyp- und $A_{2a}^{-/-}$ -Tieren wurde die Beteiligung des A_{2a} -Rezeptors an der Reduktion der PMN-Migration in die Lungenkompartimente, an der Verbesserung des mikrovaskulären Lecks und an der Verminderung der Zyto- und Chemokine KC, MIP-2, IL-6 und TNF- α in der BAL bei durch LPS-Inhalation induzierter pulmonaler Inflammation nachgewiesen [51].

$A_{2a}^{-/-}$ -Tiere

Gen-defiziente Tiere für spezifische Charakteristika werden seit langem in der Forschung verwendet. Knock-out Tiere existieren für alle 4 Adenosin-Rezeptorsubtypen und werden in vielen Tiermodellen eingesetzt [67, 68]. A_{2a} -defiziente Tiere ($A_{2a}^{-/-}$ -Tiere) mit CD1-Hintergrund sind überlebensfähig und fertil.

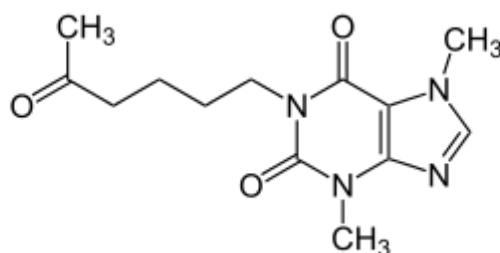
1.6 Pentoxifyllin PTX

Überblick

IUPAC: 3,7-Dimethyl-1-(5-oxohexyl)purin-2,6-dion

Summenformel: $C_{13}H_{18}N_4O_3$

Strukturformel:



Pentoxifyllin (PTX) ist ein Xanthin-Derivat. Als nicht-selektiver Phosphodiesterase-Inhibitor wird PTX aufgrund seiner rheologischen Eigenschaften seit Jahrzehnten in der Therapie von intermittierender Claudicatio eingesetzt [69, 70]. Zu den Wirkungen auf die Rheologie gehören die Verbesserung der Blut- und Plasmaviskosität, Verbesserung der Verformbarkeit von Erythrozyten, Reduktion der Fibrinogenbildung und der Thrombozytenaggregation [70, 71].

PTX ist als zugelassenes Medikament von Interesse für unterschiedlichste Forschungsgebiete und wird in vielen klinischen Studien getestet. So zeigte der Einsatz von PTX bspw. bei Multiinfarkt-Demenz eine Verbesserung kognitiver Fähigkeiten [70, 72] oder in Kombination mit Kortikosteroiden einen protektiven Effekt bei alkoholbedingter Hepatitis [73].

Zusätzlich zu den rheologischen Eigenschaften besitzt PTX anti-inflammatorische und anti-oxidative Eigenschaften. Zu den immun-modulatorischen Eigenschaften gehören unter anderem eine Reduktion der TNF- α -Synthese, Abschwächung des oxidativen Burst von PMN, Reduktion von IL-12, IFN- γ -, GM-CSF und IL-6-Freisetzung [74, 75].

PTX führte in verschiedenen Tiermodellen nach induzierter Entzündung zu einem geringeren Neutrophilen- und Makrophagenrecruitment und reduzierte die ICAM-1 Expression, IL-8-, IL-6- und TNF- α -Konzentration sowie die Proteinkonzentration in der BAL [76-79]. In einer Tierstudie mit Induktion eines Lungenschadens durch Salzsäure- (HCl-) Instillation bewirkte eine Vorbehandlung mit PTX eine Verringerung des Endothelschadens mit geringerem interstitiellem Ödem [80].

In einer klinischen Studie mit 30 Krebspatienten mit ARDS führte PTX zu einer Reduktion von TNF und einer Reduktion der Mortalität [81].

PTX als Medikament

PTX ist in verschiedenen Dosierungen und Applikationen (Infusionslösung und Retardtablette zur oralen Einnahme) erhältlich. Zu den Indikationen gehören die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK), trophische Läsionen oder

Durchblutungsstörungen des Auges oder Gehörs mit Seh- oder Hörminderung. PTX liegt in einer 300mg Lösung zur intravenösen Applikation und in 400mg und 600mg Retard-Tablettenform vor. Die Maximaldosis am Tag beträgt 1200mg, verteilt auf mehrere Einzelgaben. Zu den Kontraindikationen gehören eine Überempfindlichkeit gegen den Wirkstoff und eine stattgehabte frische Blutung oder Infarkt (z.B. akuter Myokardinfarkt; intrazerebrale Blutung). Bei schwerer Nieren- oder Leberinsuffizienz ist eine Dosisanpassung mit regelmäßiger Überwachung der Nieren- und Leberwerte erforderlich. Bei Einnahme von Antidiabetika sollte eine einschleichende Dosierung mit regelmäßiger Überwachung des Blutzuckerspiegels erfolgen. Die blutzuckersenkende Wirkung von Insulin oder oralen Antidiabetika kann verstärkt werden. PTX kann bei gleichzeitiger Einnahme von Antihypertensiva und anderen Medikamenten mit blutdrucksenkender Wirkung eine verstärkende Wirkung auslösen. Die gleichzeitige Einnahme von PTX und Theophyllin kann zu erhöhten Spiegeln von Theophyllin mit verstärkten Nebenwirkungen von Theophyllin führen.

Zu den häufigsten Nebenwirkungen gehören Magen-Darmbeschwerden, Flush, Schwindel, Tremor, Kopfschmerzen. Seltener kommt es zu Herzrhythmusstörungen, Blutdrucksenkung, Angina pectoris. Sehr selten kommt es u.a. zu Auswirkungen auf die Leber (intrahepatischer Gallenstau, Anstieg der Leberenzyme), Auftreten von Blutungen (Haut, Schleimhäute, Magen-Darmtrakt, intrakranielle Blutung, Netzhautblutung), Thrombozytopenie oder vegetativen Symptomen (Unruhe, Schlafstörung, vermehrtes Schwitzen, Parästhesien). Bei einer Überdosierung kommt es unter anderem zu Schwindel, Brechreiz, Blutdruckabfall, Tachykardie bis hin zu Bewusstlosigkeit, Areflexie, tonisch-klonischen Krämpfen.

PTX wird bei oraler Einnahme rasch resorbiert und unterliegt einem ausgeprägten First-Pass-Effekt. Der maximale Serumspiegel wird ungefähr zwei Stunden nach der Einnahme von PTX Retard-Tabletten erreicht. PTX wird sowohl nach oraler als auch nach intravenöser Verabreichung stark metabolisiert. Es sind sieben Biotransformations-Produkte M_{I-VII} mit den Hauptmetaboliten $M_{V,I}$ und IV bekannt mit höchstem Blutspiegel von M_V . Die Eliminationshalbwertszeiten für PTX und die drei Hauptmetaboliten liegen zwischen 30 - 90 Minuten. Die Elimination findet zu 90 - 95% über die Niere und zu 5% über die Faeces statt. PTX akkumuliert nicht wesentlich, bindet nicht an Humanalbumin und führt zu keiner Enzyminduktion.

Anwendung von PTX in der Forschung

In der Literatur existieren unterschiedliche Dosierungen und Verabreichungsarten von PTX; die häufigsten Gaben beim Tier erfolgten intravenös als Bolus oder Dauerinfusion. Aufgrund guter Resorption und zur Vermeidung akzidenteller paravasaler Injektion erfolgte in dem hier verwendeten Studienmodell eine intraperitoneale Gabe des Placebos und des PTX [40].

Zu dieser Thematik sind in der Literatur einige experimentelle Ansätze beschrieben. In einem Modell mit Ratten bei HCl-induzierter Lungenschädigung kam es unter Vorbehandlung mit 50mg/kg Körpergewicht PTX zu einer deutlichen Reduktion von Neutrophilen- und Makrophagenrecruitment in den Alveolen bei verbesserter Oxygenierung und reduzierter TNF- α Konzentration in der BAL [77]. In einem Rattenmodell von 2003 verbesserte eine kontinuierliche intravenöse Infusion von PTX 1mg/kg/h ein durch LPS induziertes ALI bei signifikanter Reduktion von ICAM-1 Expression, IL-8 und -6 Konzentrationen [78]. In einer Studie zur Meconium-Aspiration an Ferkeln führte eine intravenöse Gabe von PTX 20mg/kg als Bolus gefolgt von einer kontinuierlichen Infusion von 20mg/kg/h PTX nach Meconium-Instillation in eine Lunge zu einer geringeren Zunahme an Alveolarmakrophagen, TNF- α - und Proteinkonzentrationen in der BAL der betroffenen Lunge [79]. In mehreren Studien wurde eine protektive PTX-Wirkung bei einer Dosierung von 10mg/kg nachgewiesen [82, 83]. Bei nachgewiesener EC_{50} von PTX $\geq 1\mu M$ [84] wurde in diesem Mausmodell die Wirkung von intraperitoneal injiziertem PTX 10mg/kg untersucht.

1.7 Fragestellungen dieser Dissertation

PTX ist aufgrund seiner anti-inflammatorischen Eigenschaften und der bereits bestehenden Zulassung ein interessantes Medikament für eine mögliche zukünftige Anwendung bei ARDS und wurde bereits off-label mit unterschiedlichem Nutzen bei ARDS-Patienten angewendet [81]. Da seine Wirkungsweise jedoch aktuell nur inkomplett bekannt ist, ist weitergehende Forschung notwendig. In vitro wurde bereits eine Abhängigkeit der protektiven PTX-Wirkung vom A_{2a} -Rezeptor nachgewiesen [75]. Um die Frage zu beantworten, ob die beobachtete PTX-Wirkung vom A_{2a} -Rezeptor

abhängt, wurde ein Mausmodell mit A_{2a} -Knock-out-Tieren ($A_{2a}^{-/-}$ -Tiere) konzipiert. Es wurden CD1 Wildtyp-Tiere mit $A_{2a}^{-/-}$ -Tieren verglichen. Untersucht wurden Basisblutbilder, die PMN-Migration in die Lungenkompartimente, das Ausmaß des mikrovaskulären Lecks, die histologische Lungenstruktur und die Ausschüttung pro-inflammatorischer Zyto- und Chemokine jeweils mit und ohne Induktion einer pulmonalen Entzündung durch Inhalation von LPS sowie mit und ohne Gabe von PTX.

Durch dieses Tiermodell sollten im Rahmen meiner Doktorarbeit folgende spezifische Fragestellungen beantwortet werden:

- Beeinflusst die Applikation von PTX die PMN-Migration in die Lungenkompartimente nach LPS-Inhalation in Abhängigkeit vom Vorhandensein des A_{2a} -Rezeptors?
- Beeinflusst PTX das Ausmaß des durch LPS induzierte pulmonaler Inflammation auftretenden mikrovaskulären Lecks? Wenn ja, ist der A_{2a} -Rezeptor daran beteiligt?
- Beeinflusst PTX über den A_{2a} -Rezeptor die Ausschüttung pro-inflammatorischer Zyto- und Chemokine?

2 Material und Methoden

2.1 Material

Tierlinien

Für die Versuche wurden männliche $A_{2a}^{-/-}$ -Tiere aus eigener Züchtung mit CD1-Hintergrund und korrespondierende CD1 Wildtyp-Tiere (Charles River Laboratories, Sulzfeld) im Alter von 8-12 Wochen mit einem Gewicht von 24-34 g verwendet.

Die Tierversuche wurden genehmigt durch das Regierungspräsidium Tübingen (Antragsnummer A4/10).

Geräte

Absaugpumpe Vario Vaccuband BVC 21	Vaccubrand, Wertheim
Durchflusszytometer FACSort	Becton & Dickinson, Heidelberg
Eismaschine AF-10	Scotsman, Sprockhoevel
Gewebeinfiltrationsautomat TP 1050	Leica Biosystems, Nussloch
Histoembedder EG 11160	Leica Biosystems, Nussloch
Homogenisator Precellys 24	PEQLAB, Erlangen
Inkubationswasserbad Typ 1003	GFL Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Labor-pH-Meter 526	WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim
Mehrkanalpipette (3114000158)	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop Leica DMIL	Leica, Wetzlar
Mikroskop Leica DM-IRB	Leica, Wetzlar
Mikrowelle Cookmate	Deawoo, Butzbach
Multipipette Plus (4981000.019)	Eppendorf, Hamburg
Photometer Ultraspec 3000 pro	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Photometer, Genios	Tecan, Crailsheim

Pinzetten (BD312R, BD311R)	Aeskulap, Tuttlingen
PipetBoy accu (155000)	Integra Bioscience, Fernwald
Pipetten (0,1-2500µl)	Eppendorf, Hamburg
Plate washer Columbus Plus	Tecan, Crailsheim
Rotationsmikrotom RM 2235	Leica Biosystems, Nussloch
Scheren (BC590R, BC060R)	Aesculap, Tuttlingen
Thermoschüttler AK 82	Infors AG, Bottmingen, CH
Ultraschall Sonoplus GM 70	Bandelin electronin, Berlin
Vernebler Micro-Air U22	OMRON Healthcare, Illinois, USA
Vortex K-55-GE	Bender und Hobein AG, Zürich, CH
Waage HR-120-EC	A&D Instruments, Ltd, Ahrensburg
Waage Sout II	Ohaus, Kirchheim
Wärmeplatte HI 1220	Leica biosystems, Nussloch
Wasserbad HI 1210	Leica biosystems, Nussloch
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau

Verbrauchsmaterialien

Cell culture tube 12ml, steril (163160)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Combitips Plus 10ml (0030069.269)	Eppendorf, Hamburg
Deckgläser (01-2460/1)	R. Langenbrinck, Emmendingen
Einbettkassetten Rotilapo (k.113.1)	Carl Roth, Karlsruhe
Einweg-Pasteurpipetten (EA70.1)	Carl Roth, Karlsruhe
Färbeeinsatz (11-0002)	R. Langenbrinck, Emmendingen
Färbeküvette (11-0001)	R.Langenbrinck, Emmendingen
GAZIN Mullkompressen (18501)	Lohmann&Rauscher, Neuwied
GAZIN Mullkompressen steril (13620)	Lohmann&Rauscher, Neuwied
Glas Röhrchen No 2775/6 75x12mm	Assistent, Sondheim
Glaspasteurpipetten 150mm	WU, Mainz
Handschuhe Dermaclean (PFC 4303971)	Ansell, München
ImmEdge Hydrophobic Barrier Pen (H-4000)	Vector Labs, Peterborough, UK

Kanüle Safety-Multifly 21G (851638235)	Sarstedt, Nürnberg
Kanülen Microlance 20G (301300)	Becton&Dickinson, Heidelberg
Kanülen Microlance 24G (304100)	Becton&Dickinson, Heidelberg
Kanülen Microlance 25G (300400)	Becton&Dickinson, Heidelberg
Kanülen Microlance 27G (302200)	Becton&Dickinson, Heidelberg
Kyroröhrchen 1,8ml Nunc (368632)	Thermo Scientific, Bonn
Micro packaging vials closure (1066460)	PEQLAB, Erlangen
Micro packaging vials, 2 ml (1065637)	PEQLAB, Erlangen
Mikrotiterplatte Microplate (655101)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Mikrotiterplatte Nunc Maxisorp (442404)	Thermo Scientific, Bonn
Mikrotomklinge S35	Feather, Tokyo, J
Multi-SafeSeal Tubes (7083.1)	Carl Roth, Karlsruhe
Nähgarn Mercifil No 50 (M3541)	Amann und Söhne, Bönningheim
Objektträger (03-0004)	R. Langenbrinck, Emmendingen
Objektträger Superfrost Plus (03-0060)	R. Langenbrinck, Emmendingen
Parafilm	Parafilm
Petrischalen Cellstar (627160)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Petrischalen Cellstar (628160)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Petrischalen Cellstar (633171)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Pipettenspitzen 10µl (70.1115)	Sarstedt, Nürnberg
Pipettenspitzen 200 µl (0030.000.870)	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen 200µl (70760002)	Sarstedt, Nürnberg
Pipettenspitzen 1000µl (686290)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Pipettenspitzen 2000µl (K315.1)	Carl Roth, Karlsruhe
Polypropoleneröhrchen 5ml (352052)	Becton&Dickinson, Heidelberg
Polypropoleneröhrchen 15ml (188271)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Polpypropoleneröhrchen 50ml (352070)	Becton&Dickinson, Heidelberg
Quarzglasküvetten (105-200.QS)	Hellma, Müllheim
Reaction tubes 1,5ml (616201)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Safe-lock tubes 0,5ml (00301121023)	Eppendorf, Hamburg
Spritze 1ml (300013)	Becton&Dickinson, Heidelberg
Spritze Injekt 2ml (4606027V)	Braun, Melsungen
Spritze Injekt 5ml (4606051V)	Braun, Melsungen

Spritze Injekt 10ml (4606108V)	Braun, Melsungen
Stripetten 1ml (356521)	Becton&Dickinson, Heidelberg
Stripetten 5ml (356543)	Becton&Dickinson, Heidelberg
Stripetten 10ml (356551)	Becton&Dickinson, Heidelberg
Stripetten 25ml (356525)	Becton&Dickinson, Heidelberg
Transwell Plate 24 well (3472-Clesar)	Corning Inc., Wiesbaden
Venenkatheter Insyte 22G (381223)	Becton&Dickinson, Heidelberg
Zählkammer C-Chip (DHC-N01)	Digital Bio, Seoul, ROK
Zellsiebe Cell Strainer 70µm (352350)	Becton&Dickinson, Heidelberg

Chemikalien

DAB Chromogen (S3000)	Dako, Hamburg
EDTA (ED4S)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Evans Blue (206334-10G)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Formamid (F9037)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Na ² -EDTA (A2937)	AppliChem, Darmstadt
NaCl (106404)	Merck, Darmstadt
NaHCO ₃ (K10720529)	Merck, Darmstadt
NaN ₃ (S-8032)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
NH ₄ Cl (A0988)	AppliChem, Darmstadt
PBS (D56529)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PBS- (D8537)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PFA 4% (P6148)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Wasserstoffperoxid H ₂ O ₂ 30% (108597)	Merck, Darmstadt

Medien

Avidin Blocking Kit (SP-2001)	Vector labs, Peterborough, UK
Bluing Reagent (7301)	Thermo Scientific, Bonn
Bovine serum albumine BSA (100018)	Boehringer, Mannheim
Diff-Quik (130832)	Medion Diagnostics, Düdingen, CH
DMSO (D5879)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethanol absolut (A3678)	AppliChem, Darmstadt
Eukitt (03989)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Formalin 4% (A3697)	AppliChem, Darmstadt
FSGO Gelatin (G7765)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Hämatoxylin (GHS316)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
LPS (L6011)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Methanol (106009)	Merck, Darmstadt
Paraffin Rotiplast (6642.5)	Carl Roth, Karlsruhe
Reagent Diluent (DY995)	R&D Systems, Wiesbaden
Substrat Solution (DY999)	R&D Systems, Wiesbaden
Stop Solution (80-194)	Enzo Life Sciences, Hines Drive, USA
Türk'sche Lösung (109277)	Merck, Darmstadt
Tween 20 (A4974)	AppliChem, Darmstadt
Unmasking Solution (H-3300)	Vector Labs, Peterborough, UK
Xylol (9713.3)	Carl Roth, Karlsruhe

Medikamente

Atropinsulfat 0,5mg/ml	Radiopharm, Ulm
Desinfektionsspray Softasept	Braun, Melsungen
Heparin-Natrium 5000 IE/ml	Ratiopharm, Ulm
Ketamin 50mg/ml	Ratiopharm, Ulm
NaCl 0,9% 10ml	Braun, Melsungen
NaCl 0,9% 100ml	Freesenius Kabi, Bad Homburg
Rompun 2% (25ml Xylazin) 20mg/ml	Bayer, Leverkusen
Pentoxifyllin (P1784)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Enzyme

Collagenase XI (C7657)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DNase (D4527)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Hyaluronidase (H3506)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Antikörper

A2a-Agonist (CGS 21680)	Tocris, Ellisville, MO, USA
A2a-Antagonist (ZM 241385)	Tocris, Ellisville, MO, USA

Avidin-Biotin-Staining Kit PK-4000	Vector Labs, Peterborough, UK
Biotinylated rabbit anti rat (BA 4001)	Vector Labs, Peterborough, UK
CD45 PerCP (557235)	Becton&Dickinson, Heidelberg
DuoSet ELISA IL-6 (DY 406)	R&D Systems, Wiesbaden
DuoSet ELISA KC (DY 453)	R&D Systems, Wiesbaden
DuoSet ELISA MIP-2 (DY 452)	R&D Systems, Wiesbaden
DuoSet ELISA TNF-alpha (DY 410)	R&D Systems, Wiesbaden
Gr1 (RB6-8C5)	Lymphocyte Culture Center Core, University of Virginia, Charlottesville, USA
Gr1-633	Lymphocyte Culture Center Core, University of Virginia, Charlottesville, USA
IgG 2a FITC (553929)	Becton&Dickinson, Heidelberg
IgG 2b APC (553991)	Becton&Dickinson, Heidelberg
Rat anti mouse neutrophils (MCA771GA)	AbD Serotec, Düsseldorf
Vectastain ABC-Kit (PK-4004)	Vector Labs, Peterborough, UK
7/4 FITC (MCA771F)	AbD Serotec, Düsseldorf

2.2 Lösungen und Medikamente

Anästhetikum

200 µl Ketamin [50mg/ml]

50 µl Rompun [20mg/ml]

40 µl Atropin [0,5mg/ml]

710 µl NaCl [0,9%]

Die Inhaltsstoffe wurden nacheinander in einen Eppendorf-Cup pipettiert, durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vermischt, in einer 1ml Spritze aufgezogen und bis zur Verwendung kühl gelagert.

PTX

Zur Herstellung von PTX wurde eine Stock-Lösung aus PTX-Pulver und sterilem NaCl 0,9% hergestellt. Die Konzentration der PTX-Stocklösung betrug 40mg PTX/ml. Es wurde je 45µl der Stock-Lösung in Eppendorf-Cups aliquotiert und bei -20°C gelagert. Zur Versuchsdurchführung erfolgte die Verdünnung von 45µl PTX-Stocklösung mit 1755µl sterilem NaCl 0,9% mit einer Konzentration von 1mg/ml.

Applikation von Placebo und PTX

Soweit nicht anders beschrieben, wurde als Placebo steriles NaCl 0,9% jeweils gewichtsadaptiert mit 10µl/g Körpergewicht intraperitoneal verabreicht. PTX wurde in einer Dosierung von 10mg/kg Körpergewicht bei einer Konzentration von 1mg/ml (entsprechend 10µl/g Körpergewicht) intraperitoneal (i.p.) injiziert.

Inhalation

Die Inhalation von LPS induziert bei Mäusen eine Lungenentzündung mit nachweisbar erhöhter PMN-Migration in die verschiedenen Lungenkompartimente. Die Kontrollgruppe inhalierte als Placebo NaCl. Zur Durchführung der Inhalation wurden vier bis acht Tiere in einen speziell angefertigten Kunststoff-Zylinder (Maße: 20cm Länge x 9cm Durchmesser) gesetzt. Der verschlossene Zylinder wurde an einem Ende über einen Schlauch mit einem Vernebler verbunden. Am gegenüberliegenden Ende wurde über einen Absaugschlauch mittels Unterdruck ein kontinuierlicher Fluss von vernebeltem LPS bzw. NaCl durch den Zylinder erzeugt. Über einen Zeitraum von 30-45 Minuten wurden 7ml Lipopolysaccharid von *Salmonella enteritidis* (Sigma-Aldrich), gelöst in PBS⁻ in einer Konzentration von 0,5mg/ml, zugeführt.

2.3 Analyse der PMN-Migration in die Lungenkompartimente mittels Transmigrationsassay in vivo und Durchflusszytometrie FACS

Zur Quantifizierung und Analyse der PMN-Migration in die verschiedenen Lungenkompartimente bei unterschiedlichen Konditionen wurden der Transmigrationsassay in vivo und eine Durchflusszytometrie durchgeführt.

Die Versuchstiere wurden gewogen und entsprechend der zu untersuchenden Konditionen gewichtsadaptiert vorbehandelt.

Vorbehandlung

Zum Vergleich wurden die Konditionen an $A_{2a}^{-/-}$ -Tieren und an CD1wt-Tieren untersucht. Die Dauer zwischen intraperitonealer Injektion von Placebo bzw. PTX und Beginn der LPS- bzw. Placebo-Inhalation betrug jeweils eine Stunde. Als Placebo diente NaCl. Die Zahl der Tiere pro Gruppe betrug $n=8$ bei CD1wt-Tieren und $n=6$ bei $A_{2a}^{-/-}$ -Tieren. Der Migrationsversuch in vivo mit Organentnahme und Zellgewinnung wurde 24 Stunden nach Beginn der LPS- bzw. Placebo-Inhalation durchgeführt (siehe Abbildung 2-1). Die Gruppen 1-4 wurden jeweils einmal an $A_{2a}^{-/-}$ -Tieren und einmal an Wildtyp-Tieren untersucht. Die folgende Tabelle beschreibt die Einteilung der Gruppen.

Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4
Placebo	PTX	Placebo	PTX
Placebo	Placebo	LPS	LPS

Tabelle 2-1: Konditionen der untersuchten Gruppen, je für $A_{2a}^{-/-}$ -Tiere und Wildtyp-Tiere

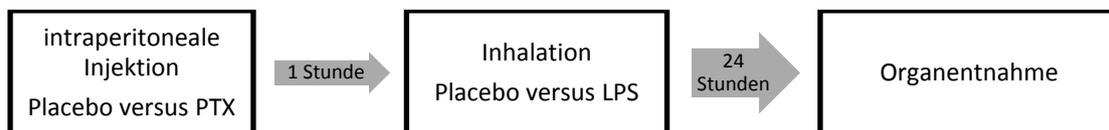


Abbildung 2-1: Chronologie der Vorbehandlung für den Transmigrationsassay in vivo

Applikation von Antagonist und Agonist des A_{2a}-Rezeptors

Der A_{2a}-Rezeptor-Agonist CGS 21680 wurde in einer Konzentration von 10mg/ml in DMSO gelöst, für die Verabreichung mit NaCl verdünnt und in einer Dosierung von 1mg/kg Mausgewicht intraperitoneal injiziert. Der A_{2a}-Rezeptor-Antagonist ZM 241385 wurde ebenfalls in einer Konzentration von 10mg/ml in DMSO angesetzt, mit NaCl verdünnt und in einer Dosierung von 1mg/kg Mausgewicht intraperitoneal appliziert.

Gruppenabhängig wurde entweder NaCl als Placebo oder PTX eine Stunde später i.p. appliziert und eine Stunde im Anschluss die LPS- bzw. NaCl-Inhalation wie oben beschrieben durchgeführt (siehe Abbildung 2-2). Der Migrationsversuch wurde 24 Stunden nach Beginn der Inhalation mit der Organentnahme fortgesetzt. Die CD1wt-Tiere wurden bei n=4 nach folgendem Schema in 6 Gruppen eingeteilt:

Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4	Gruppe 5	Gruppe 6
A _{2a} -Antagonist	A _{2a} -Agonist	A _{2a} -Antagonist	A _{2a} -Agonist	A _{2a} -Antagonist	A _{2a} -Agonist
Placebo	Placebo	Placebo	Placebo	PTX	PTX
Placebo	Placebo	LPS	LPS	LPS	LPS

Tabelle 2-2: Konditionen zur Untersuchung der Wirkung von A_{2a}-Antagonist und -Agonist, PTX und LPS; Durchführung mit Wildtyp-Tieren

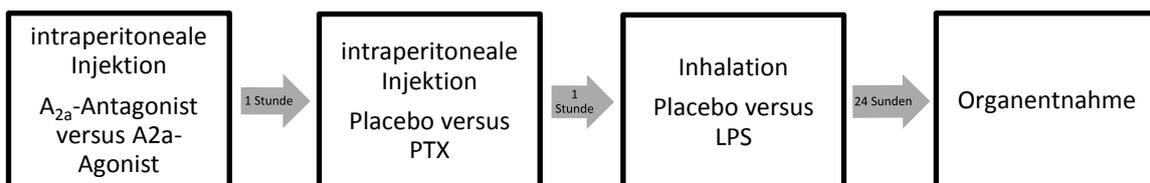


Abbildung 2-2: Chronologie der Vorbehandlung für den Vergleich von A_{2a}-Agonist und -Antagonist für den Transmigrationsassay in vivo

Zeit-abhängige Gabe von PTX

Für die Zeit-abhängige Gabe von PTX wurden CD1wt-Tieren 10mg/kg PTX i.p. zu folgenden Zeiten in Bezug auf die LPS – Inhalation injiziert: eine Stunde vor der LPS-Inhalation, unmittelbar vor Beginn der LPS-Inhalation, eine Stunde nach Beginn der LPS-Inhalation und drei Stunden nach Beginn der LPS-Inhalation. Die Tierzahl pro Gruppe betrug n=4.

Organentnahme

Nach Induktion einer pulmonalen Inflammation mittels LPS-Inhalation ist eine PMN-Migration in das interstitielle Kompartiment und den Alveolarraum nach einer Stunde (interstitiell) bzw. zwei Stunden (intraalveolär) nachweisbar und zeigt intraalveolär einen Peak bei 24 Stunden [21]. Die Organentnahme wurde in der Versuchsdurchführung im Migrationsversuch dementsprechend 24 Stunden nach LPS-Inhalation durchgeführt.

Zur Markierung der intravaskulär befindlichen PMN wurde über die Schwanzvene verdünnter, gefärbter Antikörper GR1-633 Alexa mit einem Gesamtvolumen von 300µl pro Tier injiziert. Hierfür wurden 293µl steriles NaCl 0,9% mit 7µl gefärbtem Antikörper GR1-633 vermischt und im Dunkeln bis zur Verwendung auf Eis gelagert.

Anschließend wurden 300µl Anästhetikum i.p. gespritzt. Die narkotisierten Tiere wurden in Rückenlage an den Pfoten auf dem OP-Tisch fixiert und der Kopf in Reklination an den Zähnen fixiert. Das Fell wurde mit 70%igem Alkohol desinfiziert. Fünf Minuten nach Injektion des gefärbten Antikörpers wurde das Fell abpräpariert, Thorax und Abdomen freigelegt und das Abdomen eröffnet. Nach Anlegen eines Pneumothorax durch Inzision des Diaphragmas erfolgte die Sternotomie und kraniale Fixierung desselben. Nach scharfem Durchtrennen der Vena cava inferior wurde der rechte Ventrikel zur Spülung der Pulmonalgefäße mit 3ml PBS⁻ infundiert. Als Erfolgskontrolle diente die makroskopisch sichtbare Weißfärbung der Lunge. Nach Tracheotomie und Intubation mittels einer Kanüle wurde eine bronchoalveoläre Spülung mit insgesamt 5ml PBS⁻ durchgeführt, die gewonnene bronchoalveoläre Flüssigkeit gesammelt und bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gelagert. Es wurde das Herz-Lungen-Paket entnommen, die einzelnen Lungenlappen von Herz und Mediastinalstrukturen frei präpariert und in einer Petrischale unter Zugabe einiger Tropfen einer Enzymlösung manuell homogenisiert. Für die Enzymlösung wurden zu 5ml PBS⁻ 5µl Hyaluronidase, 5µl Kollagenase, 5µl DNase (jeweils gelöst in PBS⁻) und 100µl ungefärbter Antikörper GR zugegeben. Die Lunge wurde in den Rest der Enzymlösung überführt. Anschließend erfolgte die Inkubation der Lungenproben in einer Dunkelkammer auf dem Thermoschüttler für 30 Minuten bei 37°C.

Weiterverarbeitung bronchoalveoläre Lavage (BAL)

Zur Gewinnung der Zellen in der BAL wurden die Proben zentrifugiert (300g/ 1300rpm für 10min bei 4°C). Nach Verwerfen des Überstandes wurde das gewonnene Pellet mit 1ml Färbepuffer resuspendiert. Für den Färbepuffer wurden 500ml PBS⁻ mit 5g BSA und 2,5ml einer 20% NaN³-Lösung versetzt. Bei Proben von Tieren mit LPS-Stimulation wurden 10µl der Zell-Färbepuffer-Lösung entnommen, mit 90µl Türk'scher Lösung versetzt und hiervon 10µl auf eine Zählkammer pipettiert. Bei Proben ohne LPS-Stimulation wurden 50µl Zellsuspension mit 50µl Türk'scher Lösung versetzt, ebenfalls hiervon 10µl auf eine Zählkammer pipettiert und die Zahl der PMN jeweils am Mikroskop erhoben.

Weiterverarbeitung Lunge

Nach der Inkubation der Lungenproben in der Dunkelkammer auf dem Thermoschüttler wurden die Proben manuell durch ein Zellsieb mit der Maschendichte von 70µm gepresst und mit insgesamt 20ml PBS⁻ gespült, wodurch eine Trennung der Zellen von der Bindegewebsmatrix erreicht wurde. Nach Zentrifugation der Proben bei 300g bei 4°C für 10 Minuten wurde der Überstand verworfen, das Pellet mit 5ml verdünntem Lysepuffer in der Dunkelkammer bei Raumtemperatur inkubiert und die Lyse nach 20 Minuten mit 20ml Färbepuffer gestoppt. Der Lysepuffer wurde hergestellt aus 10,03g NH₄Cl 1,5M, 1,05g NaHCO₃ 0,1M, 0,465g Disodium EDTA 0,01M und 125ml autoklaviertem Aqua bidest. Für den Versuch wurden 0,5ml Lysepuffer mit 4,5ml autoklaviertem Aqua bidest pro Tier verwendet. Nach erneuter Zentrifugation der Proben bei 300g bei 4°C für 10 Minuten erfolgte die Verwerfung des Überstandes und Resuspension in je 3ml Färbepuffer.

Zum Erhalt der Zellzahl wurden hiervon 10µl Probe mit 90µl Türk'scher Lösung versetzt, daraus 10µl auf eine Zählkammer aufgetragen und die Zellzahl unter dem Mikroskop erhoben. Je nach Zellzahl wurden die Proben mit Färbepuffer verdünnt oder durch Zentrifugieren konzentriert, sodass sich 200.000 Zellen in 100µl Probe befanden. Anschließend wurden die Zellen für die Sortierung mittels FACS gefärbt.

Zellverarbeitung und -analyse

Nach Einstellung der Zellproben auf 2000 Zellen / μl Probe erfolgte die Färbung der Zellen. Die für die Färbung verwendeten Fluoreszenzantikörper wurden in FACS-Röhrchen nach folgendem Schema mit PBS⁻ verdünnt und kurz anzentrifugiert:

Fluoreszenz-Antikörper	Konzentration des Antikörpers in mg/ml
7/4 FITC	0,1
CD45 PerCP	0,2
Gr1-633	0,5
IgG2a FITC	0,5
IgG2b APC	0,2

Tabelle 2-3: Antikörper-Konzentration zur Zellfärbung

In FACS-Röhrchen wurden je 100 μl Zelllösung von der BAL-Probe oder der Lungenprobe vorgelegt. Von den verdünnten Antikörpern wurde nach folgendem Schema je 1 μl zu den Proben zugefügt:

Verdünnte Antikörper	BAL-Proben	Lungenproben
7/4 FITC	X	X
CD45 PerCP	X	X
GR-1 633	X	-

Tabelle 2-4: Behandlung von BAL- und Lungenproben mit Fluoreszenz-Antikörpern

Die Proben wurden kurz anzentrifugiert und inkubierten dann im Dunklen bei 4°C für 20 Minuten. Den Proben wurde je 2ml Färbepuffer zugegeben, dann wurden die Proben zentrifugiert bei 1300rpm für 5 Minuten bei 4°C. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet mit einer Pipette resuspendiert, 2ml Färbepuffer zugegeben und erneut zentrifugiert bei 1300rpm für 10 Minuten bei 4°C. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 400 μl Fixierlösung resuspendiert. Die Fixierlösung wurde pro Probe aus 200 μl PFA 4% und 200 μl Färbepuffer hergestellt. Anschließend wurden die Proben am Durchflusszytometer (FACS) gemessen.

Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (Synonym fluorescence activated cell sorting FACS) ermöglicht die Identifizierung, Quantifizierung und ggf. Sortierung von Zellen in einer Probe anhand ihrer charakteristischen Eigenschaften. Ein FACS-Gerät besteht aus einem System zum Separieren der Zellen, einer Ansammlung von Lasern zum Beschießen der Zellen mit Laserstrahlen und einer Ansammlung von Detektoren für die von den Zellen reflektierten (Laser-) Strahlen. Über ein Analyse-Programm werden die Zellen bildlich am Computer dargestellt.

In dieser Arbeit wurde die Durchflusszytometrie zur Analyse der Zellproben und Quantifizierung der Antikörper-markierten PMN in den drei Kompartimenten (intravaskulär, interstitiell und intraalveolär) verwendet [21].

Die Probe wird in eine zellfreie Trägerlösung eingebracht, welche über eine Nadel angesaugt wird. Durch Entstehen einer laminaren Strömung reihen sich die Zellen aneinander an und treten dann einzeln aus einer Nadel aus, sodass jede Zelle separat mit einem Laser beschossen werden kann. Zur Detektion der von der bestrahlten Zelle reflektierten Lichtstrahlen werden unterschiedliche Kanäle verwendet. Der forward scatter channel (FSC) ist eine Linse, mit der Lichtstrahlen bis ca. 20° zur Achse des Laserstrahls registriert werden. Hierüber wird die Zellgröße eingeschätzt und von Zelldebris getrennt. Der side scatter channel (SSC) misst um 90° zur Laserstrahl-Achse von zell-spezifischen Granulae reflektiertes Licht. Zuvor mit Fluoreszenz-Antikörpern markierte Zellen emittieren nach Aktivierung durch den Laser Licht einer bestimmten Wellenlänge, welches von FL (fluorescence) Kanälen gemessen wird.

Zur Analyse mit dem Programm FlowJo® wurden 10.000 Zellen im Leukozyten-Gate gezählt und hiervon alle CD45⁺ Leukozyten weiter analysiert. In dieser Zellpopulation wurden die PMN nach positiver oder negativer Markierung von Gr-1 und 7/4 FITC analysiert und somit auf die Anzahl der intravaskulären und interstitiellen PMN rückgeschlossen. Intravaskulär befindliche PMN waren Gr-1 und 7/4 FITC positiv. Interstitiell befindliche PMN waren Gr-1 negativ und 7/4 FITC positiv. Die intraalveolären PMN aus der BAL waren GR-1 und 7/4 FITC positiv, da die BAL-

Probe mit GR-1 gefärbt wurde. Mit Hilfe einer Isotypenkontrolle wurden Artefakte reduziert.

Die folgenden Abbildungen sind beispielhaft zur Darstellung der durchflusszytometrischen Analyse und Darstellung mit FlowJo®. Verwendung einer Probe von CD1wt-Tieren, behandelt mit dem Placebo i.p. und LPS-Inhalation.

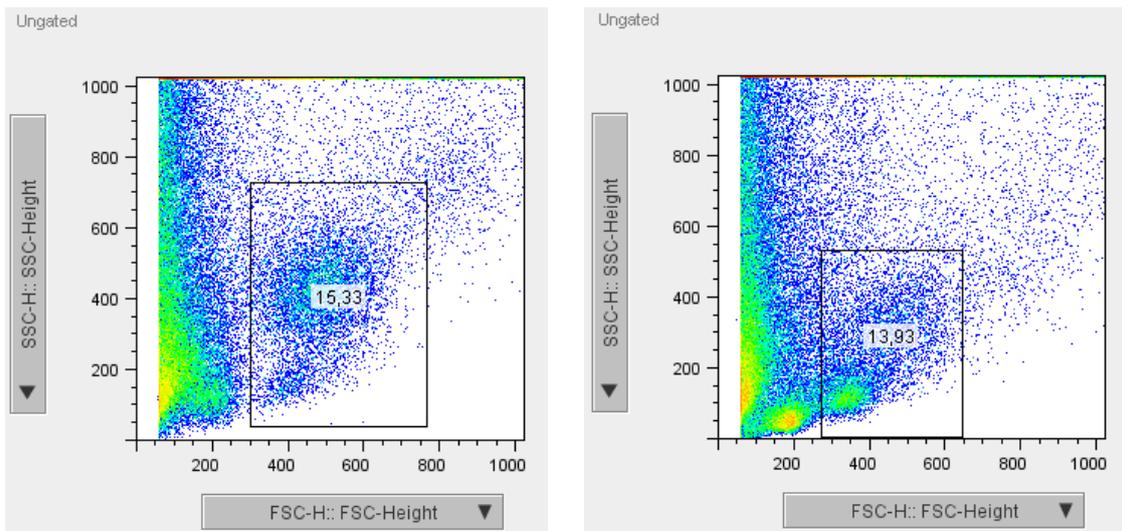


Abbildung 2-3: Auswertung der Durchflusszytometrie mit FlowJo®

Bestimmung der Leukozytenpopulation. Links Abbildung einer BAL-Probe, rechts Abbildung einer Lungengewebeprobe. Festlegen eines Gates um die zu analysierende Zellpopulation.

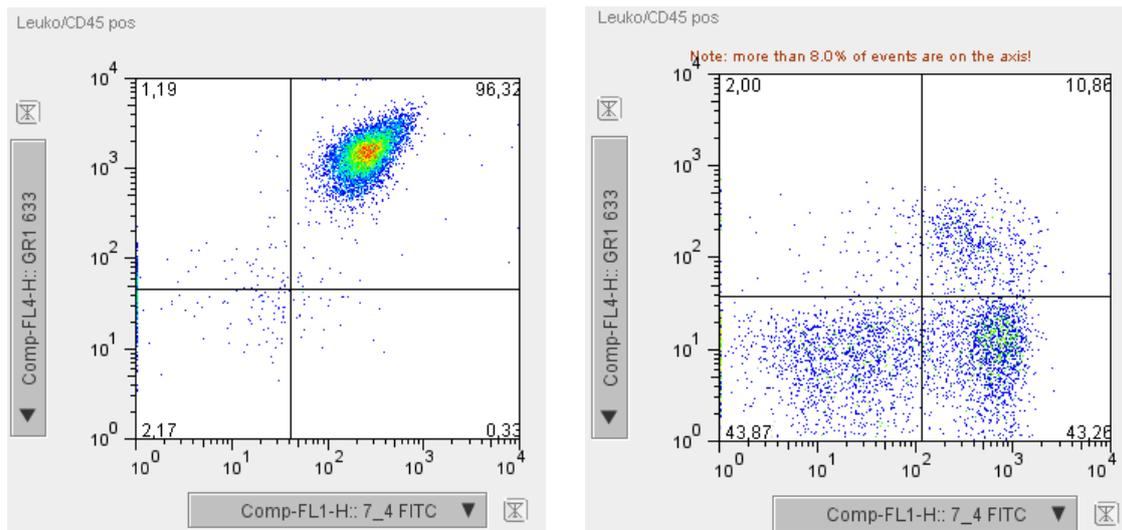


Abbildung 2-4: Darstellung der CD45-positiven Leukozyten mittels FlowJo®

Identifizierung der CD45-positiven Leukozyten. Links Abbildung einer BAL-Probe, rechts Abbildung einer Lungengewebeprobe. Links Darstellung einer großen Population (96,3%) der Leukozyten, welche CD45-positiv und GR-1-positiv sind (Population rechts oben). Rechts Unterscheidung von intravasalen

und interstitiellen Leukozyten. Die Population rechts oben stellt die intravasalen, 7/4 FITC-positiven und GR-1-positiven Zellen dar. Die Population rechts unten stellt die interstitiellen, 7/4 FITC-positiven, GR-1-negativen Zellen dar.

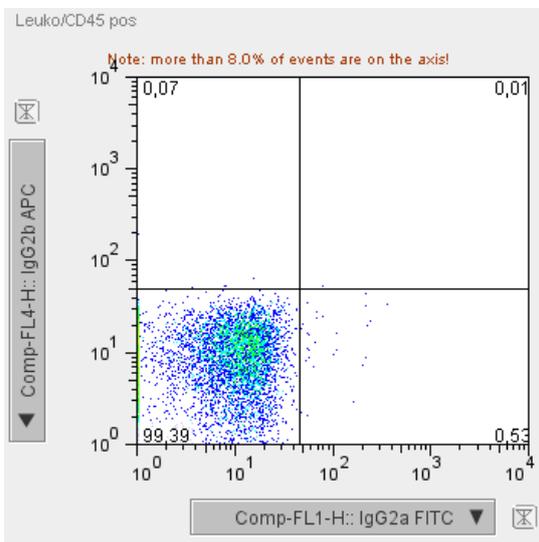


Abbildung 2-5: Darstellung der Isotypen-Kontrolle mittels FlowJo®

2.4 Quantifizierung der mikrovaskulären Leckage mittels Evans blue-Extravasation

Zur Untersuchung der mikrovaskulären Permeabilität wurde die Extravasation des Farbstoffs Evans blue bei unterschiedlichen Konditionen gemessen. Evans blue ist ein Farbstoff, der fast vollständig an Serumalbumin bindet und sich somit intravasal befindet. Bei einer erhöhten Kapillarpermeabilität tritt mit Evans blue markiertes Serumalbumin in das Gewebe über. Mittels Spektrophotometer kann die Konzentration von Evans blue im Gewebe gemessen werden und die Größenordnung des kapillären Lecks eingestuft werden. Die Messung von Evans blue ist eine etablierte Methode, die in der Forschung bereits seit den 1970er Jahren zur Messung des mikrovaskulären Lecks eingesetzt wird [85-88].

Vorbehandlung

Zur Untersuchung der Größe des kapillären Lecks in Abhängigkeit von LPS- und PTX-Vorbehandlung wurden die CD1wt-Tiere und A_{2a}^{-/-}-Tiere in jeweils 3 Gruppen (n≥6)

eingeteilt. Gruppe 1 wurde mit dem Placebo behandelt. Gruppe 2 bekam als Kontrollgruppe den Placebo i.p. injiziert und inhalierte eine Stunde später LPS. Gruppe 3 wurde PTX 10mg/kg i.p. appliziert und inhalierte ebenfalls eine Stunde später LPS (siehe Abbildung 2-6). Zeitlicher Ablauf des Versuchs siehe Abbildung 2-7.

Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3
Placebo	Placebo	PTX
Placebo	LPS	LPS
Evans blue	Evans blue	Evans blue

Abbildung 2-6: Konditionen der unterschiedlichen Gruppen, je für $A_{2a}^{-/-}$ -Tiere und Wildtyp-Tiere

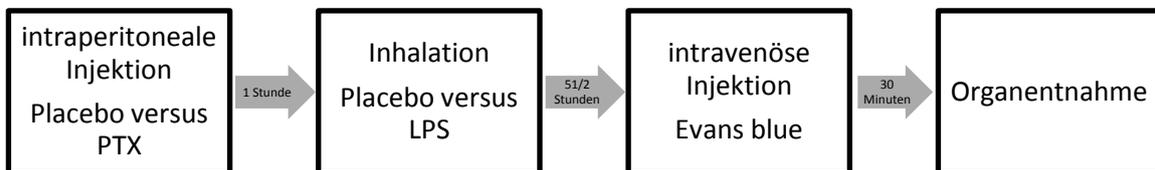


Abbildung 2-7: Chronologie der Vorbehandlung des Evans blue-Extravasationsexperiments

Versuchsdurchführung

5 ½ Stunden nach Beginn der Inhalation wurde der Farbstoff Evans blue in einer Konzentration von 1mg/ml und einer Dosierung von 20mg/kg Körpergewicht über die Schwanzvene injiziert. Die erfolgreiche intravenöse Applikation zeigte sich durch eine unmittelbare Blaufärbung der Pfoten, Ohren und der Schwanzvene. 25 Minuten nach erfolgreicher Evans blue-Injektion wurde mit der Narkose begonnen (s. Migrationsversuch). Nach weiteren 5 Minuten, entsprechend 6 Stunden nach Beginn der LPS-Inhalation, wurde die Blut- und Organentnahme durchgeführt. Hierfür wurde die narkotisierte Maus in Rückenlage bei rekliniertem Kopf mit Kanülen auf dem OP-Tisch fixiert, mit Alkohol (70%) desinfiziert, das Fell abpräpariert und eine Thorakotomie durchgeführt (s. Migrationsversuch). Aus dem schlagenden Herzen wurde 1ml Blut mit einer vorheparinisierten Insulinspritze entnommen, in ein Eppendorf-Cup gefüllt und bis zur Entnahme aller Proben auf Eis gelagert. Die Blutproben wurden abzentrifugiert und vom Plasma-Überstand wurden mindestens 300µl abpipettiert und bei 4°C im Kühlschrank über Nacht gelagert. Nach der Blutentnahme aus dem Herzen wurde die Vena cava inferior infrahepatisch durchtrennt. Durch den schlagenden rechten Ventrikel

wurde das Pulmonalgefäßsystem mit 3ml PBS⁻ perfundiert, die Pulmonalgefäße wurden gespült und die Lungen erschienen makroskopisch weiß. Lunge und Herz wurden en bloc entnommen. Die Lungenlappen wurden vom Herz und von mediastinalen Strukturen separiert. Die Lungen wurden gewogen und mit 350µl PBS⁻/ 100mg Lunge homogenisiert. Das Homogenisat wurde 1:3 mit Formamid versetzt zum Lösen vom Evans blue von Gewebeproteinen und 12 Stunden bei 60° inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Homogenisat bei 5000rpm bei 21°C für 30 Minuten zentrifugiert. Zum Ansetzen der Standard-Lösungen wurde der Rest des am Vortag injizierten Evans blue verwendet und mit PBS⁻ verdünnt, sodass sich eine Standard-Reihe von 0,1; 0,05; 0,025; 0,0125; 0,00625; 0,0 je in [µg/µl] ergab. Auf ein 96well plate wurden von den Standards je 200µl/ well als Triplikate pipettiert. Vom Überstand des Homogenisats nach der Zentrifugation wurden ebenfalls je 200µl/well als Triplikat pipettiert. Das Plasma wurde 1:5 mit PBS⁻ verdünnt und je 200µl/well als Triplikat pipettiert.

Analyse

Die Absorption des Überstandes und des Plasmas wurde bei 620nm und 740nm im Spektrophotometer am Photometer GENios (Tecan, Crailsheim) abgelesen. Die Auswertung erfolgte mit der Software Magellan. Als Ergebnis wird die relative Konzentration von Evans blue im Lungengewebe im Verhältnis zum Plasma in Mikrogramm angegeben.

2.5 Darstellung der PMN und Lungenstruktur mittels Immunhistochemie

Vorbehandlung und Probengewinnung

Die Vorbehandlung erfolgte analog zum Migrationsversuch (s.2.3). Nach Durchtrennung der V. cava inferior wurde das pulmonale Gefäßsystem mittels Injektion von 3ml PBS⁻ in den schlagenden rechten Ventrikel vom Blut freigespült. Nach Intubation wurde eine mit 4% - Paraformaldehyd (PFA) gefüllte 25ml Spritze mit dem Tubus verbunden und über diesen Zugang PFA für 10 Minuten bei 25cm Wasserdruck in die Lungen infundiert. Anschließend wurde das Herz-Lungen-Paket entnommen, die

einzelnen Lungenlappen von mediastinalen Strukturen separiert, in Einbettungskassetten übertragen und für mindestens 24 Stunden in PFA (4%) fixiert.

Anfertigung von histologischen Schnitten

Zur Anfertigung der histologischen Schnitte wurden die in PFA (4%) fixierten Proben in Paraffin überführt. Hierfür wurden die Proben zunächst für 30-60 Minuten in 70% Ethanol entwässert. Im Gewebeeinfiltrationsautomaten (Leica-Jung) wurden die Proben zweimal für je 15 Minuten in Alkohol 96% getaucht, anschließend viermal für je eine Stunde in Alkohol 100%, dann für 80 Minuten in Xylol, für 45 Minuten in frisches Xylol und abschließend zweimal für 45 Minuten in Paraffin und als letztes für 90 Minuten in Paraffin. Am Histoembedder (Leica) wurden die Proben in einen Paraffinblock gegossen. Die Gewebeschnitte wurden am Rotationsmikrotom (Leica) angefertigt. Die Paraffinblöcke wurden auf Eis gekühlt, mittels Mikrotom in 10µm dicke Schnitte geschnitten und mit einem Pinsel in ein 35°C warmes Wasserbad überführt. Nach Übertragung auf einen Objektträger erfolgte die Trocknung auf einer Wärmeplatte bei 37°C für 12 Stunden.

Immunhistologische Färbung

Nach Anfertigung der histologischen Präparate wurden die Präparate mittels der Avidin-Biotin-Technik zum Darstellen der PMNs gefärbt.

Die im Folgenden angegebenen Mengen beziehen sich auf eine Färbung von 8 Objektträgern mit 3 Schnittobjekten pro Träger. Soweit nicht anders angegeben, erfolgte die Versuchsdurchführung bei Raumtemperatur.

Zur Entparaffinierung und Rehydrierung wurden die Präparate für jeweils 5 Minuten je zwei Mal in Xylol, in Ethanol in absteigender Konzentration (100%, 96%, 70%) und in Aqua dest. getaucht. Zur Blockade der endogenen Peroxidase inkubierten die Präparate 30 Minuten in Methanol (200ml) mit Wasserstoffperoxid (3ml, 30%). Nach der Inkubation erfolgte die Spülung in Aqua dest. für 5 Minuten. Die Präparate wurden zur Freilegung der Antigene mit einer Unmasking Solution (320ml A.dest. + 3ml Unmasking Solution) bedeckt, abgedeckt und 20 Minuten bei 600 Watt in der Mikrowelle gekocht. Zur Verhinderung eines Austrocknens der Präparate wurde

regelmäßig Unmasking Solution nachgefüllt. Nach einer Stunde Abkühlen in der Unmasking Solution wurden die Präparate 5 Minuten in PBS⁻ gespült.

Es folgte eine Inkubation mit Avidin, 10%-rabbit-serum und 0,5% fish skin gelatine oil (FSGO) zur Blockade nicht-spezifischer Bindungen. Hierfür wurde nach Einkreisen der Schnittobjekte mit einem Pap Pen auf dem Objektträger pro Objekt 100µl einer Avidin Blocking Solution aufgetragen, bestehend aus 1ml 0,5% FSGO/PBS⁻, 100µl Normal Rabbit Serum NRS (10%) und 4 Tropfen Avidin Blocking Solution. Die Objektträger inkubierten 60 Minuten in der Feuchtkammer.

Nach Absaugen der Avidin Blocking Solution und Spülen in DPBS⁻ für 5 Minuten wurden dem Präparat zur spezifischen Färbung der neutrophilen Granulozyten 100µl Biotin Blocking Solution mit Primär-Antikörper [1µl Primär-Antikörper, Clone 7/4 (1µg/ml) gelöst in 1ml 0,5% FSGO/ PBS⁻, 100µl Normal Rabbit Serum NRS (10%) sowie 4 Tropfen Biotin Blocking Solution] zugegeben. Zur Anfertigung einer IgG-Kontrolle zum Ausschluss unspezifischer Reaktionen wurde jeweils ein Schnitt mit Biotin Blocking Solution mit 1µl Normal IgG Ratte-Primär-Antikörper angefertigt. Als Negativkontrolle wurde ein Schnitt ohne Antikörper angefertigt.

Nach Inkubation des Primär-Antikörpers über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer erfolgte die Spülung in 0,5% FSGO/PBS⁻ für 5 Minuten.

Anschließend wurden pro Objekt 100µl Lösung mit Sekundär-Antikörper (biotinylierter rabbit anti-rat IgG 5g/ml, Vector Laboratories) aufgetragen mit Inkubationsdauer von einer Stunde in der Feuchtkammer. Die Lösung wurde mit 10µl Sekundär-AK aus Vectastain ABC-Kit [Konzentration 15µg/ml], 1ml 0,5% FSGO/PBS⁻ und 100µl NRS angesetzt.

Nach Spülen in 0,5% FSGO/PBS⁻ für 5 Minuten erfolgte die Inkubation mit ABC-Solution für 30 Minuten in einer Feuchtkammer (ABC-Solution: 1ml PBS⁻, 20µl Solution A und 20µl Solution B; aus Kit PK-4000).

Nach der Inkubation mit der ABC-Solution wurde diese abgesaugt und das Präparat in PBS⁻ für 5 Minuten gespült. Es erfolgte das Auftragen von 100µl DAB-Solution pro Objekt (10ml PBS⁻, 1 Tablette DAB) und die Inkubation hiermit für 5 Minuten. Nach Spülen für 5 Minuten in Aqua dest. wurde das Präparat für 15 Sekunden in Hämatoxylin zur Färbung getaucht. Nach erneutem Spülen für 5 Minuten erfolgte die Bläuung für eine Minute in Bluing Agent. Zum Abschluss wurde das Präparat dehydriert durch

Eintauchen für je 2 x 3 Minuten in Ethanol mit aufsteigender Konzentration (70%, 95%, 100%) und 2x Xylol für je 3 Minuten. Den Abschluss bildete das Eindecken der Präparate in Eukitt.

Die Analyse der Präparate erfolgte unter dem Mikroskop Leica DM-IRB (Leica, Wetzlar) mit dem 40x Objektiv bei 64x Vergrößerung. Die Verarbeitung der Fotos erfolgte mit der Software Axiovision.

2.6 Quantifizierung der Zytokine in der BAL mittels enzyme-linked immunosorbent assay ELISA

Prinzip

Der ELISA dient dazu Antigene (z.B. Proteine, Viren, Hormone, Toxine) in einer Probe nachzuweisen und zu quantifizieren. Ein an das zu untersuchende Antigen spezifisch bindender Antikörper wird mit einem Enzym markiert. Das Enzym katalysiert eine quantifizierbare Reaktion, die als Nachweis für das Vorhandensein des Antigens dient.

Bei dem hier durchgeführten Sandwich-ELISA werden zunächst mit Capture-Antikörper beschichtete Platten mit den Proben inkubiert. Anschließend wird ein Detektions-Antikörper zugegeben. Der Detektions-Antikörper ist ebenfalls für das Antigen spezifisch, reagiert aber am Antigen auf eine andere Bindungsstelle als der Capture-Antikörper. Durch Bindung des Detektions-Antikörpers an das Antigen kommt es zum Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex. Nach Entfernen von ungebundenem Antikörper durch Waschen wird das zum Enzym, hier Meerrettichperoxidase, des Detektions-Antikörpers passende Substrat zugefügt, die Reaktion im Sinne eines Farbumschlags nach einer definierten Zeit gestoppt und das Reaktionsprodukt analysiert. Die Proben werden hierbei mit Standardproben bekannter Konzentrationen verglichen und die Menge des Antigens in der Probe ermittelt.

Probengewinnung

Es wurden jeweils vier Gruppen gebildet und die Konditionen Placebo vs. LPS-Inhalation und Placebo vs. PTX-Vorbehandlung bei CD1wt-Tieren und $A_{2a}^{-/-}$ -Tieren miteinander verglichen. Es wurden entweder 10µl/g KG NaCl oder 10mg/g KG PTX

injiziert. Die Negativkontrolle inhalierte Placebo, die Positivkontrolle inhalierte eine Stunde später LPS. Drei Stunden nach der LPS-Inhalation wurden den Tieren 2ml BAL entnommen. Hierzu wurden sie narkotisiert und fixiert (s. Migrationsversuch) und 2ml BAL gewonnen. Die Proben wurden bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gelagert und anschließend zentrifugiert (1300 rpm, 10 Minuten, 4°C).

Es wurden Antikörper zur Detektion und Quantifizierung von CXCL-1 (=keratinocyte-derived chemokine KC), CXCL 2/3 (=macrophage inflammatory proteins 2 MIP-2), TNF- α und IL-6 verwendet.

Versuchsdurchführung

Die hier durchgeführten Versuche wurden als Sandwich-ELISA mit dem ELISA-Kit von R&D Systems (Minneapolis, Minnesota, USA) nach Herstellerangaben durchgeführt.

Im ersten Schritt erfolgte die Inkubation einer 96-Transwellplatte mit 100 μ l einer Lösung mit einer Capture-Antikörper-Konzentration von 2 μ g/ml bei Raumtemperatur über Nacht. Nach drei Waschdurchgängen mit Waschpuffer mit je 400 μ l pro Well und anschließendem Entfernen möglicher Überreste des Waschpuffers erfolgte das Blocken der Platten durch Zufügen von 300 μ l von Reagent Diluent pro Well zur Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend wurde jedes Well erneut dreimal mit Waschpuffer gewaschen.

Es wurden nun Triplikate von je 100 μ l der Proben und der Standardproben pipettiert und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden pro Well 100 μ l biotinylierter Antikörper zugegeben und für zwei Stunden inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit Waschpuffer wurden pro Well 100 μ l Streptavidin-HRP zugegeben. Die abgedeckte Platte inkubierte für 20 Minuten bei Raumtemperatur. Es folgte ein erneuter Waschgang. Durch Zugabe der Substrat-Solution aus Wasserstoffperoxid und Tetramethylbenzidin wurde die Farbreaktion gestartet. Die Substrat-Solution inkubierte für 20 Minuten. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 μ l Stop Solution gestoppt. Die photometrische Analyse der Platte erfolgte bei 450nm und 540nm Wellenlänge.

2.7 Erstellung von Blutbildern

Zum Vergleich der PMN-Zahlen von $A_{2a}^{-/-}$ - und CD1wt- Tieren wurden Nativ-Blutbilder erstellt. Zur Anfertigung der Blutausstriche wurde mit einer Kanüle die V. caudalis mediana inzidiert und das austretende Blut mit einer Pipette entnommen. Es wurden 10 μ l Blut mit 90 μ l Türk'scher Lösung vermischt, davon 10 μ l auf eine Zählkammer (C-Chip) aufgetragen und die Leukozyten zur Bestimmung der Gesamtzellzahl ausgezählt. Dadurch wurde die Anzahl der Leukozyten pro ml Blut ermittelt. Für die Blutausstriche wurde ein Tropfen Blut am Ende eines unbeschichteten Objektträgers aufgetragen und verstrichen. Anschließend wurden die Ausstriche 30 Minuten bei Raumtemperatur luftgetrocknet und anschließend mit dem Färbekit Diff-Quick (Medion Diagnostics, Düdingen, Schweiz) entsprechend der Angaben gefärbt. Unter dem Mikroskop (Leica DMIL, Leica Wetzlar) wurden die Blutausstriche zur Differenzierung der Leukozyten bis zu einer Zellzahl von 100 ausgezählt.

2.8 Statistische Analyse

Die statistische Analyse wurde mit GraphPad Prism 5.3 für Windows (Graphpad Software, San Diego, CA, USA) durchgeführt. Es wurden der ONE Way ANOVA und Bonferroni post hoc Test angewendet. Für die Blutbilder wurde der unpaired t-test verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Quantifizierung der PMN-Migration in die Lungenkompartimente mittels Transmigrationsassay in vivo und Durchflusszytometrie FACS

Im Migrationsversuch in vivo wurden die PMN-Konzentrationen intravaskulär, im pulmonalen Interstitium und intraalveolär mittels Durchflusszytometrie gemessen und der Einfluss von LPS-Stimulation und PTX – Vorbehandlung bei CD1wt- und $A_{2a}^{-/-}$ -Tieren auf die PMN-Konzentration im jeweiligen Kompartiment analysiert.

Bei den Wildtyp-Tieren ohne LPS-induzierte Inflammation ergab sich in keinem der drei Kompartimente (intravaskulär, interstitiell und intraalveolär) ein signifikanter Unterschied in der PMN-Konzentration zwischen den Gruppen mit PTX- gegenüber Placebo-Vorbehandlung (intravaskulär PTX: $1,94 \pm 1,78 \times 10^6$ versus NaCl: $2,08 \pm 1,34 \times 10^6$; interstitiell PTX: $1,39 \pm 0,31 \times 10^6$ versus NaCl $1,11 \pm 0,29 \times 10^6$; intraalveolär PTX $0,59 \pm 0,49 \times 10^6$ versus NaCl $0,79 \pm 0,26 \times 10^6$; $P < 0,05$) (siehe Abbildung 3-1).

Eine durch LPS induzierte Entzündung führte sowohl bei der Kontrollgruppe mit NaCl als auch bei der mit PTX vorbehandelten Gruppe zu einer signifikanten Steigerung der PMN-Anzahl interstitiell und intraalveolär im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne LPS-Inhalation (interstitiell Kontrollgruppe NaCl $1,11 \pm 0,29 \times 10^6$ versus NaCl + LPS $6,67 \pm 0,54 \times 10^6$ und PTX + LPS $5,63 \pm 0,9 \times 10^6$; intraalveolär Kontrollgruppe NaCl $0,79 \pm 0,26 \times 10^6$ versus PTX + LPS $0,94 \pm 0,31 \times 10^6$ und NaCl + LPS $1,57 \pm 0,36 \times 10^6$; $P < 0,05$) (siehe Abbildung 3-1).

Bei LPS-induzierter Inflammation zeigte sich intravaskulär kein signifikanter Unterschied bei PTX- oder NaCl-Vorbehandlung (intravaskulär PTX + LPS: $2,17 \pm 0,75 \times 10^6$ versus NaCl + LPS $2,95 \pm 2,64 \times 10^6$; $P < 0,05$). Interstitiell und intraalveolär führte die Vorbehandlung mit PTX zu einer signifikanten Reduktion der PMN im Vergleich zu NaCl (interstitiell PTX + LPS $5,63 \pm 0,9 \times 10^6$ versus NaCl + LPS $6,67 \pm 0,54 \times 10^6$; intraalveolär PTX + LPS $0,94 \pm 0,31 \times 10^6$ versus NaCl + LPS $1,57 \pm 0,36 \times 10^6$; $P < 0,05$) (siehe Abbildung 3-1).

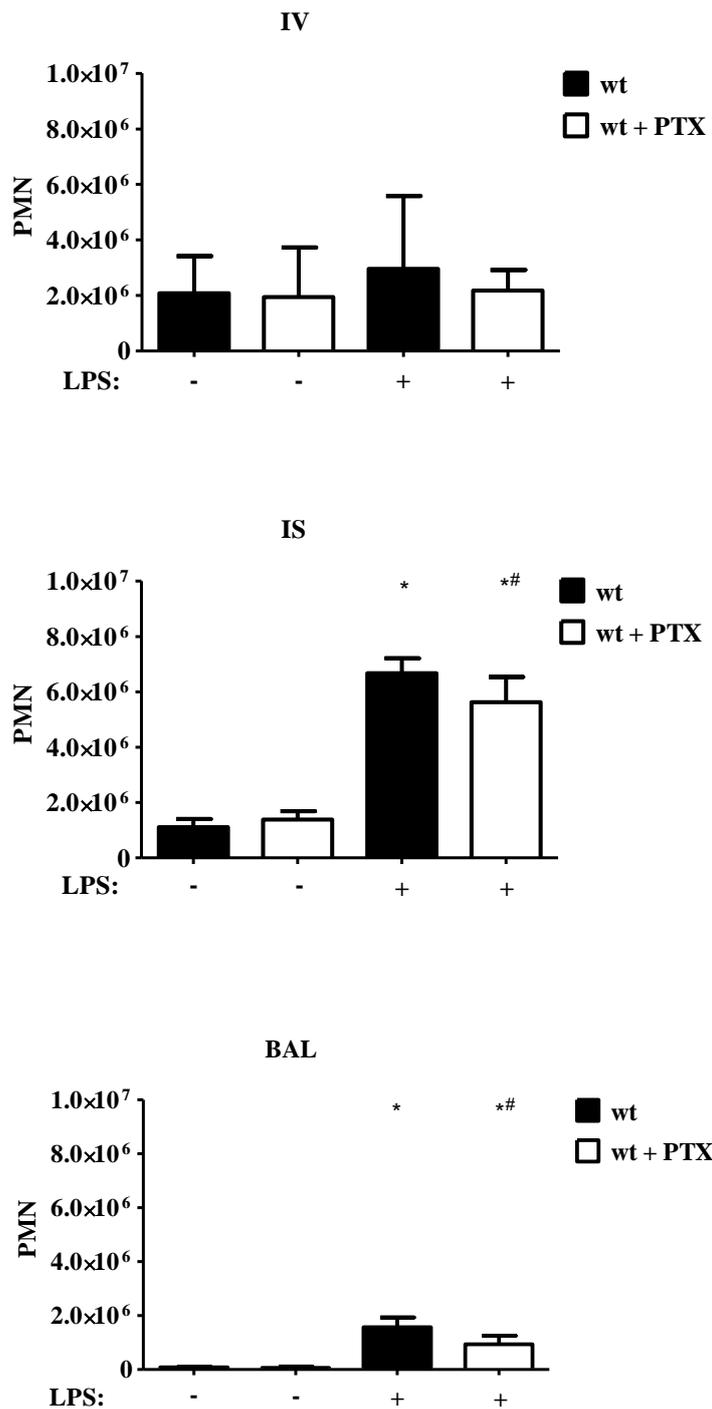


Abbildung 3-1: Effekt von PTX auf die PMN-Migration im Transmigrationsassay in CD1wt-Tieren [52]

IV: intravaskulär, IS: interstitiell, BAL: bronchoalveoläre Lavage. Angabe des Mittelwerts \pm Standardabweichung, n=8, *P < 0,05 versus Kontrollgruppe ohne LPS-Inhalation, #P < 0,05 versus Kontrollgruppe mit LPS-Inhalation.

Zur Untersuchung eines Einflusses von PTX bei $A_{2a}^{-/-}$ -Tieren auf die PMN-Migration wurde der Migrationsversuch ebenfalls mit und ohne Induktion einer pulmonalen Inflammation durch LPS-Inhalation durchgeführt.

Ohne LPS-Inhalation zeigten die $A_{2a}^{-/-}$ -Tiere niedrige PMN-Anzahlen (intravaskulär NaCl: $0,59 \pm 0,23 \times 10^6$ versus PTX $0,06 \pm 0,39 \times 10^6$, interstitiell NaCl: $0,38 \pm 0,23 \times 10^6$ versus PTX: $0,04 \pm 0,03 \times 10^6$, intraalveolär NaCl: $0,07 \pm 0,03 \times 10^6$ versus PTX $0,007 \pm 0,04 \times 10^6$; $P < 0,05$) (siehe Abbildung 3-2).

Nach LPS-Inhalation stiegen die PMN-Anzahlen in allen drei Lungenkompartimenten sowohl in der NaCl-Gruppe als auch in der PTX-Gruppe im Vergleich zur Negativkontrolle signifikant an (intravaskulär NaCl + LPS $2,76 \pm 0,74 \times 10^6$, interstitiell NaCl + LPS $5,81 \pm 1,06 \times 10^6$, intraalveolär NaCl + LPS $1,92 \pm 0,95 \times 10^6$; $P < 0,05$) (siehe Abbildung 3-2).

Eine Vorbehandlung mit PTX vor LPS-Inhalation zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die PMN-Migration im Vergleich zu NaCl + LPS (intravaskulär PTX + LPS $2,33 \pm 0,54 \times 10^6$, interstitiell PTX + LPS $7,23 \pm 1,27 \times 10^6$, intraalveolär PTX + LPS $2,1 \pm 0,31 \times 10^6$; $P < 0,05$) (siehe Abbildung 3-2).

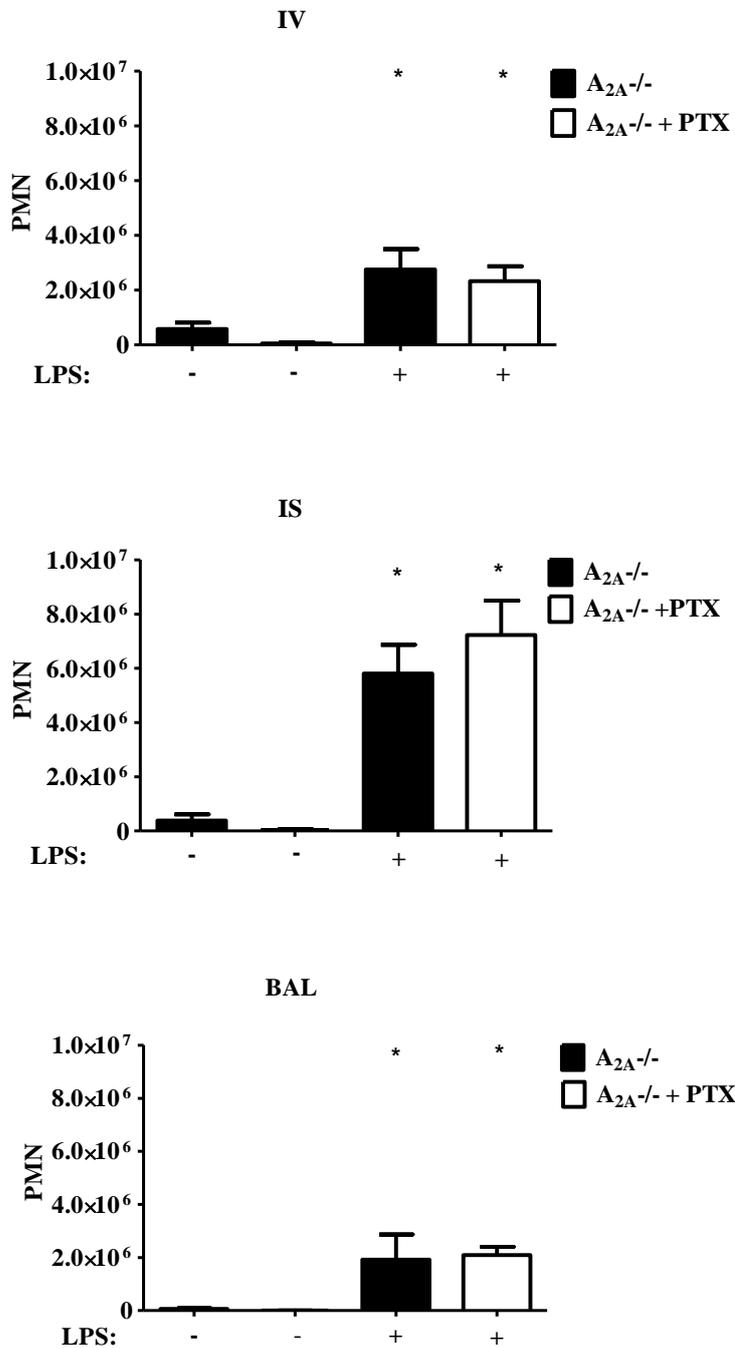


Abbildung 3-2: Effekt von PTX auf die PMN-Migration im Transmigrationsassay in $A_{2A}^{-/-}$ -Tieren [52]

IV: intravaskulär, IS: interstitiell, BAL: bronchoalveoläre Lavage. Angabe des Mittelwerts \pm Standardabweichung, $n=6$, * $P < 0,05$ versus Kontrollgruppe ohne LPS-Inhalation, # $P < 0,05$ versus Kontrollgruppe mit LPS-Inhalation.

Zur weiteren Untersuchung der Abhängigkeit der PTX-Wirkung vom A_{2a}-Rezeptor wurde der Migrationsversuch an Wildtyp-Tieren mit Blockade des Rezeptors durch einen spezifischen A_{2a}-Rezeptor-Antagonisten (ZM 241385) bzw. mittels Stimulation durch einen spezifischen A_{2a}-Rezeptor-Agonisten (CGS 21680) durchgeführt. Es wurde jeweils mit und ohne Induktion einer pulmonalen Inflammation durch LPS-Inhalation getestet. Bei Vorbehandlung mit dem A_{2a}-Rezeptor - Antagonisten verlor PTX seine Wirkung auf die PMN Migration in allen 3 Kompartimenten.

Die Vorbehandlung mit dem Antagonisten bzw. Agonisten führte zu keinem Unterschied bezüglich der PMN-Zahlen intravaskulär, interstitiell und in der BAL (intravaskulär Antagonist: $1,08 \pm 1,1 \times 10^6$ versus Agonist: $0,94 \pm 0,31 \times 10^6$; interstitiell Antagonist: $68,22 \pm 49,9$ versus Agonist: $81,72 \pm 54,84$; intraalveolär Antagonist: $221,8 \pm 432,2$ versus Agonist: $237,2 \pm 470,5$; $P < 0,05$) (siehe Abbildung 3-3).

Nach Induktion einer pulmonalen Inflammation durch LPS-Inhalation zeigten sich bei Vorbehandlung mit dem A_{2a}-Rezeptor-Antagonisten im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne LPS-Inhalation im Interstitium und im Alveolarraum signifikant erhöhte PMN-Zahlen (Vorbehandlung mit A_{2a}-Rezeptor-Antagonist + LPS: intravaskulär $1,72 \pm 1,18 \times 10^6$, interstitiell $5,46 \pm 2,21 \times 10^6$, intraalveolär $1,97 \pm 0,64 \times 10^6$; $P < 0,05$), während es bei Vorbehandlung mit dem Agonisten nur im Interstitium zu einer signifikanten Erhöhung kam (Vorbehandlung mit A_{2a}-Rezeptor- Agonist + LPS: intravaskulär $2,57 \pm 0,71 \times 10^6$, interstitiell $6,45 \pm 1,67 \times 10^6$, intraalveolär $0,79 \pm 0,26 \times 10^6$; $P < 0,05$) (siehe Abbildung 3-3).

Bei Vorbehandlung mit dem A_{2a}-Rezeptor- Antagonisten bzw. -Agonisten und PTX-Gabe vor LPS-Inhalation kam es bei dem Antagonisten im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne LPS-Inhalation oder PTX-Gabe zu einem signifikanten Anstieg der PMNs interstitiell und intraalveolär, während es beim Agonisten zu einer signifikanten Erhöhung im Interstitium kam (intravaskulär Antagonist + PTX + LPS: $2,38 \pm 1,41 \times 10^6$ versus Agonist + PTX + LPS: $1,03 \pm 0,31 \times 10^6$, interstitiell Antagonist + PTX + LPS: $5,64 \pm 1,51 \times 10^6$ versus Agonist + PTX + LPS: $3,1 \pm 0,46 \times 10^6$, intraalveolär Antagonist + PTX + LPS: $2,28 \pm 1,01 \times 10^6$ versus Agonist + PTX + LPS: $0,84 \pm 0,13 \times 10^6$; $P < 0,05$) (siehe Abbildung 3-3).

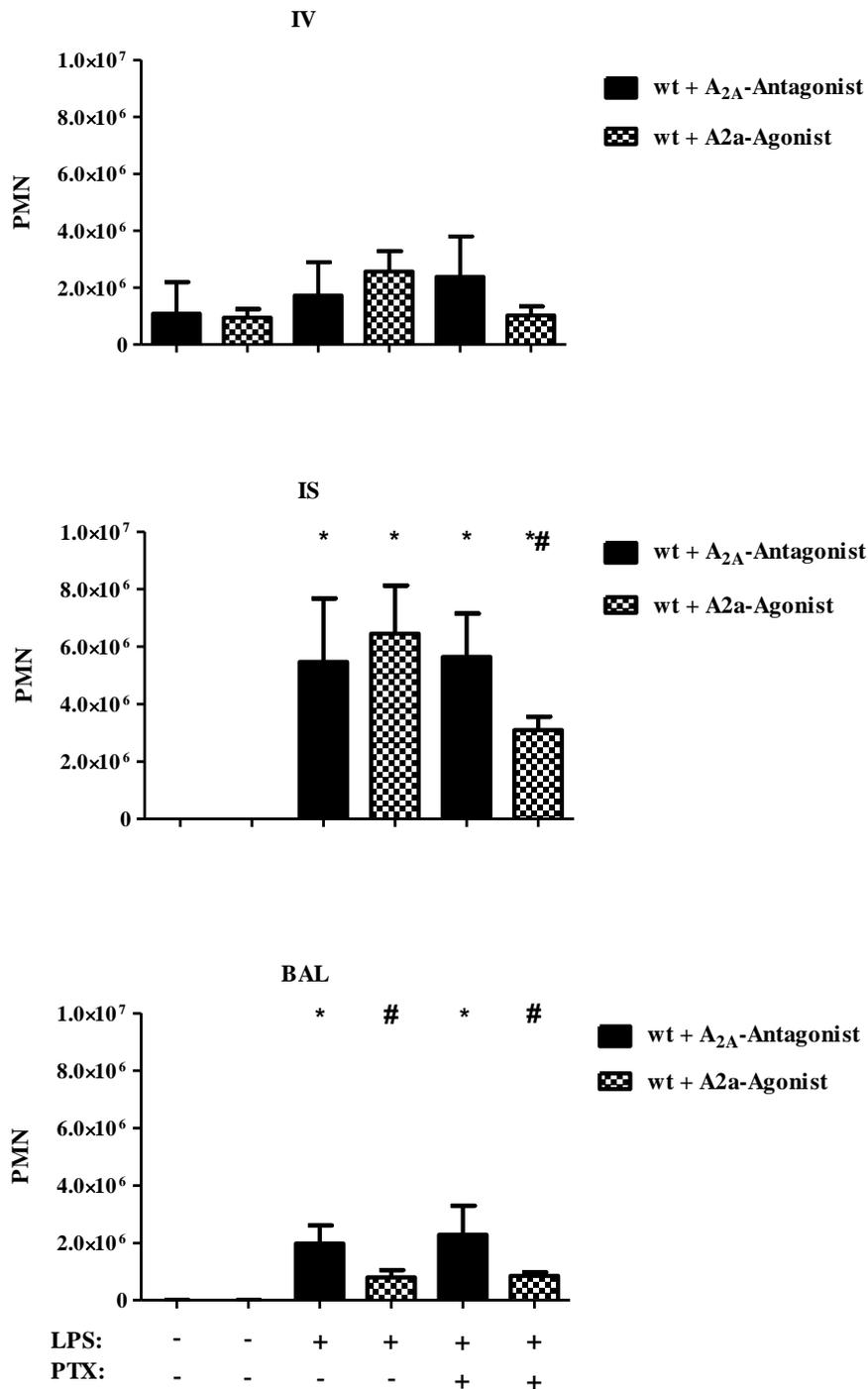


Abbildung 3-3: Effekt von PTX auf die PMN-Migration nach A_{2a} -Rezeptor-Blockade (A_{2a} -Rezeptor-Antagonist ZM241385) bzw. -Stimulation (A_{2a} -Rezeptor-Agonist CGS 21680) [52] CD1wt-Tiere. IV: intravaskulär, IS: interstitiell, BAL: bronchoalveoläre Lavage. Angabe des Mittelwerts \pm Standardabweichung, n=4, *P < 0,05 versus Kontrollgruppe ohne LPS-Inhalation, #P < 0,05 versus Gruppe mit Vorbehandlung mit dem A_{2a} -Rezeptor-Antagonisten und LPS-Inhalation.

Zur Untersuchung eines protektiven PTX-Effekts bei Applikation von PTX nach Administration von LPS wurde der Migrationsassay in vivo an Wildtyp-Tieren mit zeitversetzter Gabe von PTX durchgeführt. PTX wurde hierbei gleichzeitig zu Beginn sowie eine und drei Stunden nach Beginn der LPS-Inhalation appliziert (0', 1', 3'). Intravaskulär und intraalveolär zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der PMN-Konzentration zu unterschiedlichen Zeitpunkten (intravaskulär 0' PTX: $1,18 \pm 0,58 \times 10^6$ versus 1' PTX: $0,83 \pm 0,33 \times 10^6$ versus 3' PTX: $0,76 \pm 0,3 \times 10^6$; intraalveolär 0' PTX: $0,89 \pm 0,27 \times 10^6$ versus 1' PTX: $1,14 \pm 0,24 \times 10^6$ versus 3' PTX: $0,99 \pm 0,21 \times 10^6$; $P < 0,05$). Interstitiell kam es bei PTX-Gabe nach 3 Stunden zu einer signifikant geringeren PMN-Konzentration im Vergleich zur PTX-Gabe bei 0 und 1 Stunde nach LPS-Inhalation (interstitiell 0' PTX: $5,46 \pm 0,84 \times 10^6$ versus 1' PTX: $5,35 \pm 2,12 \times 10^6$ versus 3' PTX: $3,44 \pm 0,67 \times 10^6$; $P < 0,05$) (siehe Abbildung 3-4).

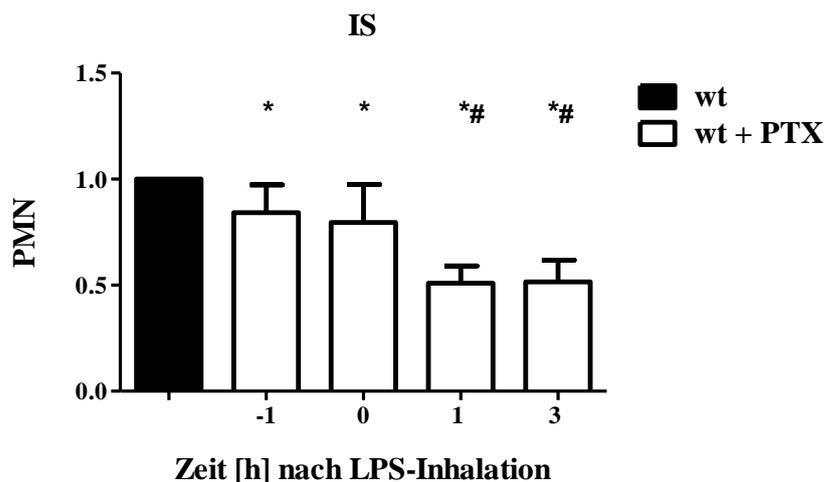


Abbildung 3-4: Effekt von PTX auf die PMN-Migration bei Variation des Applikationszeitpunkts vor und nach der LPS-Inhalation [52]

CD1wt-Tiere. IS: interstitiell, Angabe des Mittelwerts mit einer Standardabweichung, $n=4$, * $P < 0,05$ versus Kontrollgruppe ohne PTX, # $P < 0,05$ versus Gruppe PTX + LPS eine Stunde vor LPS-Inhalation.

3.2 Quantifizierung der mikrovaskulären Leckage mittels Evans blue-Extravasation

Zur Untersuchung des mikrovaskulären Lecks in Abhängigkeit von LPS-Inhalation und PTX-Behandlung wurde der relative Evans blue-Gehalt extravasal gemessen. Nach Inhalation von LPS kam es zu einer erhöhten Durchlässigkeit des Lungenendothels mit signifikantem Anstieg der extravaskulären Evans blue-Konzentration bei Wildtyp- und Knock out-Tieren (Wildtyp ohne LPS + NaCl: $59,27 \pm 9,79 \mu\text{g EB/g Lunge}$ versus mit LPS + NaCl: $78,51 \pm 11,35 \mu\text{g EB/g Lunge}$ versus PTX + LPS: $57,48 \pm 12,19 \mu\text{g EB/g Lunge}$; $A_{2a}^{-/-}$ ohne LPS + NaCl: $44,60 \pm 23,55 \mu\text{g EB/g Lunge}$ versus mit LPS + NaCl: $89,46 \pm 37,16 \mu\text{g EB/g Lunge}$ versus PTX + LPS: $84,40 \pm 29,24 \mu\text{g EB/g Lunge}$; $P < 0,05$) (siehe Abbildung 3-5).

Bei mit PTX vorbehandelten Wildtyp-Tieren im Vergleich zu mit NaCl injizierten Tieren kam es nach LPS-Inhalation zu einer signifikanten Reduktion des extravasalen Evans blue Gehalts, während es bei den $A_{2a}^{-/-}$ -Tieren keinen signifikanten Unterschied in der extravasalen Evans blue Konzentration zwischen der PTX- und der NaCl-Gruppe gab.

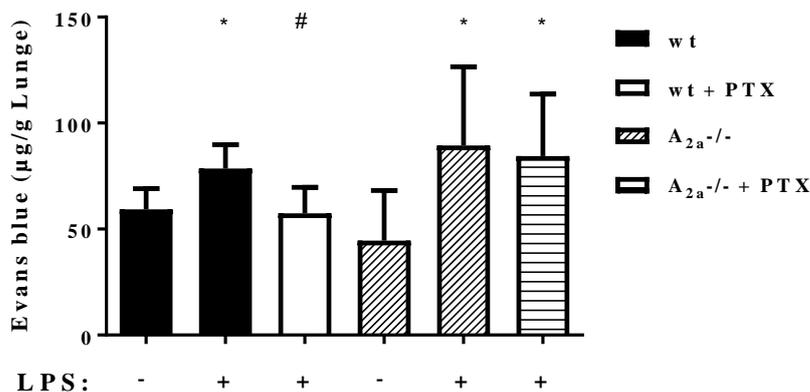


Abbildung 3-5: Effekt von PTX auf die mikrovaskuläre Permeabilität [52]

CD1wt-Tiere versus $A_{2a}^{-/-}$ -Tiere. Angabe des Mittelwerts mit einer Standardabweichung. $n \geq 6$. * $P < 0,05$ versus Kontrollgruppe ohne LPS-Inhalation. # $P < 0,05$ versus Kontrollgruppe + PTX + LPS.

Lungenpräparate von Wildtyp-Tieren im Rahmen des Evans blue-Versuchs

Zur Illustrierung der makroskopisch sichtbaren Unterschiede bei Wildtyp-Tieren sind eine gesunde Lunge, eine Lunge mit LPS-Stimulation und eine Lunge mit PTX-Vorbehandlung vor LPS-Stimulation abgebildet. Die linke Lunge ist eine gesunde Lunge ohne LPS-Stimulation. Die Lunge stellt sich rosig-weiß intakt dar. Die mittlere Lunge mit LPS-Stimulation weist eine ausgeprägte Blaufärbung mit multiplen bläulichen Einfärbungen an der Lungenoberfläche auf. Die rechte Lunge mit PTX + LPS weist weniger und kleinere Blaufärbungen auf (siehe Abbildung 3-6).

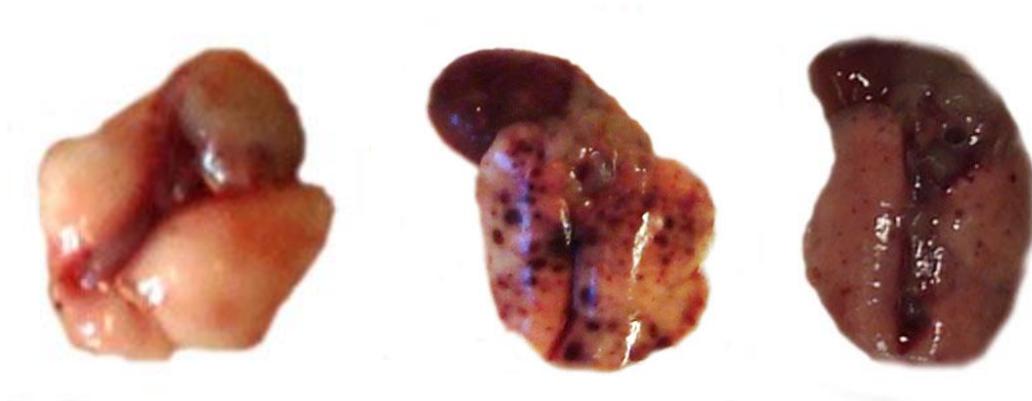


Abbildung 3-6: Effekt von PTX auf die makroskopische Darstellung von Herz-Lungenpräparaten im Rahmen der Bestimmung der mikrovaskulären Permeabilitätssteigerung.
CD1wt-Tiere. Präparate repräsentativ für $n \geq 6$. Links: Nativ. Mitte: - PTX, + LPS. Rechts: + PTX + LPS.

3.3 Immunhistochemische Darstellung der PMN und der Lungenstruktur

Zur Untersuchung des Einflusses von PTX und LPS-Inhalation auf den strukturellen Lungenaufbau und zur mikroskopischen Darstellung der PMN-Migration wurden Präparate von Wildtyp- und $A_{2a}^{-/-}$ -Tieren immunhistochemisch behandelt und analysiert. Die gezeigten Schnitte sind repräsentativ für n=4 Tiere pro Kondition. Mittels Immunhistochemie wurden die PMN bräunlich angefärbt. Es wurden histologische Schnitte hergestellt von CD1wt- und $A_{2a}^{-/-}$ -Tieren.

Bei den Negativkontrollen ohne LPS-Inhalation zeigten sich sowohl bei den Wildtyp- als auch bei den $A_{2a}^{-/-}$ -Tieren eine gleichmäßige Ansammlung von PMN, intakte Alveolenwände und ein scharf begrenztes, schmales Interstitium. Nach LPS-Inhalation trat in Wildtyp- und $A_{2a}^{-/-}$ -Tieren ein interstitielles Ödem mit vermehrtem Nachweis von PMN interstitiell und intraalveolär auf. Bei $A_{2a}^{-/-}$ -Tieren zeigte sich unter LPS-Stimulation kein Unterschied bezüglich der quantitativen PMN-Migration oder des Ausmaßes eines alveolären Schadens zwischen der PTX-behandelten und der Placebogruppe, während bei den Wildtyp-Tieren unter PTX-Vorbehandlung weniger PMN interstitiell und intraalveolär nachweisbar waren und sich der alveoläre Schaden im Vergleich zur Placebogruppe reduzierte (siehe Abbildung 3-7).

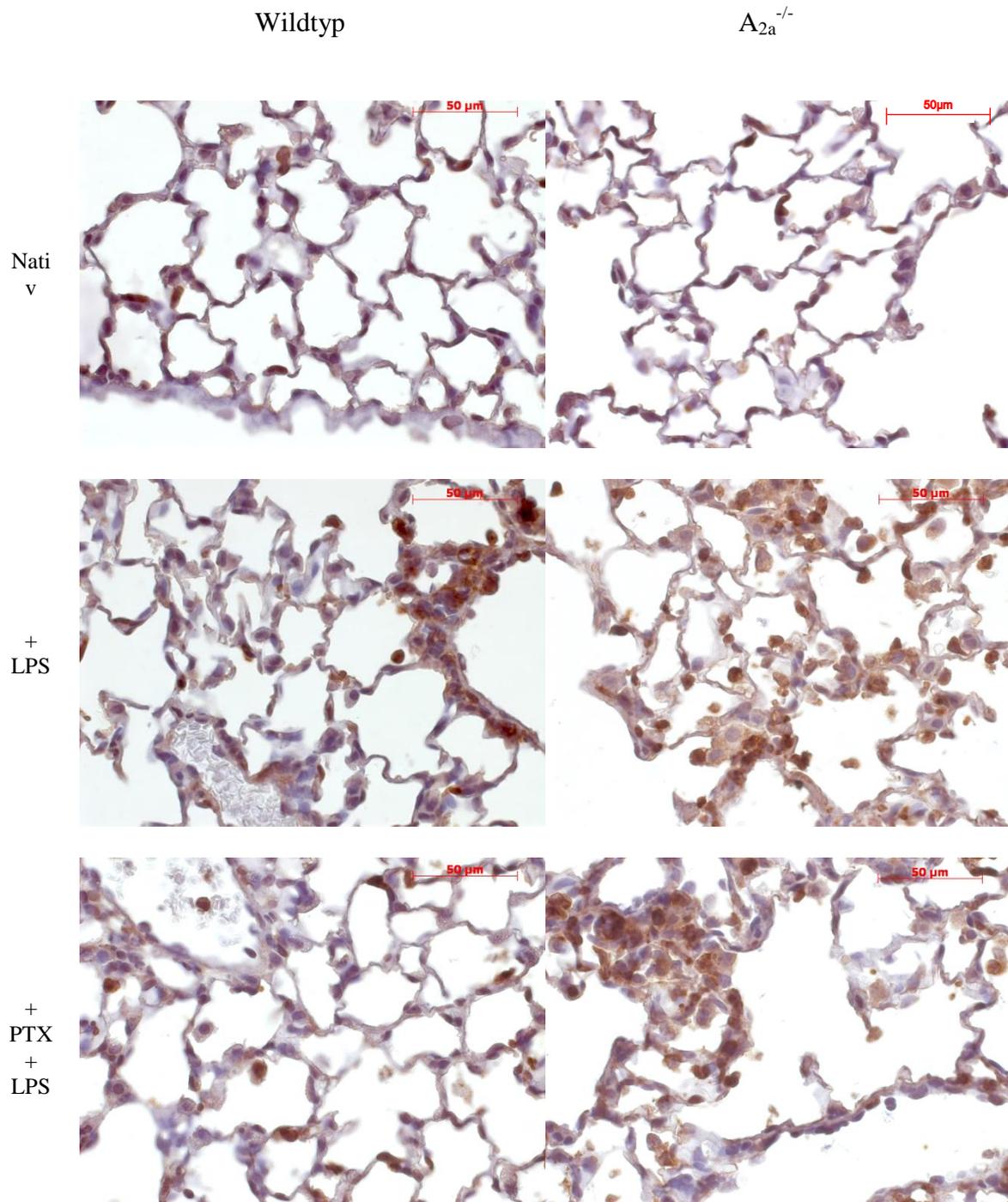


Abbildung 3-7: Immunhistochemische Färbung zur Darstellung der PMN-Migration in die Lungenkompartimente [52]

Gegenüberstellung von Wildtyp- und $A_{2a}^{-/-}$ -Tieren, mit und ohne PTX, 24 Stunden nach LPS-Inhalation. Anfärbung der neutrophilen Granulozyten mittels „rat anti-mouse neutrophils“ Clone 7/4; PMN erscheinen braun. Vergrößerung: 40-fach. Die Abbildungen sind repräsentativ für n=4.

3.4 Quantifizierung der Zytokine in der BAL mittels ELISA

Die Inhalation von LPS führt zu pulmonaler Inflammation und Anstieg der proinflammatorischen Zytokine. Mit Hilfe eines Sandwich-ELISA wurden die Konzentrationen von TNF- α , CXCL-1, -2/3 und IL-6 in CD1wt- und $A_{2a}^{-/-}$ -Tieren bestimmt. Es wurden Proben mit und ohne LPS-Stimulation und mit und ohne PTX-Vorbehandlung miteinander verglichen.

In den Proben ohne LPS-Stimulation war eine geringe Menge an Zytokinen nachweisbar ohne signifikanten Unterschied zwischen der Placebo- und der PTX-Gruppe. Die LPS-Inhalation induzierte einen signifikanten Anstieg aller gemessenen Zytokine in der BAL. Die Vorbehandlung mit PTX vor der LPS-Inhalation reduzierte signifikant den Anstieg der Zytokine TNF- α , IL-6 und CXCL-2/3.

(CD1wt NaCl ohne LPS: TNF- α 0, CXCL-1 $8,3 \pm 23,6$ pg/ml, IL-6 $19,9 \pm 151,7$ pg/ml, CXCL-2/3 $35,4 \pm 151,6$ pg/ml versus PTX ohne LPS: TNF- α 0, CXCL-1 $7,9 \pm 26,2$ pg/ml, IL-6 $16,3 \pm 178,8$, CXCL-2/3 $15,5 \pm 179,8$; CD1wt NaCl + LPS: TNF- α 22738 ± 15736 pg/ml, CXCL-1 11127 ± 3760 pg/ml, IL-6 14202 ± 11856 pg/ml, CXCL-2/3 15461 ± 10461 pg/ml versus PTX + LPS: TNF- α 8522 ± 7978 pg/ml, CXCL-1 11123 ± 2711 pg/ml, IL-6 5867 ± 6900 pg/ml; $P < 0,05$) (siehe Abbildung 3-8).

Bei den $A_{2a}^{-/-}$ -Tieren bestand ohne LPS-Inhalation, wie bei den Wildtyp-Tieren, kein signifikanter Unterschied in der Zytokinkonzentration zwischen der Placebo- und der PTX-Gruppe. Die LPS-Inhalation induzierte auch bei $A_{2a}^{-/-}$ -Tieren einen signifikanten Anstieg der gemessenen Zytokine. Im Gegensatz zu den Wildtyp-Tieren führte die Vorbehandlung mit PTX bei $A_{2a}^{-/-}$ -Tieren jedoch zu keiner Reduktion der Zytokine ($A_{2a}^{-/-}$ -Tiere: NaCl ohne LPS: TNF- α 0, CXCL-1 $78,5 \pm 35,5$ pg/ml, IL-6 $21,9 \pm 22,4$ pg/ml, CXCL-2/3 $92,5 \pm 114,3$ pg/ml versus PTX ohne LPS: TNF- α 0, CXCL-1 $76,2 \pm 49,1$ pg/ml, IL-6 $7,1 \pm 10,1$ pg/ml, CXCL-2/3 $77,1 \pm 84,5$ pg/ml; $A_{2a}^{-/-}$ -Tiere: NaCl + LPS: TNF- α 2189 ± 539 pg/ml, CXCL-1 3932 ± 371 pg/ml, IL-6 250 ± 122 pg/ml, CXCL-2/3 4168 ± 738 pg/ml versus PTX + LPS: TNF- α 2179 ± 1038 pg/ml, CXCL-1 4475 ± 429 pg/ml, IL-6 327 ± 126 pg/ml, CXCL-2/3 4286 ± 415 pg/ml; $P < 0,05$) (siehe Abbildung 3-9).

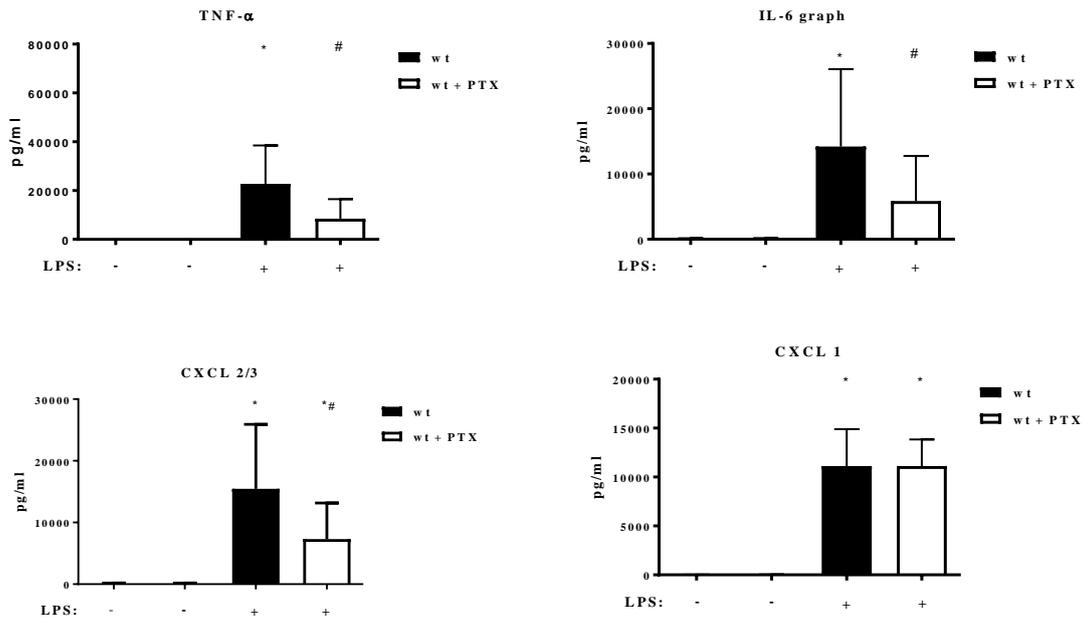


Abbildung 3-8: Effekt von PTX auf die Zytokinkonzentration in der BAL von CD1 wt-Tieren [52]
 BAL = bronchoalveoläre Lavage. Angabe des Mittelwerts mit einer Standardabweichung. *P < 0,05 versus Kontrollgruppe ohne LPS-Inhalation, #P < 0,05 versus Kontrollgruppe ohne PTX-Vorbehandlung, n=6.

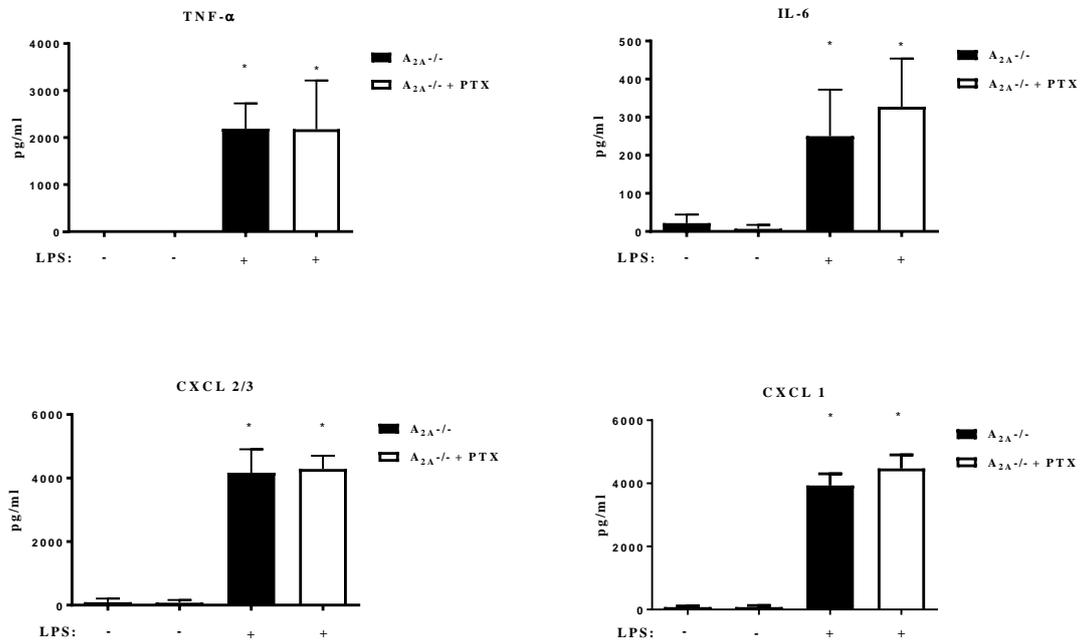


Abbildung 3-9: Effekt von PTX auf die Zytokinkonzentration in der BAL von $A_{2a}^{-/-}$ -Tieren [52]
 BAL = bronchoalveoläre Lavage. Angabe des Mittelwerts mit einer Standardabweichung. *P < 0,05 versus Kontrollgruppe ohne LPS-Inhalation, #P < 0,05 versus Kontrollgruppe ohne PTX-Vorbehandlung, n=6.

3.5 Blutbilder

Zur Darstellung der PMN-Konzentration wurden Blutbilder nativ von $A_{2a}^{-/-}$ -Tieren und CD1wt-Tieren angefertigt. Hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied (siehe Tabelle 3-1).

	$A_{2a}^{-/-}$ ($\times 10^6$)	CD1wt ($\times 10^6$)	P	Signifikanz
PMN stabkernig	$0,2 \pm 0,02$	$0,07 \pm 0,006$	0,16	ns
PMN segmentkernig	$1,7 \pm 1,5$	$0,3 \pm 0,1$	0,1	ns

Tabelle 3-1 Vergleich der PMN im Nativblutbild von $A_{2a}^{-/-}$ - und Wildtyp-Tieren

Bezogen auf eine Gesamtzellzahl pro ml. Angegeben sind Mittelwerte mit einer Standardabweichung, n=4, ns = nicht signifikant, $P < 0,05$

4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit untersuchte in einem Mausmodell einen anti-inflammatorischen Effekt von PTX nach Induktion einer pulmonalen Entzündung mittels Inhalation von LPS und die Abhängigkeit dieses Effekts vom Adenosinrezeptor A_{2a} . Als Messwerte wurden die quantifizierbare PMN-Migration in die Lungenkompartimente, das Ausmaß der mikrovaskulären Permeabilitätssteigerung, die Auswirkung auf die Zytokinkonzentration in der BAL und Änderungen im Aufbau der Lungenstruktur verwendet.

Der Beitrag von PMN zur Pathogenese von ARDS ist Gegenstand intensiver Forschung. Die PMN-Migration in die Lungenkompartimente spielt eine große Rolle bei der Entstehung und Entwicklung von ARDS [12, 40]. Eine reduzierte PMN-Migration führt zu einer Abschwächung der Lungenläsion [24]. Wildtyp- und $A_{2a}^{-/-}$ -Tiere weisen sowohl in der Literatur als auch in dieser Studie keine Unterschiede in der peripheren PMN-Zahl auf [51]. Es konnte in dieser Doktorarbeit anhand eines Tiermodells gezeigt werden, dass bei Wildtyp- und $A_{2a}^{-/-}$ -Tieren durch LPS-Inhalation eine signifikante PMN-Migration in das Interstitium und in den Alveolarraum induziert werden kann. Auch in der Literatur ist dies beschrieben, zudem sind nach LPS-Inhalation nach 1-2 Stunden pulmonal endo- und epithelial vermehrt PMN nachweisbar mit Darstellung eines Plateaus der endothelialen PMN nach 12-24 Stunden und einem Peak der epithelialen PMN bei 24 Stunden [21]. Entsprechend erfolgte die Organentnahme in dem hier angewandten Tiermodell 24 Stunden nach LPS-Inhalation.

Der G_s -Protein-gekoppelte A_{2a} -Rezeptor bewirkt eine Aktivierung der Adenylylcyclase mit Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels. Über seine Expression auf Immunzellen wirkt er anti-inflammatorisch und immun-modulatorisch [53]. Durch die Existenz spezifischer A_{2a} -Rezeptor-Antagonisten und -Agonisten und seine immun-modulatorischen Eigenschaften stellt der A_{2a} -Rezeptor einen interessanten Ansatzpunkt dar für unterschiedlichste Studienmodelle.

Im Rahmen des ARDS gehören die Zunahme der mikrovaskulären Permeabilität mit Entwicklung eines pulmonalen Ödems und die übermäßige Migration und Aktivierung

von PMN in die Lungenkompartimente zu wichtigen Pathomechanismen. Insofern ist die Auswirkung einer Modulation des A_{2a} -Rezeptors auf PMN-Migration und vasoendotheliale Integrität von Relevanz. Reutershan^{et al} 2007 wiesen im Mausmodell an Wildtyp- und $A_{2a}^{-/-}$ -Tieren nach, dass die Aktivierung des A_{2a} -Rezeptors mit dem spezifischen A_{2a} -Rezeptor-Agonisten ATL 202 vor Induktion einer pulmonalen Inflammation durch LPS-Inhalation zu einer Verminderung der PMN - Migration in die Lungenkompartimente und zu einer Abschwächung der mikrovaskulären Permeabilitätssteigerung führt [51].

Das Xanthin-Derivat PTX wirkt über eine nicht-selektive Phosphodiesterase-Inhibition. PTX ist aufgrund seiner positiven Beeinflussung der Rheologie seit Jahrzehnten für die Therapie von intermittierender Claudicatio zugelassen. Derzeit stehen seine anti-inflammatorischen und anti-oxidativen Eigenschaften vermehrt im Fokus der Forschung. In Studien wurde nachgewiesen, dass PTX unter anderem eine Reduktion der TNF- α -Synthese, Abschwächung des oxidative burst von PMN, Reduktion von IL-12, IFN- γ -, GM-CSF und IL-6- Freisetzung bewirkt [74, 75].

Kreth^{et al} postulierten 2010 in einer in vitro-Studie einen Zusammenhang zwischen einer protektiven PTX-Wirkung und dem A_{2a} -Rezeptor. Sie untersuchten den Einfluss von PTX auf LPS-stimulierte humane PMN und anti-CD3/CD28-stimulierte humane T-Zellen. Bei Applikation von PTX wurde eine Potenzierung der durch Adenosin induzierten Inhibition der H_2O_2 -Produktion von LPS-stimulierten humanen PMN beobachtet. Zudem wurde bei humanen, mittels anti-CD3/CD28 stimulierten T-Zellen eine Reduktion der pro-inflammatorischen Zytokine TNF- α und IFN- γ bei Behandlung mit PTX in Anwesenheit von ausreichend Adenosin nachgewiesen [75].

Um den Zusammenhang zwischen der PTX-Wirkung und dem A_{2a} -Rezeptor in vivo zu untersuchen, wurde das in dieser Arbeit angewandte Mausmodell konzipiert. Es konnte in der vorliegenden Arbeit in vivo der postulierte Zusammenhang der protektiven PTX-Wirkung bei pulmonaler Inflammation vom Vorhandensein des A_{2a} -Rezeptors demonstriert werden. So reduzierte die Behandlung mit PTX vor der LPS-Inhalation bei Wildtyp-Tieren die PMN-Migration in das Interstitium und nach intraalveolär signifikant. Bei $A_{2a}^{-/-}$ -Tieren induzierte die LPS-Inhalation ebenfalls einen signifikanten PMN-Influx in alle drei Kompartimente; die Vorbehandlung mit PTX zeigte hierauf

jedoch keinen Einfluss. Hieraus wurde auf eine Mitbeteiligung des A_{2a}-Rezeptors an der protektiven Wirkung von PTX geschlossen und die Befunde von Reutershan^{et al} und Kreth^{et al} in vivo bestätigt [51, 75].

Zur weiteren Überprüfung der Abhängigkeit der protektiven PTX-Wirkung von der Anwesenheit des A_{2a}-Rezeptors wurde der Einfluss von A_{2a}-Rezeptor-spezifischen Antagonisten und -Agonisten in Kombination mit PTX untersucht. Der komplette Verlust der protektiven PTX-Wirkung bei vorheriger Gabe des A_{2a}-Rezeptor-Antagonisten zur Blockade des A_{2a}-Rezeptors stellt einen weiteren Beweis für die Mitbeteiligung des A_{2a}-Rezeptors dar. Die alleinige Applikation des A_{2a}-Rezeptor-Agonisten beeinflusste die interstitielle PMN-Migration nicht, während die Kombination von A_{2a}-Rezeptor-Agonist und PTX protektiv auf das Interstitium wirkte. In der BAL reduzierten sowohl nur der A_{2a}-Rezeptor-Agonist als auch die Kombination von Agonist und PTX die PMN-Konzentration. Dies steht im Einklang mit der Studie von Reutershan^{et al} von 2007, in welcher der A_{2a}-Rezeptor-Agonist ATL 202 bei A_{2a}-Rezeptor-Wildtyp-Tieren ebenfalls die PMN-Migration nach intraalveolär nach LPS-Inhalation verminderte [51]. Eine mögliche Ursache für die in dieser Studie beobachtete Differenz bei der Wirkung auf das Interstitium des A_{2a}-Rezeptor-Agonisten und der Kombination aus Agonist und PTX könnte ein Adenosin-unabhängiger PTX-Wirkmechanismus sein.

Während einer Inflammation dient die Ausschüttung pro-inflammatorischer Botenstoffe der Vermittlung und Unterhaltung der Entzündungsreaktion. Reutershan^{et al} demonstrierten 2007 im Mausmodell eine Beteiligung des A_{2a}-Rezeptors an der Modulation verschiedener Zytokinspiegel. So wiesen sie nach, dass eine durch LPS-Inhalation induzierte pulmonale Inflammation mit erhöhten Zytokinspiegeln von KC, MIP-2, IL-6 und TNF- α in der BAL sowohl bei Wildtyp- als auch bei A_{2a}^{-/-}-Tieren einherging. Die Vorbehandlung mit dem spezifischen A_{2a}-Rezeptor-Agonisten ATL 202 vor LPS-Stimulation führte zu einer Reduktion der vier getesteten Zytokine in der BAL, während dieser Effekt bei A_{2a}^{-/-}-Tieren ausblieb [51].

In mehreren Studien führte PTX zu einer nachweisbaren Reduktion der TNF- α -Synthese, Abschwächung des oxidativen Bursts von PMN und Freisetzung von IL-12 und

IL-6 [74, 75]. In dem hier vorliegenden Modell senkte PTX bei Wildtyp-Tieren signifikant die Konzentrationen der pro-inflammatorischen, chemotaktisch wirkenden Zyto- und Chemokine MIP-2, IL-6 und TNF- α in der BAL nach LPS-Stimulation. Das Fehlen dieses Effekts bei A_{2a}^{-/-}-Tieren unterstützt die Annahme einer A_{2a}-Rezeptor-vermittelten PTX-Wirkung.

Das pro-inflammatorische Zytokin TNF- α führt zu einer Hochregulierung von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1, JAM und VCAM-1 mit vermehrter PMN-Migration [16]. Basit^{et al} demonstrierten in einem Mausmodell mit LPS-Inhalation eine relevante Rolle des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 und des von PMN exprimierten LFA-1 (lymphocyte function associated antigen-1) für die PMN-Migration in die Lungenkompartimente. Sie postulierten, dass die Interaktion von ICAM-1 mit LFA-1 in ihrem Modell für ca. 50% der PMN-Migration in die Lungenkompartimente verantwortlich ist [89]. Somit könnte zu den Mechanismen, die zu der verringerten PMN-Migration führen, ein kleinerer chemotaktischer Gradient durch eine geringere TNF- α -Produktion und somit eine verminderte Expression von Adhäsionsmolekülen zählen.

Einen weiteren Punkt stellt die quantitative Expression des A_{2a}-Rezeptors in physiologischen und pathologischen Zuständen dar. Die Stimulation von PMN oder humanen T-Zellen mit LPS führt zu einer vermehrten Expression der mRNA des A_{2a}-Rezeptors. Kreth^{et al} beobachteten in humanen, nicht stimulierten PMN eine gleichmäßige Verteilung der vier Adenosinrezeptor-Subtypen, während in LPS-stimulierten humanen PMN der A_{2a}-Rezeptor verhältnismäßig überwog [90]. Kreth^{et al} diskutierten in ihrer in vitro Studie zum Zusammenhang zwischen PTX und A_{2a}-Rezeptor die Annahme, dass PTX zur Entfaltung seiner Wirkung eine vermehrte Expression des A_{2a}-Rezeptors benötigt [75].

Kardinale Merkmale des ARDS sind die Zunahme der alveolo-kapillären Permeabilität mit Entwicklung eines interstitiellen und intraalveolären Ödems sowie die PMN-Migration in diese Räume [14, 91, 92]. Zur quantitativen Analyse der alveolo-kapillären Permeabilität vor und nach Induktion einer pulmonalen Inflammation durch LPS wurde in diesem Modell die etablierte Methode der extravasalen Evans-blue Messung

angewendet [93]. Der Anstieg der extravasalen Evans blue-Konzentration bei sowohl $A_{2a}^{-/-}$ - als auch Wildtyp-Tieren nach LPS-Stimulation weist auf eine erhöhte mikrovaskuläre Permeabilität hin. Unter PTX-Vorbehandlung wiesen Wildtyp-Tiere eine signifikante Reduktion der extravasalen Evans blue-Konzentration auf. Die unter PTX-Vorbehandlung persistierende Evans blue-Konzentration bei $A_{2a}^{-/-}$ -Tieren lässt auf eine fehlende protektive Wirkung von PTX und somit auf eine Mitbeteiligung des A_{2a} -Rezeptors an der PTX-Wirkung schließen.

Der A_{2a} -Rezeptor ist an der Aufrechterhaltung der vasoendothelialen Integrität beteiligt. In einer in vitro-Studie inhibierte die Aktivierung des A_{2a} -Rezeptors durch Adenosin die Thrombin-induzierte Destabilisierung der Endothelbarriere in HUVECs (human umbilical vein endothelial cells) [94]. Die Aktivierung des A_{2a} -Rezeptors führt über seine G_s -Kopplung zur Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration. In vivo und in vitro wurde ein stabilisierender Einfluss von cAMP auf die Barrierefunktion des mikrovaskulären Endothels aufgezeigt [95]. Schick^{et al} wiesen 2012 nach, dass die Applikation von Phosphodiesterase-Inhibitoren mit konsekutiv erhöhten cAMP-Spiegeln eine Abschwächung der mikrovaskulären Membranpermeabilitätssteigerung nach systemischer LPS-Gabe bewirkt [96]. In vitro wurde in LPS-stimulierten humanen PMN eine Potenzierung der von Adenosin ausgelösten cAMP-Bildung durch PTX nachgewiesen [75]. PTX könnte somit sowohl über eine Erhöhung von cAMP als Phosphodiesterase-Inhibitor als auch über eine Aktivierung des A_{2a} -Rezeptor zu der hier beobachteten Verbesserung der vasoendothelialen Integrität beitragen.

Die hier mittels Durchflusszytometrie und Evans-blue Extravasation erhobenen Befunde von u.a. vermehrter Kapillardurchlässigkeit und vermehrter PMN-Migration in die Lungenkompartimente bei LPS-induzierter pulmonaler Inflammation korrelieren mit den mikroskopischen Befunden. Pathohistologisch wurde bereits Ende der 60er von Nash^{et al} bei der mikroskopischen Untersuchung von an respiratorischer Insuffizienz verstorbenen Intensiv-Patienten das Vorliegen eines interstitielles Ödems und intraalveolären Exsudats sowie die Ausbildung hyaliner Membranen um Alveolen und das Auftreten interstitieller Fibrose beschrieben [92]. Die hier immunhistochemisch erhobenen protektiven PTX-Wirkungen - im Sinne einer geringeren Alveolardestruktion, geringeren PMN-Migration und reduzierten Ödembildung - stehen

im Einklang mit den Befunden aus anderen Tiermodellen. So zeigten Oliveira-Junior^{et al} 2008 in einem Rattenmodell mit Induktion eines ALI durch Instillation von Salzsäure in die Lunge, dass ein vorheriger PTX-Bolus auf histologischer Ebene zu einer Reduktion des Lungenschadens mit Abschwächung der destruierten Alveolen, des interstitiellen Ödems und verringerter Einwanderung von PMN und Makrophagen führte [77].

Im Rahmen einer Entzündungsreaktion ist in Endothelzellen eine Veränderung der Zellinnenstruktur nachweisbar. Stress-Fasern bestehen aus Aktin und Myosin und sind mitbeteiligt am Aufbau des Zytoskeletts sowie u.a. an Zelladhäsion und -migration. Durch Stimulation mit LPS wird in Endothelzellen die vermehrte Bildung von Stress-Fasern vor allem an Zell-Zellgrenzen mit konsekutiver Zellrektion und erhöhter mikrovaskulärer Permeabilität induziert [24]. Konrad^{et al} wiesen in vitro durch Färbung von F-Aktin in humanen Endothelzellen zur Darstellung des Zytoskeletts eine vermehrte Bildung von Stress-Fasern nach Stimulation durch LPS nach, wobei die Vorbehandlung mit PTX diesen Effekt reduzierte [52]. Diese Ergebnisse stützen die in dieser Arbeit beobachteten Ergebnisse einer Verbesserung des LPS-induzierten mikrovaskulären Lecks durch Vorbehandlung mit PTX bei Wildtyp-Tieren.

Mit dem Hintergrundziel einer Anwendung bei manifestem ARDS ist die Wirkung von PTX nach Beginn des ARDS bzw. nach Induktion der Entzündung von Interesse. In der Literatur existieren widersprüchliche Angaben zur Wirkung von PTX nach Induktion eines Traumas. In dem von Oliveira-Junior^{et al} 2008 angewendeten Rattenmodell mit HCl-Instillation in die Lunge führte die posttraumatische PTX-Gabe nicht zu histologisch nachweisbaren protektiven Effekten. Im Vergleich zu der nur mit HCl behandelten Gruppe führte die Vorbehandlung mit PTX vor HCl-Gabe zu einer signifikant reduzierten TNF- α -Produktion. Die Behandlung mit PTX nach HCl-Instillation ergab keine signifikante Veränderung der TNF- α -Produktion [77]. Dies steht im Widerspruch zu den hier beobachteten Ergebnissen. In dieser Arbeit bewirkte eine post-LPS-Inhalationsgabe von PTX in vivo auch 3 Stunden später noch eine signifikante Reduktion der interstitiellen PMN. Reutershan^{et al} untersuchten 2007 im Mausmodell mit LPS-Inhalation die protektive Wirkung des A_{2a}-Rezeptors unter Verwendung des A_{2a}-Rezeptor-Agonisten ATL 202. Der Agonist wurde 30 Minuten vor

LPS-Inhalation, gleichzeitig zu Beginn der LPS-Inhalation oder eine Stunde nach LPS-Inhalation verabreicht. Sie demonstrierten eine bei allen drei Konditionen signifikant reduzierte PMN-Migration in den Alveolarraum, eine Abschwächung der mikrovaskulären Permeabilitätssteigerung bei Applikation des Agonisten 30 Minuten vorher und mit Beginn der LPS-Inhalation, eine Reduktion des Zytokins MIP-2 in allen drei Konditionen, und eine Reduktion des Zytokins KC bei Gabe 30 Minuten vorher und mit Beginn der LPS-Inhalation [51]. Zu möglichen Gründen für die Diskrepanz zwischen diesen Studien zählen die Anwendung von unterschiedlichen Tiermodellen und unterschiedlichen Auslösern der pulmonalen Infektion (HCl-Instillation in die Lunge versus Inspiration von vernebeltem LPS für 30-45 Minuten).

Vom „ARDS Clinical Trials Network“, einem Netzwerk aus 10 klinischen Zentren in den USA, wurde eine Studie zur Untersuchung des Verlaufs des ARDS bei Verabreichung von Lisofyllin versus Placebo durchgeführt [97]. Lisofyllin ist ein Isomer von M1, einem der Metabolite von Pentoxifyllin. Lisofyllin wurde intravenös in einer Dosierung von 3mg/kgKG, maximal 300mg, alle 6 Stunden verabreicht. Zu den Einschlusskriterien zählte u.a. der Therapiebeginn innerhalb von 36 Stunden nach Symptombeginn. Die Studienpatienten aus der Lisofyllin-Studie nahmen zwingend auch an der parallel laufenden ARDSnet Studie 01 zur Ventilationsstrategie - Beatmung mit 6 ml/kg Tidalvolumen versus 12ml/kg Tidalvolumen – teil, in welcher eine signifikante Reduktion der Mortalität bei Ventilation mit 6ml/kg Tidalvolumen versus 12ml/kg Tidalvolumen aufgezeigt wurde [98]. In der Lisofyllin-Studie wurden insgesamt 235 Patienten eingeschlossen, von denen 116 Lisofyllin und 119 Placebo erhielten. Aufgrund der Kombination mit der Ventilationsstudie erhielten 67 der 116 (57,8%) der Lisofyllin-Patienten und 68 der 119 (57%) der Placebo-Patienten die vorteilhaftere Ventilation mit 6ml/kg Tidalvolumen, die übrigen Patienten wurden mit 12ml/kg ventiliert. In der Lisofyllin-Studie wurde kein Unterschied zwischen Lisofyllin und Placebo hinsichtlich des primären Endpunkts „Mortalität 28 Tage nach Therapiebeginn“ festgestellt. Ebenso wurde kein Unterschied bezüglich sekundärer Endpunkte wie u.a. Verminderung von Organ-Versagen und selbständiger Atmung festgestellt. Die Autoren zogen hieraus den Schluss, dass Lisofyllin nicht für die Therapie des ALI/ ARDS geeignet sei. Verschiedene Faktoren könnten zu diesem aus klinischer Sicht

enttäuschenden und nach dem Ergebnis vieler tierexperimenteller Studien unerwarteten Ergebnis geführt haben. In der Lisofyllin-Studie wurde als eines der Einschlusskriterien der Therapiebeginn innerhalb von 36 Stunden nach Symptombeginn gewählt. In den experimentellen Modellen wird Lisofyllin – und auch PTX – häufig als Bolus 1 Stunde vorher, zeitgleich oder bis 6 Stunden nach Induktion der Inflammation, teilweise jedoch auch als kontinuierliche Infusion verabreicht [79, 80, 99, 100]. Ein Grund für dieses Ergebnis könnte somit das angewandte Verabreichungsschema sein.

Die Messungen des Acyl-Ratios in der Lisofyllin-Studie unterstützen diese Annahme. Das Acyl-Ratio – als Verhältnis der ungesättigten Fettsäuren (9Z,12Z)-Octadeca-9,12-diensäure (Linolsäure) und (9Z)-Octadec-9-ensäure (Ölsäure) zur gesättigten Hexadecansäure (Palmitinsäure) - wird als prädiktiver Wert für die Entwicklung eines ARDS verwendet und ist ebenso wie die Plasmakonzentration freier Fettsäuren bei Patienten mit ARDS erhöht [52, 101]. Bursten^{et al} wiesen 1998 beim Menschen eine Reduktion der Serumkonzentration von freien Fettsäuren nach intravenöser Gabe von Lisofyllin schon ab einer Dosierung von 1mg/kgKG Lisofyllin nach [99]. In der Lisofyllin-Studie wurde Lisofyllin mit 3mg/kg appliziert ohne Nachweis einer Veränderung der Werte der freien Fettsäuren oder des Acyl-Ratios [97]. Als mögliche Ursachen für die ausbleibende Reduktion der freien Fettsäuren oder des Acyl-Ratios führen die Autoren der Lisofyllin-Studie das Ausmaß von oxidativem Stress und Zytokinfreisetzung bei manifestem ARDS an [97]. Es wäre von Interesse, ob ein anderes Lisofyllin-Therapieschema bei positiver Beeinflussung dieser Werte mit einem verbesserten Outcome bei ARDS-Patienten einhergehen würde.

Eine weitere mögliche Ursache für das Ergebnis der Lisofyllin-Studie könnten Unterschiede in der extrazellulären Adenosinkonzentration darstellen. Konrad^{et al} beobachteten 2013 in einem Mausmodell mit CD73-defizienten Tieren eine protektive PTX-Wirkung auf das Interstitium und die BAL im Sinne einer verminderten PMN-Migration in diese beiden Kompartimente nach LPS-Inhalation. Das membrangebundene Enzym CD73 hydrolysiert den Vorläufer AMP zu Adenosin; CD73-defiziente Mäuse haben folglich einen geringeren extrazellulären Adenosinspiegel. Bei der Blockade eines für die intrazelluläre Aufnahme von Adenosin zuständigen Transmembranproteins durch einen Antagonisten wirkte PTX in vivo trotzdem abschwächend auf die PMN-Migration in das Interstitium und in die BAL.

Verminderte oder erhöhte extrazelluläre Adenosinspiegel zeigten also in jenem Modell keinen Einfluss auf die protektive Wirkung von PTX [52]. Dies steht im Widerspruch zu anderen Studienergebnissen. So wiesen Kreth^{et al} 2010 *in vitro* eine immunmodulatorische PTX-Wirkung nach Stimulation von humanen PMN und T-Zellen nur bei ausreichenden Adenosinspiegeln nach [75]. Da bei nur 50% der Patienten mit Sepsis ausreichende extrazelluläre Adenosinspiegel für die Wirkung von PTX und Lisofyllin vorliegen, könnte dies eine Erklärung für die Studienergebnisse von Lisofyllin sein [75, 102].

Eine andere denkbare Ursache wären noch unbekannt unterschiedliche molekulare Mechanismen von PTX und Lisofyllin. Lisofyllin als Metabolit liegt in höherer Konzentration im Plasma vor als PTX [103]. In einer Studie an Mäusen mit Induktion eines ALI durch Hyperoxie kam es u.a. zu einer Zunahme des „wet to dry“-Verhältnisses der Lunge sowie zu vermehrter Aktivierung von CREB und NF-κB. Lisofyllin bewirkte eine Abschwächung der CREB-Aktivierung und eine abgeschwächte Zunahme des „wet to dry“-Verhältnisses ohne Einfluss auf NF-κB [57]. In einem Modell an Ratten führte die PTX-Gabe jedoch, bei durch intravenöse Applikation von LPS induzierter Entzündung, zu einer Reduktion von NF-κB. Die Autoren führten die verminderte Produktion pro-inflammatorischer Zytokine (hier BAL IL-8, MMP-2, MMP-9 und Plasma-MMP-9) auf diese Reduktion des NF-κB zurück [104]. Als Gründe für diese Diskrepanz wurden die Verwendung unterschiedlicher Modelle und mögliche Unterschiede in den Wirkmechanismen von PTX und Lisofyllin diskutiert [52].

Insgesamt stellt PTX bei bestehender Zulassung und jahrzehntelanger Erfahrung in der klinischen Anwendung einen interessanten Wirkstoff für weitere klinische Anwendungsgebiete dar. Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass PTX im Mausmodell, nach Induktion einer pulmonalen Inflammation durch LPS-Inhalation, A_{2a}-Rezeptor-abhängig zu einer verminderten PMN-Migration nach interstitiell und intraalveolär, zu einer Verminderung von TNF-alpha, IL-6 und CXCL2/3 in der BAL und zu einem geringeren kapillären Leck führt. Bei diskrepanten Ergebnissen zwischen der prä-klinischen Anwendung von PTX und Anwendung von Lisofyllin in klinischen

Studien sollte jedoch weitere Forschung erfolgen. Ein interessanter Ansatzpunkt wäre die Untersuchung der Wirkung von PTX und Lisofyllin in Abhängigkeit des extrazellulären Adenosinspiegels. Da ARDS von vielen verschiedenen Ursachen ausgelöst werden kann, wäre eine weitere Fragestellung der Vergleich der Wirksamkeit von PTX bei diesen unterschiedlichen pathologischen Auslösern des ARDS. Zudem wurde PTX in der prä-klinischen Forschung zeitnah zur Initiierung der Inflammation verabreicht, sodass Untersuchungen zur Wirksamkeit im Zeitverlauf nach der Inflammation erfolgen sollten.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Zusammenhang zwischen einer protektiven PTX-Wirkung und dem Vorhandensein des A_{2a} -Rezeptors bei durch LPS-Inhalation induzierter pulmonaler Entzündung postuliert und anhand eines Mausmodells untersucht.

Das akute respiratorische distress syndrome ARDS ist ein lebensbedrohliches, akutes Lungenversagen mit leichter bis schwerer Hypoxämie. Zu den Diagnosekriterien gehören der Schweregrad der Hypoxämie, beidseitige pulmonale Infiltrate im konventionellen Röntgen oder im CT des Thorax und ein akuter Beginn. ARDS ist weiterhin gekennzeichnet durch eine übermäßige Migration und Aktivierung von PMN, eine Zunahme der mikrovaskulären Permeabilität mit Entstehung eines interstitiellen und alveolären Ödems und einen im Verlauf fibroproliferativen Umbau. Bis heute stehen supportive Therapiemaßnahmen und Therapie der auslösenden Ursache zur Verfügung, eine spezifische Therapie gegen ARDS ist jedoch nicht vorhanden.

Der A_{2a} -Rezeptor gehört zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (G_s). Seine Aktivierung führt über Aktivierung der Adenylycyclase zur Erhöhung des second messenger cAMP mit Aktivierung der Phosphokinase Typ A und durch Phosphorylierung zur Aktivierung von verschiedenen Kanälen. Der A_{2a} -Rezeptor wird u.a. auf Immunzellen, in der Lunge und von vaskulärem Endothel exprimiert. Er besitzt anti-inflammatorische Eigenschaften.

Der Phosphodiesterase-Inhibitor Pentoxifyllin PTX ist seit Jahrzehnten aufgrund seiner rheologischen Eigenschaften in der Therapie der Claudicatio intermittens zugelassen. Er besitzt zusätzlich anti-inflammatorische Eigenschaften und reduziert die TNF- α -Synthese, schwächt den oxidative burst von PMN ab und reduziert die Freisetzung von IL-12, IFN- γ , Granulozyten-Makrophagen-colony-stimulating-factor und IL-6.

In dieser Arbeit wurde anhand eines Mausmodells die Wirkung von PTX auf die Migration von polymorphonukleären Granulozyten PMN in die Lungenkompartimente

nach LPS-induzierter pulmonaler Inflammation in Abhängigkeit des A_{2a} -Rezeptors untersucht. Die Inhalation von LPS führte bei $A_{2a}^{-/-}$ - und Wildtyp-Tieren zu einer signifikant erhöhten PMN-Migration in das Interstitium und die Alveolen, zu einer erhöhten mikrovaskulären Permeabilität mit Austritt von Evans blue in den extravasalen Raum und zu einer signifikanten Erhöhung der Zytokine TNF- α , IL-6, CXCL-1 und CXCL2/3 in der BAL. Die Applikation von PTX vor LPS-Inhalation bewirkte bei Wildtyp-Tieren eine signifikante Abschwächung der PMN-Migration, eine Reduktion der mikrovaskulären Permeabilität und eine Reduktion der BAL-Konzentration von TNF- α , IL-6 und CXCL-6. Auf $A_{2a}^{-/-}$ -Tiere übte die Gabe von PTX keinen protektiven Effekt aus. Somit konnte in der vorliegenden Arbeit ein Zusammenhang zwischen der protektiven PTX-Wirkung und dem Vorhandensein des A_{2a} -Rezeptors bei LPS-induzierter pulmonaler Entzündung in vivo nachgewiesen werden.

6 Abkürzungsverzeichnis

A. dest.	Aqua destillata
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AECC	Amerikanisch-Europäische Konsensuskonferenz
AK	Antikörper
ALI	Acute Lung Injury
AMP	Adenosinmonophosphat
AR	Adenosinrezeptor
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
ATP	Adenosintriphosphat
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca ²⁺	Kalzium
cAMP	Cyclo-Adenosinmonophosphat
CD	Cluster of Differentiation
CO	Kohlenstoffmonoxid
CPAP	Continuus Positive Airway Pressure
CXCL	Chemokinligand
CXCR 1	Chemokinrezeptor 1
CXCR 2	Chemokinrezeptor 2
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EB	Evans blue
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
ENT 1	Equilibrative nucleoside transporter 1
FP	Färbepuffer
FSGO	Fischhautölgelatine
Hb	Hämoglobin
HBSS ⁺	Hank's balanced salt solution mit Mg ²⁺ Ca ²⁺
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
ICAM	Interzelluläres Adhäsionsmolekül
IL	Interleukin
IS	Interstitiell
Iv	intravaskulär
JAM	Junctional adhesion molecule
KC	Keratinocyte-derived Chemokine
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
LPS	Lipopolysaccharid
MIP-2	Macrophage-Inflammatory-Protein-2

MMP	Matrix-Metalloproteinase
NADP ⁺	Nicotinamindadeninukleotidphosphat, oxidiert
NADPH	Nicotinamindadeninukleotidphosphat, reduziert
NFκB	Nuclear factor kappa B
NO	Stickstoffmonoxid
NS	Nicht signifikant
PAF	Plättchen-aktivierender Faktor
paO ²	Sauerstoffpartialdruck
PBS ⁻	Phosphate buffered saline ohne Mg ²⁺ /Ca ²⁺
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEEP	Positiver endexpiratorischer Druck
PFA	Paraformaldehyd
PMN	Polymorphkerniger neutrophiler Granulozyt
PSGL 1	P-Selektin-Glykoprotein-Ligand 1
PTX	Pentoxifyllin
RNA	Ribonucleic acid / Ribonukleinsäure
ROS	Reactive Sauerstoffspezies
RPM	Rounds per Minute, Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
Tab.	Tabelle
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
VCAM-1	Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül-1

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: Konditionen der untersuchten Gruppen, je für $A_{2a}^{-/-}$ -Tiere und Wildtyp-Tiere.....	33
Tabelle 2-2: Konditionen zur Untersuchung der Wirkung von A_{2a} -Antagonist und – Agonist, PTX und LPS	34
Tabelle 2-3: Antikörper-Konzentration zur Zellfärbung	37
Tabelle 2-4: Behandlung von BAL- und Lungenproben mit Fluoreszenz-Antikörpern	37
Tabelle 3-1 Vergleich der PMN im Nativblutbild von $A_{2a}^{-/-}$ - und Wildtyp-Tieren.....	61

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Darstellung eines normalen Alveolus und eines erkrankten Alveolus in der Akutphase [6].	10
Abbildung 1-2: Die Rolle der PMN bei ARDS [40].	15
Abbildung 1-3: Entstehung von extrazellulärem Adenosin [45].	16
Abbildung 1-4: Entstehung und Interaktion von extrazellulärem Adenosin [59].	20
Abbildung 2-1: Chronologie der Vorbehandlung für den Transmigrationsassay in vivo	33
Abbildung 2-2: Chronologie der Vorbehandlung für den Vergleich von A _{2a} -Agonist und -Antagonist für den Transmigrationsassay in vivo	34
Abbildung 2-3: Auswertung der Durchflusszytometrie mit FlowJo	39
Abbildung 2-4: Darstellung der CD45-positiven Leukozyten	39
Abbildung 2-5: Darstellung der Isotypen-Kontrolle	40
Abbildung 2-6: Konditionen der unterschiedlichen Gruppen, je für A _{2a} ^{-/-} -Tiere und Wildtyp-Tiere	41
Abbildung 2-7: Chronologie der Vorbehandlung des Evans blue-Extravasationsexperiments	41
Abbildung 3-1: Effekt von PTX auf die PMN-Migration im Transmigrationsassay in CD1wt-Tieren [52]	49
Abbildung 3-2: Effekt von PTX auf die PMN-Migration im Transmigrationsassay in A _{2a} ^{-/-} -Tieren [52].	51
Abbildung 3-3: Effekt von PTX auf die PMN-Migration nach A _{2a} -Rezeptor-Blockade (A _{2a} -Rezeptor-Antagonist ZM241385) bzw. -Stimulation (A _{2a} -Rezeptor-Agonist CGS 21680) [52]	53
Abbildung 3-4: Effekt von PTX auf die PMN-Migration bei Variation des Applikationszeitpunkts vor und nach der LPS-Inhalation [52]	54
Abbildung 3-5: Effekt von PTX auf die mikrovaskuläre Permeabilität [52]	55
Abbildung 3-6: Effekt von PTX auf die makroskopische Darstellung von Herz-Lungenpräparaten im Rahmen der Bestimmung der mikrovaskulären Permeabilitätssteigerung.	56

Abbildung 3-7: Immunhistochemische Färbung zur Darstellung der PMN-Migration in die Lungenkompartimente [52]	58
Abbildung 3-8: Effekt von PTX auf die Zytokinkonzentration in der BAL von CD1wt-Tieren [52]	60
Abbildung 3-9: Effekt von PTX auf die Zytokinkonzentration in der BAL von $A_{2a}^{-/-}$ -Tieren [52]	60

9 Literaturverzeichnis

1. Ashbaugh, D.G., et al., *Acute respiratory distress in adults*. Lancet, 1967. **2**(7511): p. 319-23.
2. Bernard, G.R., et al., *The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination*. Am J Respir Crit Care Med, 1994. **149**(3 Pt 1): p. 818-24.
3. Ranieri, V.M., et al., *Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition*. Jama, 2012. **307**(23): p. 2526-33.
4. Rubenfeld, G.D., et al., *Incidence and outcomes of acute lung injury*. N Engl J Med, 2005. **353**(16): p. 1685-93.
5. MacCallum, N.S. and T.W. Evans, *Epidemiology of acute lung injury*. Curr Opin Crit Care, 2005. **11**(1): p. 43-9.
6. Ware, L.B. and M.A. Matthay, *The acute respiratory distress syndrome*. N Engl J Med, 2000. **342**(18): p. 1334-49.
7. Bellani, G., et al., *Epidemiology, Patterns of Care, and Mortality for Patients With Acute Respiratory Distress Syndrome in Intensive Care Units in 50 Countries*. JAMA, 2016. **315**(8): p. 788-800.
8. Sharma, S.K., et al., *Aetiology, outcomes & predictors of mortality in acute respiratory distress syndrome from a tertiary care centre in north India*. Indian J Med Res, 2016. **143**(6): p. 782-792.
9. Gajic, O., et al., *Early identification of patients at risk of acute lung injury: evaluation of lung injury prediction score in a multicenter cohort study*. Am J Respir Crit Care Med, 2011. **183**(4): p. 462-70.
10. Herridge, M.S., et al., *Functional disability 5 years after acute respiratory distress syndrome*. N Engl J Med, 2011. **364**(14): p. 1293-304.
11. *Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. The Acute Respiratory Distress Syndrome Network*. N Engl J Med, 2000. **342**(18): p. 1301-8.
12. Gonzales, J.N., R. Lucas, and A.D. Verin, *The Acute Respiratory Distress Syndrome: Mechanisms and Perspective Therapeutic Approaches*. Austin J Vasc Med, 2015. **2**(1).
13. Duggal, A., et al., *Pharmacological treatments for acute respiratory distress syndrome: systematic review*. Minerva Anesthesiol, 2015. **81**(5): p. 567-88.
14. Rocco, P.R., C. Dos Santos, and P. Pelosi, *Lung parenchyma remodeling in acute respiratory distress syndrome*. Minerva Anesthesiol, 2009. **75**(12): p. 730-40.
15. Pugin, J., et al., *The alveolar space is the site of intense inflammatory and profibrotic reactions in the early phase of acute respiratory distress syndrome*. Crit Care Med, 1999. **27**(2): p. 304-12.
16. Herold, S., N.M. Gabrielli, and I. Vadasz, *Novel concepts of acute lung injury and alveolar-capillary barrier dysfunction*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2013. **305**(10): p. L665-81.

17. Bachofen, M. and E.R. Weibel, *Alterations of the gas exchange apparatus in adult respiratory insufficiency associated with septicemia*. Am Rev Respir Dis, 1977. **116**(4): p. 589-615.
18. Han, S. and R.K. Mallampalli, *The acute respiratory distress syndrome: from mechanism to translation*. J Immunol, 2015. **194**(3): p. 855-60.
19. Matthay, M.A. and R.L. Zemans, *The acute respiratory distress syndrome: pathogenesis and treatment*. Annu Rev Pathol, 2011. **6**: p. 147-63.
20. Weiland, J.E., et al., *Lung neutrophils in the adult respiratory distress syndrome. Clinical and pathophysiologic significance*. Am Rev Respir Dis, 1986. **133**(2): p. 218-25.
21. Reutershan, J., et al., *Sequential recruitment of neutrophils into lung and bronchoalveolar lavage fluid in LPS-induced acute lung injury*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005. **289**(5): p. L807-15.
22. Razavi, H.M., et al., *Pulmonary neutrophil infiltration in murine sepsis: role of inducible nitric oxide synthase*. Am J Respir Crit Care Med, 2004. **170**(3): p. 227-33.
23. Reutershan, J., et al., *Blocking p21-activated kinase reduces lipopolysaccharide-induced acute lung injury by preventing polymorphonuclear leukocyte infiltration*. Am J Respir Crit Care Med, 2007. **175**(10): p. 1027-35.
24. Reutershan, J., et al., *Critical role of endothelial CXCR2 in LPS-induced neutrophil migration into the lung*. J Clin Invest, 2006. **116**(3): p. 695-702.
25. Wera, O., P. Lancellotti, and C. Oury, *The Dual Role of Neutrophils in Inflammatory Bowel Diseases*. J Clin Med, 2016. **5**(12).
26. Hahn, J., et al., *Neutrophils and neutrophil extracellular traps orchestrate initiation and resolution of inflammation*. Clin Exp Rheumatol, 2016. **34**(4 Suppl 98): p. 6-8.
27. Nathan, C., *Points of control in inflammation*. Nature, 2002. **420**(6917): p. 846-852.
28. Grommes, J. and O. Soehnlein, *Contribution of neutrophils to acute lung injury*. Mol Med, 2011. **17**(3-4): p. 293-307.
29. Fialkow, L., Y. Wang, and G.P. Downey, *Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function*. Free Radic Biol Med, 2007. **42**(2): p. 153-64.
30. Zemans, R.L., S.P. Colgan, and G.P. Downey, *Transepithelial migration of neutrophils: mechanisms and implications for acute lung injury*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2009. **40**(5): p. 519-35.
31. Carswell, E.A., et al., *An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1975. **72**(9): p. 3666-70.
32. Zhang, J., et al., *Regulation of endothelial cell adhesion molecule expression by mast cells, macrophages, and neutrophils*. PLoS One, 2011. **6**(1): p. e14525.
33. Olson, T.S. and K. Ley, *Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2002. **283**(1): p. R7-28.
34. Ley, K., et al., *Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(9): p. 678-89.
35. Downey, G.P., et al., *Neutrophil sequestration and migration in localized pulmonary inflammation. Capillary localization and migration across the interalveolar septum*. Am Rev Respir Dis, 1993. **147**(1): p. 168-76.

36. Gebb, S.A., et al., *Sites of leukocyte sequestration in the pulmonary microcirculation*. J Appl Physiol (1985), 1995. **79**(2): p. 493-7.
37. Kansas, G.S., *Selectins and their ligands: current concepts and controversies*. Blood, 1996. **88**(9): p. 3259-87.
38. Kang, B.H., et al., *Intercellular adhesion molecule-1 expression on the alveolar epithelium and its modification by hyperoxia*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1993. **9**(4): p. 350-5.
39. Celi, A., et al., *ICAM-1-independent adhesion of neutrophils to phorbol ester-stimulated human airway epithelial cells*. Am J Physiol, 1999. **277**(3 Pt 1): p. L465-71.
40. Williams, A.E. and R.C. Chambers, *The mercurial nature of neutrophils: still an enigma in ARDS?* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2014. **306**(3): p. L217-30.
41. Eltzschig, H.K., et al., *Coordinated adenine nucleotide phosphohydrolysis and nucleoside signaling in posthypoxic endothelium: role of ectonucleotidases and adenosine A2B receptors*. J Exp Med, 2003. **198**(5): p. 783-96.
42. Hasko, G. and B.N. Cronstein, *Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity*. Trends Immunol, 2004. **25**(1): p. 33-9.
43. Eltzschig, H.K., *Adenosine: an old drug newly discovered*. Anesthesiology, 2009. **111**(4): p. 904-15.
44. Fredholm, B.B., et al., *International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors--an update*. Pharmacol Rev, 2011. **63**(1): p. 1-34.
45. Schepp, C.P. and J. Reutershan, *Bench-to-bedside review: adenosine receptors--promising targets in acute lung injury?* Crit Care, 2008. **12**(5): p. 226.
46. Zhang, L. and G. Shi, *Gq-Coupled Receptors in Autoimmunity*. J Immunol Res, 2016. **2016**: p. 3969023.
47. Fan, M., W. Qin, and S.J. Mustafa, *Characterization of adenosine receptor(s) involved in adenosine-induced bronchoconstriction in an allergic mouse model*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2003. **284**(6): p. L1012-9.
48. Fredholm, B.B., et al., *Comparison of the potency of adenosine as an agonist at human adenosine receptors expressed in Chinese hamster ovary cells*. Biochem Pharmacol, 2001. **61**(4): p. 443-8.
49. Ngamsri, K.C., et al., *Adenosine receptor A1 regulates polymorphonuclear cell trafficking and microvascular permeability in lipopolysaccharide-induced lung injury*. J Immunol, 2010. **185**(7): p. 4374-84.
50. Wagner, R., et al., *Adenosine receptor A3 is a critical mediator in LPS-induced pulmonary inflammation*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2010. **299**(4): p. L502-12.
51. Reutershan, J., et al., *Therapeutic anti-inflammatory effects of myeloid cell adenosine receptor A2a stimulation in lipopolysaccharide-induced lung injury*. J Immunol, 2007. **179**(2): p. 1254-63.
52. Konrad, F.M., et al., *Protective effects of pentoxifylline in pulmonary inflammation are adenosine receptor A2A dependent*. FASEB J, 2013. **27**(9): p. 3524-35.
53. Hasko, G. and P. Pacher, *A2A receptors in inflammation and injury: lessons learned from transgenic animals*. J Leukoc Biol, 2008. **83**(3): p. 447-55.

54. Chen, J.F., H.K. Eltzschig, and B.B. Fredholm, *Adenosine receptors as drug targets--what are the challenges?* Nat Rev Drug Discov, 2013. **12**(4): p. 265-86.
55. Hasko, G., et al., *Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases.* Nat Rev Drug Discov, 2008. **7**(9): p. 759-70.
56. Shao, X.M., et al., *Inhibition of the cAMP/PKA/CREB Pathway Contributes to the Analgesic Effects of Electroacupuncture in the Anterior Cingulate Cortex in a Rat Pain Memory Model.* Neural Plast, 2016. **2016**: p. 5320641.
57. George, C.L., et al., *Effects of lisofylline on hyperoxia-induced lung injury.* Am J Physiol, 1999. **276**(5 Pt 1): p. L776-85.
58. Heilker, R., et al., *All three IkappaB isoforms and most Rel family members are stably associated with the IkappaB kinase 1/2 complex.* Eur J Biochem, 1999. **259**(1-2): p. 253-61.
59. Milne, G.R. and T.M. Palmer, *Anti-inflammatory and immunosuppressive effects of the A2A adenosine receptor.* ScientificWorldJournal, 2011. **11**: p. 320-39.
60. Hasko, G., et al., *Adenosine inhibits IL-12 and TNF-[alpha] production via adenosine A2a receptor-dependent and independent mechanisms.* Faseb j, 2000. **14**(13): p. 2065-74.
61. Csoka, B., et al., *A2A adenosine receptors and C/EBPbeta are crucially required for IL-10 production by macrophages exposed to Escherichia coli.* Blood, 2007. **110**(7): p. 2685-95.
62. Yang, Z., et al., *Infarct-sparing effect of A2A-adenosine receptor activation is due primarily to its action on lymphocytes.* Circulation, 2005. **111**(17): p. 2190-7.
63. Peart, J.N. and J.P. Headrick, *Adenosinergic cardioprotection: multiple receptors, multiple pathways.* Pharmacol Ther, 2007. **114**(2): p. 208-21.
64. Okusa, M.D., et al., *Selective A2A adenosine receptor activation reduces ischemia-reperfusion injury in rat kidney.* Am J Physiol, 1999. **277**(3 Pt 2): p. F404-12.
65. Sharma, A.K., et al., *NOX2 Activation of Natural Killer T Cells Is Blocked by the Adenosine A2A Receptor to Inhibit Lung Ischemia-Reperfusion Injury.* Am J Respir Crit Care Med, 2016. **193**(9): p. 988-99.
66. Schulz, N., et al., *Critical role for adenosine receptor A2a in beta-cell proliferation.* Mol Metab, 2016. **5**(11): p. 1138-1146.
67. Yaar, R., et al., *Animal models for the study of adenosine receptor function.* J Cell Physiol, 2005. **202**(1): p. 9-20.
68. Xu, Y., K. Ravid, and B.D. Smith, *Major histocompatibility class II transactivator expression in smooth muscle cells from A2b adenosine receptor knock-out mice: cross-talk between the adenosine and interferon-gamma signaling.* J Biol Chem, 2008. **283**(21): p. 14213-20.
69. Porter, J.M., et al., *Pentoxifylline efficacy in the treatment of intermittent claudication: multicenter controlled double-blind trial with objective assessment of chronic occlusive arterial disease patients.* Am Heart J, 1982. **104**(1): p. 66-72.
70. McCarty, M.F., J.H. O'Keefe, and J.J. DiNicolantonio, *Pentoxifylline for vascular health: a brief review of the literature.* Open Heart, 2016. **3**(1): p. e000365.

71. Strano, A., et al., *Double-blind, crossover study of the clinical efficacy and the hemorheological effects of pentoxifylline in patients with occlusive arterial disease of the lower limbs*. *Angiology*, 1984. **35**(7): p. 459-66.
72. *European Pentoxifylline Multi-Infarct Dementia Study*. *Eur Neurol*, 1996. **36**(5): p. 315-21.
73. Lee, Y.S., et al., *Treatment of Severe Alcoholic Hepatitis With Corticosteroid, Pentoxifylline, or Dual Therapy: A Systematic Review and Meta-Analysis*. *J Clin Gastroenterol*, 2016.
74. Coimbra, R., et al., *LPS-stimulated PMN activation and proinflammatory mediator synthesis is downregulated by phosphodiesterase inhibition: role of pentoxifylline*. *J Trauma*, 2004. **57**(6): p. 1157-63.
75. Kreth, S., et al., *Immunomodulatory properties of pentoxifylline are mediated via adenosine-dependent pathways*. *Shock*, 2010. **34**(1): p. 10-6.
76. Kudoh, I., et al., *Activation of alveolar macrophages in acid-injured lung in rats: different effects of pentoxifylline on tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide production*. *Crit Care Med*, 2001. **29**(8): p. 1621-5.
77. Oliveira-Junior, I.S., et al., *Effects of pentoxifylline on TNF-alpha and lung histopathology in HCL-induced lung injury*. *Clinics (Sao Paulo)*, 2008. **63**(1): p. 77-84.
78. Michetti, C., et al., *Pentoxifylline reduces acute lung injury in chronic endotoxemia*. *J Surg Res*, 2003. **115**(1): p. 92-9.
79. Korhonen, K., et al., *Pentoxifylline reduces regional inflammatory and ventilatory disturbances in meconium-exposed piglet lungs*. *Pediatr Res*, 2004. **56**(6): p. 901-6.
80. Kudoh, I., et al., *The effect of pentoxifylline on acid-induced alveolar epithelial injury*. *Anesthesiology*, 1995. **82**(2): p. 531-41.
81. Ardizzoia, A., et al., *Respiratory distress syndrome in patients with advanced cancer treated with pentoxifylline: a randomized study*. *Support Care Cancer*, 1993. **1**(6): p. 331-3.
82. Ege, T., et al., *The importance of aprotinin and pentoxifylline in preventing leukocyte sequestration and lung injury caused by protamine at the end of cardiopulmonary bypass surgery*. *Thorac Cardiovasc Surg*, 2004. **52**(1): p. 10-5.
83. El-Lakkany, N., S.S. el-Din, and F. Ebeid, *The use of pentoxifylline as adjuvant therapy with praziquantel downregulates profibrogenic cytokines, collagen deposition and oxidative stress in experimental schistosomiasis mansoni*. *Exp Parasitol*, 2011. **129**(2): p. 152-7.
84. Haddad, J.J., et al., *Immunopharmacological potential of selective phosphodiesterase inhibition. I. Differential regulation of lipopolysaccharide-mediated proinflammatory cytokine (interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha) biosynthesis in alveolar epithelial cells*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2002. **300**(2): p. 559-66.
85. Saria, A. and J.M. Lundberg, *Evans blue fluorescence: quantitative and morphological evaluation of vascular permeability in animal tissues*. *J Neurosci Methods*, 1983. **8**(1): p. 41-9.
86. Udaka, K., Y. Takeuchi, and H.Z. Movat, *Simple method for quantitation of enhanced vascular permeability*. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1970. **133**(4): p. 1384-7.

87. Mehta, S., et al., *Endogenous pulmonary nitric oxide in the regulation of airway microvascular leak*. Am J Physiol, 1998. **275**(5 Pt 1): p. L961-8.
88. Evans, T.W., et al., *Effect of platelet-activating factor on airway vascular permeability: possible mechanisms*. J Appl Physiol (1985), 1987. **63**(2): p. 479-84.
89. Basit, A., et al., *ICAM-1 and LFA-1 play critical roles in LPS-induced neutrophil recruitment into the alveolar space*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2006. **291**(2): p. L200-7.
90. Kreth, S., et al., *Differential expression of 5'-UTR splice variants of the adenosine A2A receptor gene in human granulocytes: identification, characterization, and functional impact on activation*. Faseb j, 2008. **22**(9): p. 3276-86.
91. Matthay, M.A. and G.A. Zimmerman, *Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: four decades of inquiry into pathogenesis and rational management*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2005. **33**(4): p. 319-27.
92. Nash, G., *Pathology of ARDS*. West J Med, 1979. **130**(3): p. 220-2.
93. Rogers, D.F., et al., *Effects and interactions of sensory neuropeptides on airway microvascular leakage in guinea-pigs*. Br J Pharmacol, 1988. **95**(4): p. 1109-16.
94. Hassanian, S.M., P. Dinarvand, and A.R. Rezaie, *Adenosine regulates the proinflammatory signaling function of thrombin in endothelial cells*. J Cell Physiol, 2014. **229**(9): p. 1292-300.
95. Spindler, V., et al., *Ultrastructural analysis reveals cAMP-dependent enhancement of microvascular endothelial barrier functions via Rac1-mediated reorganization of intercellular junctions*. Am J Pathol, 2011. **178**(5): p. 2424-36.
96. Schick, M.A., et al., *Phosphodiesterase-4 inhibition as a therapeutic approach to treat capillary leakage in systemic inflammation*. J Physiol, 2012. **590**(11): p. 2693-708.
97. *Randomized, placebo-controlled trial of lisofylline for early treatment of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome*. Crit Care Med, 2002. **30**(1): p. 1-6.
98. Brower, R.G., et al., *Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome*. N Engl J Med, 2000. **342**(18): p. 1301-8.
99. Bursten, S.L., et al., *Lisofylline causes rapid and prolonged suppression of serum levels of free fatty acids*. J Pharmacol Exp Ther, 1998. **284**(1): p. 337-45.
100. Li, H., et al., *Pentoxifylline inhibits pulmonary inflammation induced by infrarenal aortic cross-clamping dependent of adenosine receptor A2A*. Am J Transl Res, 2016. **8**(5): p. 2210-21.
101. Bursten, S.L., et al., *An increase in serum C18 unsaturated free fatty acids as a predictor of the development of acute respiratory distress syndrome*. Crit Care Med, 1996. **24**(7): p. 1129-36.
102. Zeni, F., et al., *Effects of pentoxifylline on circulating cytokine concentrations and hemodynamics in patients with septic shock: results from a double-blind, randomized, placebo-controlled study*. Crit Care Med, 1996. **24**(2): p. 207-14.
103. Wyska, E., E. Pekala, and J. Szymura-Oleksiak, *Interconversion and tissue distribution of pentoxifylline and lisofylline in mice*. Chirality, 2006. **18**(8): p. 644-51.

104. Coimbra, R., et al., *LPS-induced acute lung injury is attenuated by phosphodiesterase inhibition: effects on proinflammatory mediators, metalloproteinases, NF-kappaB, and ICAM-1 expression.* J Trauma, 2006. **60**(1): p. 115-25.

10 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Klinik für Anästhesiologie der Universität Tübingen unter der Betreuung von Prof. Dr. med. Jörg Reutershan durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Prof. Dr. med. Jörg Reutershan und Frau Dr. med. Franziska Konrad. Die Durchführung der Tierversuche erfolgte durch Frau Dr. med. Franziska Konrad. Die weitere Bearbeitung der Proben und die Analyse der Proben erfolgte durch mich mit Unterstützung durch Frau Irene Vollmer.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Beratung durch das Institut für Biometrie durch Frau Dr. med. Franziska Konrad und durch mich.

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

Münster, 08.03.2018

11 Veröffentlichung

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits als Teil folgender Publikation veröffentlicht und sind entsprechend kenntlich gemacht:

Konrad F., Neudeck G., Vollmer I, Ngamsri K. C., Thiel M., Reutershan J., “protective effects of pentoxifylline in pulmonary inflammation are adenosine receptor A_{2a} dependent” FASEB J, 2013. **27**(9): p. 3524-35

12DFG

Die Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft DFG unterstützt, RE 1683/3-1 an Prof. Dr. med. Jörg Reutershan.

13Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei Prof. Dr. med. Jörg Reutershan für die Überlassung des Themas und die sehr gute Betreuung insbesondere in der Phase der experimentellen Datenerhebung.

Bei Frau Dr. Franziska Konrad bedanke ich mich für die hervorragende Betreuung, die außerordentliche Geduld und die Hilfestellung in jeder Phase der Arbeit.

Mein weiterer Dank geht an Frau Irene Vollmer für die gute Einarbeitung in die Versuchsdurchführung und für die jederzeit freundliche und hilfreiche Unterstützung bei allen möglichen anfallenden Herausforderungen rund um die Versuche.

Bei Frau Stefanie Stark bedanke ich mich für die Unterstützung und Einarbeitung zu Beginn der experimentellen Phase meiner Dissertation.