

Universitätsklinik für
Anästhesiologie und Intensivmedizin
Tübingen

Die Rolle der Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)
Rezeptoren CXCR4 und CXCR7 in der akuten Inflammation

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Jans, Christoph

2024

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professorin Dr. F. Konrad

2. Berichterstatter: Professor Dr. M. Schwab

Tag der Disputation: 18.12.2024

Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungsverzeichnis.....	5
2. Einleitung	8
2.1. Sepsis	8
2.1.1. Definition der Sepsis	8
2.1.2. Epidemiologie.....	9
2.1.3. Ätiologie	10
2.1.4. Risikofaktoren	11
2.1.5. Klinik und Therapie.....	12
2.1.6. Pathophysiologie	14
2.2. SDF-1 Rezeptoren in der Inflammation	22
2.3. Adenosinrezeptor A _{2B} in der Inflammation	25
2.4. Fragestellungen der Arbeit	27
3. Materialien und Methoden.....	29
3.1. Materialien.....	29
3.1.1. Geräte	29
3.1.2. Verbrauchsmaterialien	31
3.1.3. Chemikalien	32
3.1.4. Medien	33
3.1.5. Enzyme	34
3.1.6. Medikamente.....	34
3.1.7. Antikörper	35
3.1.8. CXCR4- und CXCR7-Antagonisten.....	35
3.2. Methoden	36
3.2.1. In vivo PMN-Migration und PNC-Bildung	36
3.2.2. Histologie	42
3.2.3. RNA-Isolation	46
3.2.4. Umschrieb in complementary DNA (cDNA).....	46
3.2.5. Real-time Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR).....	47
3.2.6. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	48
3.2.7. Statistische Analyse	49
4. Ergebnisse	50

4.1. Gesteigerte Expression von SDF-1, CXCR4 und CXCR7 während Peritonitis und Sepsis.....	50
4.2. Reduktion der PMN-Migration in die Organe durch den SDF-1 Rezeptorantagonismus	54
4.3. Aufhebung des protektiven Effektes der CXCR4- und CXCR7-Antagonisten durch den A _{2B} Knockout.....	60
4.4. Expression des A _{2B} Adenosinrezeptors unter SDF-1 Rezeptorantagonismus während Zymosan-induzierter Peritonitis und Sepsis	63
4.5. Reduktion der PMN-Organmigration durch SDF-1 Rezeptorantagonismus während polymikrobieller Peritonitis und Sepsis	65
4.6. Reduktion der Bildung von Plättchen-Neutrophilen-Komplexen durch SDF-1 Rezeptorantagonismus.....	68
4.7. Aufhebung der Effekte der SDF-1 Rezeptorantagonisten auf die PNC-Bildung durch A _{2B} Knockout	73
4.8. Reduktion der Bildung von Plättchen-Neutrophilen-Komplexen durch SDF-1 Rezeptorantagonismus in der polymikrobiellen Peritonitis und Sepsis	76
4.9. Reduktion inflammatorischer Zytokine und Chemokine im Plasma durch SDF-1 Rezeptorantagonismus.....	79
4.10. Einfluss der SDF-1 Rezeptorantagonisten auf die Zytokine im Plasma der A _{2B} -KO-Tiere bei Zymosan-induzierter Peritonitis und Sepsis und während polymikrobieller Peritonitis und Sepsis beim Wildtyp	81
4.11. Therapeutischer SDF-1 Rezeptorantagonismus: Reduktion der PMN-Organmigration und der Zytokine im Plasma	83
5. Diskussion.....	87
5.1. Limitationen der Studie und Ausblick zum klinischen Einsatz von CXCR4- und CXCR7-Antagonisten.....	96
6. Zusammenfassung	99
7. Abbildungsverzeichnis.....	101
8. Literaturverzeichnis.....	109
9. Erklärung zum Eigenanteil.....	121
10. Veröffentlichung	122
11. Danksagung	123

1. Abkürzungsverzeichnis

ABC	Avidin-Biotin-Komplex
AK	Antikörper
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
ARDS	Acute respiratory distress syndrome (Atemnotsyndrom des Erwachsenen)
ATP	Adenosintriphosphat
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BSA	Bovines Serumalbumin
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CD	Cluster of differentiation (immunphänotypische Oberflächenmerkmale)
CRP	C-reaktives Protein
CXCL	CXC-Chemokinligand
CXCR	CXC-Chemokinrezeptor
DAB	Diaminobenzidin
DAMP	Damage-associated molecular pattern (endogene Moleküle nach Gewebeverletzung)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay (enzymgekoppelter Immunadsorptionstest)
FACS	Fluorescence activated cell sorting (Durchflusszytometrie)
FIP	Fäkal-induzierte Peritonitis
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
fMLP	Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin
FP	Färbepuffer
FSGO	Fish skin gelatine oil (Fischhautölgelatine)
G-CSF	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
HRP	Horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
i.p.	Intraperitoneal

i.v.	Intravenös
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
KG	Körpergewicht
KO	Knockout (Abschalten eines Gens)
LPS	Lipopolysaccharid
MAP	Mean arterial pressure (mittlerer arterieller Druck)
MFI	Mediane Fluoreszenzintensität
MM	Mastermix
NET	Neutrophil extracellular traps (netzartige Gebilde ausgeschüttet aus Neutrophilen, hauptsächlich aus DNA bestehend)
NFW	Nuklease-freies Wasser
NGS	Normal goat serum (normales Ziegenserum)
NO	Stickstoffmonoxid
NRS	Normal rabbit serum (normales Hasenserum)
P	Signifikanzwert
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern (Pathogen- assoziiertes molekulares Muster)
PAP	Peroxidase-Anti-Peroxidase
PE-Cy7	Phycoerythrin-Cyanine 7
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
p_aO_2/F_iO_2	Arterieller O_2 -Partialdruck / inspiratorischer O_2 -Gehalt
PBS	Phosphate-buffered saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PFA	Paraformaldehyd
PL	Peritoneallavage
PM	Primermix
PMN	Polymorphonuclear leukocytes (neutrophiler Granulozyt)
PNC	Plättchen-Neutrophilen-Komplex
PSGL-1	P-Selektin Glykoprotein Ligand-1
qSOFA-Score	Quick sequential organ failure assessment score

	(vereinfachter Score des Organversagens bei Sepsis)
rpm	Revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SDF-1	Stromal cell-derived factor-1 (CXC-Chemokinligand 12)
SIRS	Systemic inflammatory response syndrome (generalisiertes inflammatorisches Antwortsyndrom)
SOFA-Score	Sequential organ failure assessment score (Score des Organversagens bei Sepsis)
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF α	Tumornekrosefaktor α
ZIP	Zymosan-induzierte Peritonitis

2. Einleitung

2.1. Sepsis

Sepsis ist trotz sinkender Sterblichkeitsraten die führende Todesursache unter kritisch Kranken (Kaukonen et al., 2014) und stellt mit einer Mortalität von 20 - 40 % (Martin et al., 2003, SepNet Critical Care Trials, 2016) eine große Herausforderung für die Intensivmedizin dar (Nasa et al., 2012). Im Jahr 2017 war die Behandlung der Sepsis mit 38,2 Milliarden Dollar die teuerste zu behandelnde Erkrankung in den USA (Liang et al., 2020).

2.1.1. Definition der Sepsis

Sepsis ist definiert als eine lebensbedrohliche Einschränkung der Organfunktionen durch eine fehlregulierte Immunreaktion auf der Grundlage einer Infektion (Singer et al., 2016). Die Organdysfunktion steht somit im Vordergrund. Sie wird durch einen Anstieg von mindestens zwei Punkten im Sequential (Sepsis-related) Organ Failure Assessment Score (SOFA-Score, siehe Abbildung 1) (Vincent et al., 1996) erfasst, der mit der Mortalität korreliert (Ferreira et al., 2001).

Organ	Parameter	1 Punkt	2 Punkte	3 Punkte	4 Punkte
Lunge	$\frac{P_aO_2}{F_iO_2}$	<400 mmHg	<300 mmHg	<200 mmHg	<100 mmHg
Leber	Bilirubin (mg/dl)	1,2 - 1,9	2,0 - 5,9	6 - 11,9	≥12
Niere	Kreatinin (mg/dl)	1,2 - 1,9	2,0 - 3,4	3,5 - 4,9	≥5
Kreislaufsystem	MAP (±Katecholamine)	<70	Katecholamine niedrig	Katecholamine mittel	Katecholamine hoch
Nervensystem	Glasgow Coma Scale	13-14	10-12	6-9	<6
Blutbild	Thrombozyten/nl	<150	<100	<50	<20

Abbildung 1: Sequential (Sepsis-related) Organ Failure Assessment Score (SOFA-Score). Ein Anstieg von mindestens zwei Punkten im SOFA-Score spricht für eine septische Organdysfunktion. MAP: Mean Arterial Pressure / mittlerer arterieller Druck. Das Verhältnis des arteriellen Sauerstoffpartialdrucks (P_aO_2) zur inspiratorischen Sauerstoffkonzentration (F_iO_2) wird als Horowitz-Quotient bezeichnet. (Vincent et al., 1996)

Um Patienten mit hohem Erkrankungsrisiko frühzeitig zu identifizieren, wird eine vereinfachte Version des SOFA-Scores verwendet, der quick SOFA-Score

(qSOFA-Score). Bei Zutreffen von zwei oder mehr der folgenden Punkte wird ein septisches Organversagen wahrscheinlicher (Singer et al., 2016):

- Verändertes Bewusstsein (Glasgow Coma Scale ≤ 13)
- Atemfrequenz $\geq 22/\text{min}$
- Systolischer Blutdruck $\leq 100 \text{ mmHg}$

Die Maximalausprägung der Sepsis ist der septische Schock und wird durch die folgenden klinischen Kriterien charakterisiert (Singer et al., 2016):

- Vasopressorengabe notwendig zum Erhalt eines mittleren arteriellen Druckes (MAP) von $>65 \text{ mmHg}$ trotz adäquater Volumengabe *und*
- Erhöhtes Serum Laktat von $>2 \text{ mmol/l}$

Hierbei kommt es zu einer extremen Reduktion der Kreislauf-, Stoffwechsel- und zellulären Funktionen, welche mit einer deutlichen Erhöhung der Sterblichkeit einhergeht.

2.1.2. Epidemiologie

Durch neue Definitionen, unterschiedliche Klassifikationssysteme und eine überwiegende Datenerfassung aus einkommensstarken Ländern kann die Inzidenz der Sepsis nur annähernd bestimmt werden. Sie nimmt zu (Kumar et al., 2011, Martin et al., 2003, Esper et al., 2006) und lag in den USA im Jahr 2001 bei ca. 300/100.000 Einwohner mit 751.000 nationalen Fällen (Angus et al., 2001). Veränderungen der Inzidenz der Sepsis können auch altersbedingt sein. Beispielsweise sind Säuglinge (<12 Monate) mit 5,3/1000 Einwohner stärker betroffen als Kinder zwischen fünf – 14 Jahren (0,2/1000 Einwohner). Deutlich gesteigert ist die Inzidenz auch bei Menschen ab 85 Jahren (26,2/1000 Einwohner) (Angus et al., 2001). Ebenso steigt mit höherem Alter die Mortalität der Sepsis (10 % bei Kindern im Alter von zehn bis 14 Jahren versus 38,4 % bei über 85-Jährigen). Weitere Faktoren einer erhöhten Mortalität sind vermehrte Komorbiditäten, weibliches Geschlecht sowie Infektionen mit Staphylokokken (besonders Methicillin-resistente Staphylokokken) oder Pseudomonas-Spezies (Angus et al., 2001, Nasa et al., 2012, Vincent et al., 2006). Insgesamt ist die Mortalität der Sepsis vermutlich aufgrund einer verbesserten und frühen Therapie

rückläufig (Cecconi et al., 2018, Hotchkiss et al., 2016), während die Zahl der Gesamttodesfälle wegen der steigenden Inzidenz zunimmt. Die Gesamtsterblichkeitsrate lag in den USA im Jahr 2001 bei 28,6 % mit 215.000 an Sepsis verstorbenen Patienten (Martin et al., 2003). Diese steigt weiter mit der Schwere der Erkrankung. Die Krankenhaussterblichkeit lag in Deutschland nach Anwendung der Definition von „schwerer Sepsis“ (Sepsis mit Organversagen in vorherigen Definitionen der Sepsis) oder „septischem Schock“ bei 40,4 % im Vergleich zu 9,6 % in Patienten ohne Sepsis (SepNet Critical Care Trials, 2016). Bessere Zugangsmöglichkeiten und intensivmedizinische Kapazitäten wirken sich auf die Prävalenz der Sepsis innerhalb der Intensivpatienten aus. In Deutschland und den USA ist sie beispielsweise deutlich niedriger als in Großbritannien (27 % in Großbritannien versus zwölf Prozent in den USA und 12,6 % in Deutschland) (SepNet Critical Care Trials, 2016, Mayr et al., 2014).

2.1.3. Ätiologie

Da eine Sepsis aus jeder infektiösen Erkrankung resultieren kann, können ihr diverse Ursachen zugrunde liegen. Insgesamt wird das verursachende Pathogen nur in etwa 60 % der Fälle nachgewiesen (Vincent et al., 2006). Der Infektfokus liegt am häufigsten im respiratorischen System (68 %), dem Abdomen (22 %), dem Gefäßsystem (20 %) und den Harnwegen (14 %) (Vincent et al., 2006). Diese prozentuelle Verteilung entspricht in etwa der Verteilung der Infektionen aller Intensivpatienten (Vincent et al., 2009). Der Anteil grampositiver Erreger nahm in den USA zwischen 1979 und 2000 zu (Martin et al., 2003). Wissenschaftlich wird kontrovers diskutiert ob derzeit die grampositiven oder gramnegativen Infektionen bei einer Sepsis überwiegen (Cecconi et al., 2018, Vincent et al., 2018).

Die Peritonitis ist eine häufige Ursache einer Sepsis (Vincent et al., 2006). Intraabdominelle Infektionen werden unterteilt in unkomplizierte und komplizierte Infektionen, wobei sich die unkomplizierten Infektionen auf ein abdominelles Organ beschränken und die komplizierten auch auf das Peritoneum übergreifen (Lopez et al., 2011, Pieracci und Barie, 2007). Die Peritonitis ist daher eine komplizierte intraabdominelle Infektion, bei der wiederum eine lokalisierte von

einer generalisierten Form unterschieden wird. Es erfolgt zudem eine klinische Einteilung in eine primäre, eine sekundäre und eine tertiäre Form der Peritonitis (Lopez et al., 2011). Die primäre Peritonitis tritt spontan ohne Vorliegen einer abdominellen Pathologie oder offensichtlichen Infektquelle auf (Ross et al., 2018, Spalding und Williamson, 2008). Bei Erwachsenen ist als häufigstes Beispiel die spontan bakterielle Peritonitis im Rahmen einer Leberinsuffizienz und Aszites zu nennen (Spalding und Williamson, 2008). Die sekundäre Peritonitis entsteht auf der Grundlage einer abdominellen Vorerkrankung. Sie ist durch eine Unterbrechung der Darmkontinuität oder Barrierefunktion aufgrund von Perforation oder Ischämie gekennzeichnet und spielt aufgrund der polymikrobiellen Entzündung eine vordergründige Rolle für das Entstehen einer Sepsis (Lopez et al., 2011, Ross et al., 2018, Pieracci und Barie, 2007). Elf Prozent der Patienten mit sekundärer Peritonitis entwickeln eine „schwere Sepsis“ (Anaya und Nathens, 2003). Die tertiäre Peritonitis beschreibt eine persistierende Infektion 48 Stunden nach einem Therapieversuch (Lopez et al., 2011, Ross et al., 2018).

Eine weitere Einteilung der intraabdominellen Infektionen findet noch in ambulant und nosokomial erworbene Infektionen statt. Dabei ist die Mortalität der nosokomial erworbenen intraabdominellen Infektionen aufgrund des reduzierten Gesundheitszustands der Patienten und des häufigeren Auftretens multiresistenter Erreger deutlich erhöht (Pieracci und Barie, 2007).

2.1.4. Risikofaktoren

Die Risikofaktoren für eine Sepsis setzen sich aus denen für eine Infektion und denen für das Fortschreiten von einer Infektion zu einer dysregulierten Immunantwort und Organversagen zusammen. Dabei sind die Risikofaktoren für eine Infektion besser verstanden als diejenigen für den Übergang von einer Infektion zu einer Sepsis und Organversagen (Cecconi et al., 2018, Mayr et al., 2014).

Sehr hohes oder niedriges Alter, männliches Geschlecht, Komorbiditäten (chronisch obstruktive Lungenerkrankung, Krebserkrankungen, Humanes Immundefizienz-Virus, chronische Leber- oder Nierenerkrankungen oder

Diabetes), modifizierbare Risikofaktoren (z.B. Alkoholkonsum) und auch ethnische Zugehörigkeit (nicht-weiße Hautfarbe) sind Faktoren, welche mit einem erhöhten Risiko für eine Sepsis assoziiert sind (Angus et al., 2001, Vincent et al., 2006, Esper et al., 2006, Gotts und Matthay, 2016, Cecconi et al., 2018). Die meisten dieser Risikofaktoren erhöhen die Wahrscheinlichkeit einer Infektion und damit auch die einer Sepsis (Cecconi et al., 2018). Weibliches Geschlecht erhöht das Risiko einer urogenitalen Sepsis (Angus et al., 2001), während die Rate grampositiver Infektionen bei Männern und Menschen mit schwarzer Hautfarbe erhöht ist (Esper et al., 2006). Polymorphismen bestimmter Gene (wie beispielsweise des Toll-like Rezeptors 2) können bei Patienten ohne vorbekannte Immundefizienz zudem die Anfälligkeit gegenüber Infektionen signifikant erhöhen (Boyd et al., 2014, Sutherland et al., 2005).

Eine wichtige Rolle bezüglich des Risikos für Organversagen und Sepsis bei Patienten mit einer Infektion spielen neben Faktoren des auslösenden Pathogens wirtsabhängige Faktoren (Genetik, Komorbiditäten) (Cecconi et al., 2018). Beispielsweise wurde in Bezug auf die genetische Veranlagung von Organdysfunktionen während Infektionen für einen Interleukin-8 Polymorphismus ein Zusammenhang mit verschlechterter Lungenfunktion bei schwerkranken Patienten beschrieben (Boyd et al., 2014, Wacharasint et al., 2012). Genetische Prädispositionen sind somit sowohl beim Abwehren von Infektionen als auch beim Übergang von Infektion zu Sepsis von Bedeutung (Thompson et al., 2014, Barber et al., 2004, Boyd et al., 2014).

2.1.5. Klinik und Therapie

Die Symptome einer Sepsis resultieren aus einer Konfrontation des Immunsystems mit einer Infektion. Da der Körper auf körpereigene Alarmsignale (z.B. während einer Pankreatitis oder Autoimmunerkrankungen) ähnlich wie auf Pathogene reagiert (Vincent et al., 2013), entsprechen die Symptome einer Sepsis auch denen anderer schwerer Erkrankungen. Sepsis sollte bei allen Patienten mit einer unklaren akuten Verschlechterung des Allgemeinzustands in Betracht gezogen werden.

Vor Einführung des SOFA-Scores gaben die Kriterien des „Systemic Inflammatory Response Syndrom“ (SIRS) Hinweise auf eine Infektion, wobei hierfür zwei oder mehr der folgenden Punkte erfüllt sein mussten (Bone et al., 1992):

- Temperatur: $>38\text{ °C}$ oder $<36\text{ °C}$
- Herzfrequenz: $>90/\text{min}$
- Atemfrequenz: $>20/\text{min}$ oder $\text{PaCO}_2 <32\text{ mmHg}$
- Leukozyten: $>12000/\mu\text{l}$ oder $<4000/\mu\text{l}$ oder $>10\%$ unreife neutrophile Granulozyten / stabkernige Granulozyten

Allerdings liegen die Kriterien bei vielen Intensivpatienten vor (Churpek et al., 2015) und etwa jeder achte Patient mit Sepsis hat weniger als zwei SIRS-Kriterien und ist demnach „SIRS-negativ“ (Kaukonen et al., 2015). Aufgrund dieser unzureichenden Spezifität und Sensitivität wurden die SIRS-Kriterien zur Definition der Sepsis verlassen.

Beim Vorliegen einer Sepsis spielt die Zeit, besonders die des Therapiebeginns, eine wichtige Rolle. Daher hat die Surviving Sepsis Campaign 2018 das „1-Hour-Bundle“ veröffentlicht (Levy et al., 2018), das die wichtigsten therapeutischen und diagnostischen Maßnahmen zusammenfasst, die zumindest innerhalb der ersten Stunde nach Vorstellung begonnen werden sollten:

- Der Laktatspiegel muss kontrolliert werden und falls er über zwei mmol/l liegt nach zwei bis vier Stunden erneut bestimmt werden.
- Blutkulturen sollten, wenn möglich vor Beginn der antibiotischen Therapie, abgenommen werden, die Antibiotikatherapie jedoch nicht bis zu deren Abnahme verzögert werden.
- Es muss so früh wie möglich eine kalkulierte Breitspektrum-Antibiose begonnen werden und diese nach Erhalt der mikrobiologischen Befunde angepasst oder beendet werden.
- Die Flüssigkeitssubstitution (mindestens 30 ml/kg Körpergewicht) muss sofort bei allen Patienten mit Sepsis, Hypotension oder erhöhten

Laktatwerten begonnen und innerhalb von drei Stunden abgeschlossen werden.

- Erreicht der Blutdruck unter Volumengabe nicht innerhalb der ersten Stunde den Normalbereich, sollte die Gabe von Vasopressoren erfolgen (Ziel des mittleren arteriellen Druckes: ≥ 65 mmHg).

2.1.6. Pathophysiologie

Sepsis führt über eine Dysregulation der Immunantwort zu einer Schädigung einer Vielzahl von Organsystemen, wobei sowohl proinflammatorische als auch immunosuppressive Mechanismen gleichzeitig wirken (Munford und Pugin, 2001). Die genaue Pathophysiologie dieses Krankheitsbildes ist jedoch immer noch nicht vollständig geklärt.

Der Ursprung einer Sepsis ist eine Infektion und damit die Invasion und Vermehrung eines pathogenen Organismus im Körper. Dieses Pathogen kann durch Bakterien, Pilze, Viren oder Parasiten repräsentiert sein. Nicht nur die klassischen Zellen der angeborenen Immunabwehr wie Makrophagen, dendritische Zellen oder neutrophile Granulozyten, sondern auch Epithelzellen (Gomez et al., 2014), Endothelzellen, Fibroblasten, Kardiomyozyten (Takeuchi und Akira, 2010, Walley, 2018) oder Thrombozyten (Semple et al., 2011) spielen bei der Erkennung von Pathogenen eine wichtige Rolle. Sie registrieren über die Pattern Recognition Receptors (PRR) die Anwesenheit von Pathogen- oder Damage-Associated Molecular Patterns (PAMPs / DAMPs). Zu den wichtigen Vertretern der PAMPs zählen das Lipopolysaccharid bei gramnegativen Bakterien (Uhle et al., 2015, Moriyama und Nishida, 2021) und das Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP) im Allgemeinen bei Bakterien (Li et al., 2016). Zymosan als Bestandteil der Zellwand bei Hefepilzen ist als Vertreter der PAMPs ebenfalls zu nennen (Volman et al., 2005). Zu den DAMPs gehören unter anderem das Adenosintriphosphat (ATP) und die mitochondriale Desoxyribonukleinsäure (DNA) (Gotts und Matthay, 2016). Durch die PRRs werden intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert, welche Transkriptionsfaktoren wie Nuclear Factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells (NfκB) aktivieren (Schroder und Tschopp, 2010). Unter anderem Leukozyten schütten

daraufhin eine Vielzahl unterschiedlicher Zytokine aus, darunter Tumornekrosefaktor α (TNF α), Interleukin-1 (IL-1) und Interleukin-6 (IL-6) (Gotts und Matthay, 2016). Die Zytokinfreisetzung führt zu einer Modulation verschiedenster Systeme wie dem Immunsystem, der Gerinnung, dem Hormonhaushalt, dem Stoffwechsel oder der Gefäß- und Kreislauffunktion (Abraham und Singer, 2007).

Organdysfunktionen bei Sepsis

Verschiedene Organsysteme werden während einer Sepsis in ihrer Funktion beeinträchtigt. Dazu gehören das Gehirn, die Lunge, die Nieren, die Leber, das Herzkreislauf- und das Immunsystem (siehe Abbildung 2). Neben den direkten Schäden durch das Pathogen kommt es durch die körpereigene Immunantwort sowohl zellvermittelt als auch durch inflammatorische Mediatoren zu einer Organdysfunktion.

Eine Modulation der Gefäß- und Kreislauffunktion betrifft alle Organe und spielt in der Pathophysiologie der Sepsis eine wichtige Rolle. Hierbei verändern mehrere Mechanismen das zirkulierende Volumen und führen zu einem Volumenmangel. Hauptursache der Hypotonie während der Sepsis ist ein reduzierter Gefäßtonus verursacht vor allem durch Stickstoffmonoxid (NO) und Prostaglandine (Russell et al., 2018). Zudem reduziert sich durch eine Abnahme der Tight Junctions (auch: „Zonulae occludens“) die Barrierefunktion des Endothels und es kommt zu einem verstärkten Flüssigkeitsübertritt aus den Gefäßen ins Interstitium. Dies geschieht durch proinflammatorische Mediatoren ausgeschüttet von Immunzellen wie aktivierten neutrophilen Granulozyten oder durch DAMPs (Deutschman und Tracey, 2014, Russell et al., 2018). Die Reduktion der Permeabilitätsbarriere dient zum einen der Migration von Immunzellen in Richtung des Infektfokus (Hotchkiss et al., 2016), verursacht allerdings auf der anderen Seite auch die Bildung eines interstitiellen Ödems durch den Übertritt von Flüssigkeit. Die Permeabilitätsstörung und das interstitielle Ödem beeinträchtigen ebenfalls die Organfunktion (Russell et al., 2018). Sehr gut kann dies in der Lunge veranschaulicht werden, wo das interstitielle bzw. alveoläre Ödem im Rahmen des Acute Respiratory Distress

Syndrom (ARDS) zu einer reduzierten Oxygenierung bzw. Decarboxylierung des Blutes führt (Bos und Ware, 2022). Auch in Darm, Leber, Niere und zentralem Nervensystem resultieren aufgrund der Permeabilitätsstörungen Organdysfunktionen (Abbildung 2) (Gotts und Matthay, 2016). Im Rahmen der Inflammation kommt es zu einer Aktivierung des Gerinnungssystems und hierbei vor allem zu einer Aktivierung der Thrombozyten. Die Aktivierung der Thrombozyten resultiert in der Bildung von Mikrothromben, welche die Mikrozirkulation stören und die Organfunktionen zusätzlich beeinträchtigen können. Der Verbrauch der Thrombozyten führt in Kombination mit einer septischen Knochenmarksdepression zu einer Reduktion der Plättchen im Blut (Thrombozytopenie) (Vardon-Bounes et al., 2019).

Eine reduzierte kardiale Funktion trägt neben den Störungen auf vaskulärer Ebene zusätzlich zur eingeschränkten Kreislauffunktion bei. Dies ist vordergründig auf funktionelle und weniger auf strukturelle Defizite zurückzuführen (Rudiger und Singer, 2007). So wird beispielsweise durch Interaktion der Kardiomyozyten mit Leukozyten die Calciumfreisetzung im Herzmuskel und somit die Kontraktilität vermindert. Unter anderem durch die zusätzlich reduzierte Nachgiebigkeit des Herzmuskels in der Füllungsphase (diastolische Compliance) resultiert ein hypodynamer Kreislauf (Walley, 2018). Septisch bedingte Störungen der Zellorganellen, insbesondere der Mitochondrien, führen neben dem Herzen auch in weiteren Organen zu einer Abnahme der Organfunktionen (Abbildung 2) (Rudiger und Singer, 2007, Takasu et al., 2013, Gomez et al., 2014, Singer, 2014, Cecconi et al., 2018, Szabó und Módis, 2010, Deutschman und Tracey, 2014, Walley, 2018).

Auch das Immunsystem ist während einer Sepsis fehlreguliert. Zu Beginn dominiert durch Aktivierung des angeborenen Immunsystems oft eine hyperinflammatorische Immunlage, die allerdings gleichzeitig oder im Verlauf mit einer Immunsuppression insbesondere durch eine Hemmung des adaptiven Immunsystems einhergeht (Hotchkiss et al., 2013b). Die Inflammationsreaktion während einer Sepsis beeinflusst die Funktion des Knochenmarks und der dort vorhandenen Stammzellen, wodurch beispielsweise die Reifung von

Lymphozyten beeinträchtigt wird (Skirecki et al., 2015, Venet und Monneret, 2018). Somit ist zumindest teilweise die blutbildende Funktion des Knochenmarks eingeschränkt, welche als Myelosuppression bezeichnet wird. Sowohl die Apoptose von T-Zellen, B-Zellen und dendritischen Zellen als auch die gestörte Funktion und gesteigerte immunsuppressive Aktivität des adaptiven und auch des angeborenen Immunzellen spielen darüber hinaus eine Rolle bei der Inhibition des Immunsystems (Venet und Monneret, 2018, Hotchkiss et al., 2013b).

Die folgende Abbildung fasst die Organdysfunktionen im Rahmen einer Sepsis zusammen.

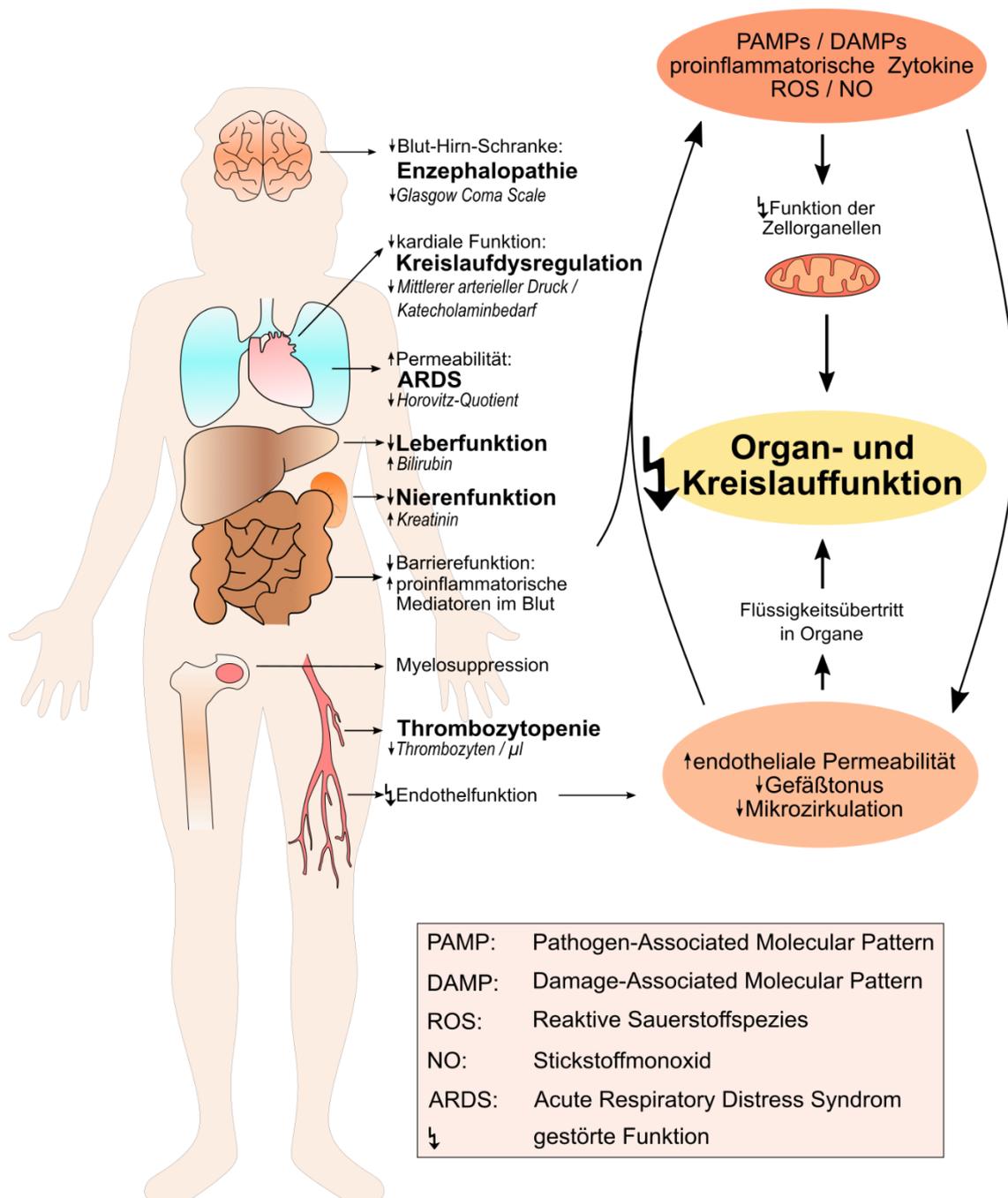


Abbildung 2: Organdysfunktionen bei Sepsis: Zahlreiche Organe und Organsysteme sind während Sepsis in ihrer Funktion gestört. Eine Infektion führt zu einer Erhöhung der proinflammatorischen Mediatoren im Blut. Diese beeinflussen die Funktionen des Endothels und verschiedener Zellorganellen und führen zu einer Reduktion der Organfunktionen und einer Dysregulation des Kreislaufs. Durch die entstandenen Schäden (DAMPs) und weitere Mechanismen (wie bspw. die gestörte Barrierefunktion des Darmepithels) wird die Inflammationsreaktion weiter angetrieben und verstärkt sich selbst. Die im SOFA-Score (siehe oben) erscheinenden Organsysteme bzw. Parameter wurden fett bzw. kursiv hervorgehoben. PAMP: Pathogen-Associated Molecular Pattern, DAMP: Damage-Associated Molecular Pattern, ROS: Reaktive Sauerstoffspezies, NO: Stickstoffmonoxid, ARDS: Acute Respiratory Distress Syndrom. Der Blitz symbolisiert Dysregulation. Eigene Darstellung nach den angegebenen Quellen (Gotts und Matthay, 2016, Abraham und Singer, 2007, Cecconi et al., 2018, Singer, 2014).

Neutrophile Granulozyten und Sepsis

Neutrophile Granulozyten („polymorphonuclear leukocytes“, PMNs) sind Zellen der angeborenen Immunabwehr und spielen eine wichtige Rolle in der frühen Bekämpfung pathogener Organismen. Dies geschieht durch Phagozytose, durch Ausschütten ihrer antimikrobiellen Granula und durch Freisetzung extrazellulärer DNA-Netze (NET-Formation, „neutrophil extracellular traps“, „NETosis“) (Kolaczkowska und Kubes, 2013). Sie werden aus dem Blut durch gewebsständige Immunzellen (Makrophagen, dendritische Zellen) über Adhäsionsmoleküle auf den Endothelzellen und Chemokine zum Inflammationsherd rekrutiert (Phillipson und Kubes, 2011). Chemotaktische Gradienten von Mediatoren wie Interleukin-8 oder Leukotrien-B₄, sowie die Downregulation von Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1/CXCL12, siehe Abbildung 4) im Knochenmark regulieren die Freisetzung weiterer neutrophiler Granulozyten aus dem Knochenmark ins Blut (Furze und Rankin, 2008). In Nagetieren wird die Freisetzung von PMNs aus dem Knochenmark vornehmlich durch CXCL1 und CXCL2/3 gesteuert (Phillipson und Kubes, 2011).

Trotz ihrer wichtigen Funktion in der frühen Immunabwehr kann eine übermäßige oder ungerichtete Aktivierung der PMNs gesundes Parenchym schädigen (Phillipson und Kubes, 2011). Über die Freisetzung zytotoxischer und proinflammatorischer Stoffe (reaktive Sauerstoffspezies, Enzyme, Zytokine und kationischen Polypeptide) oder NETs vermitteln sie Gewebsschäden (Grommes und Soehnlein, 2011, Clark et al., 2007) und beeinflussen die Endothelfunktion und die endotheliale Permeabilität (Russell et al., 2018). Zudem sind neutrophile Granulozyten bei Sepsis in ihrer Funktion gestört. Die Chemotaxis zum Infektionsherd wird durch erhöhte Konzentrationen inflammatorischer Zytokine im Gefäßsystem und eine gestörte Funktion der PRRs (bspw. der Toll-like Rezeptoren) beeinträchtigt. Die Transmigration durch das Endothel und das Gewebe wird zusätzlich durch eine erhöhte Rigidität der Zellmembran behindert und die Zell-Zell-Interaktion durch inflammatorische Zytokine, bakterielle Produkte und Stickstoffmonoxid verschlechtert (Reddy und Standiford, 2010, Hotchkiss et al., 2013b).

Thrombozyten und Sepsis

Neben ihrer Funktion in der Blutgerinnung sind Thrombozyten wichtige Zellen der Immunabwehr. Ihre hohe Anzahl, die Fähigkeit Pathogene zu erkennen und einzufangen und die Möglichkeit andere Immunzellen zu aktivieren macht sie für die Initiation und die Aufrechterhaltung der Immunantwort unabdingbar (Semple et al., 2011, Phillipson und Kubes, 2011, Engelmann und Massberg, 2013). Eine Thrombozytopenie geht im Rahmen der Sepsis mit einer verschlechterten Prognose bei Intensivpatienten einher und ist Teil des SOFA-Scores (siehe Abbildung 1) (Vincent et al., 1996, Vardon-Bounes et al., 2019).

Ein Beispiel für das Zusammenspiel der Thrombozyten mit der angeborenen Immunabwehr ist die Bildung von Plättchen-Neutrophilen-Komplexen (PNCs), die eine wichtige Rolle in der Aktivierung neutrophiler Granulozyten spielen (Semple et al., 2011). Thrombozyten erkennen Pathogene (zum Beispiel durch den Toll-like Receptor-4) und werden durch diese aktiviert (Semple et al., 2011). Aktivierte Plättchen exprimieren verstärkt Selektine. Selektine spielen eine wichtige Rolle in der Zell-Zell-Interaktion und sind an der Adhäsion von Leukozyten am Endothel und deren Migration zum Entzündungsort beteiligt (McEver, 2015). Sie vermitteln darüber hinaus Interaktionen der Leukozyten untereinander und zwischen Leukozyten und Thrombozyten (McEver, 2015). Aktivierte Thrombozyten induzieren durch Interaktionen mit PMNs eine verstärkte Expression von P-Selektin Glykoprotein Ligand-1 (PSGL-1) auf neutrophilen Granulozyten, wodurch sie in der Lage sind diese zu aktivieren (Semple et al., 2011, Vardon-Bounes et al., 2019). Dies verstärkt die Immunabwehr durch neutrophile Granulozyten, beispielsweise über die Induktion der Freisetzung neutrophiler extrazellulärer DNA-Netze (Clark et al., 2007). Weiterhin wurde eine verstärkte P-Selektin Expression auf den Thrombozyten septischer Patienten mit einer verstärkten Ausschüttung von Plättchen-Mikropartikeln in Verbindung gebracht (Semple et al., 2011). Diese aus der Zellmembran entstammenden Partikel sind durch Oberflächenmoleküle wie P-Selektin in der Lage weitere Thrombozyten, Endothelzellen oder Leukozyten zu aktivieren (Semple et al., 2011).

Eine Thrombozytopenie während Sepsis ist daher nicht nur durch eine Knochenmarkssuppression und die Aktivierung der Gerinnung zu erklären, sondern auch durch deren Immunfunktion und das Anheften an Endothelien und anderen Immunzellen (Phillipson und Kubes, 2011). Aus der aktivierten Gerinnung und der Reduktion der Thrombozyten resultiert eine durch den Verbrauch an Gerinnungsfaktoren gekennzeichnete Verbrauchskoagulopathie (Extremform: disseminierte intravasale Gerinnung) (Levi, 2001). Sie trägt zur hohen Mortalität und dem Multiorganversagen einer Sepsis durch Mikrozirkulationsstörungen und eine erhöhte Blutungsneigung weiter bei (Semple et al., 2011, Gotts und Matthay, 2016).

Abbildung drei fasst die Interaktion zwischen Thrombozyten und neutrophilen Granulozyten im Gefäßsystem sowie die daran beteiligten Rezeptoren zusammen.

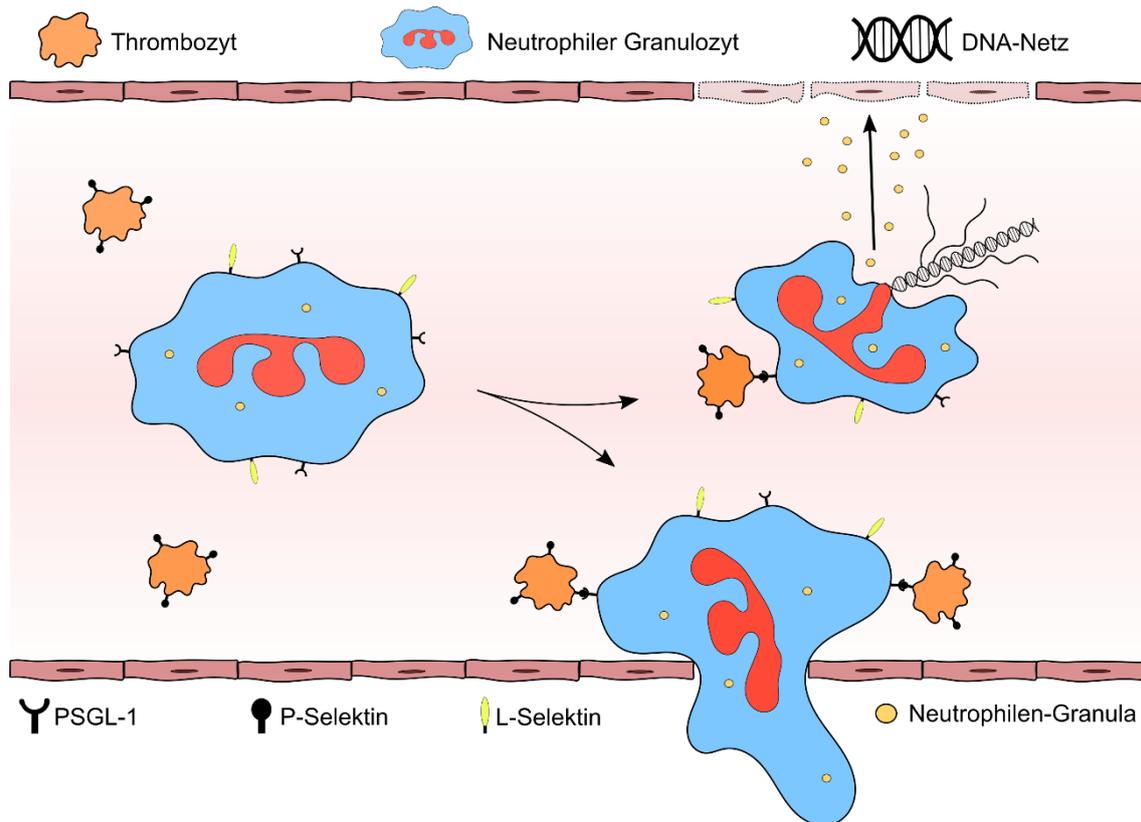


Abbildung 3: Plättchen-Neutrophilen-Komplexe (PNCs) und die daran beteiligten Selektine. Thrombozyten binden und aktivieren neutrophile Granulozyten. Hierdurch werden proinflammatorische Granula aus den PMNs freigesetzt und die endotheliale Permeabilität erhöht. Darüber hinaus induzieren aktivierte Thrombozyten die NETosis (Freisetzung extrazellulärer DNA-Netze) aus PMNs und die Migration der PMNs ins Gewebe. An den dargestellten Vorgängen sind weitere Rezeptoren beteiligt, die aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt werden. Es ist eine eigene Darstellung in Bezug auf die angegebenen Quellen. In der Legende sind die beteiligten Zellen, die Rezeptoren, die NETs und die Neutrophilen-Granula dargestellt (Semple et al., 2011, Vardon-Bounes et al., 2019, McEver, 2015, Sreeramkumar et al., 2014, Etulain et al., 2015).

2.2. SDF-1 Rezeptoren in der Inflammation

Das Chemokin Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) aus der Klasse der CXC-Chemokine wird nahezu ubiquitär exprimiert und besitzt zwei bekannte Rezeptoren: CXC-Rezeptor vier (CXCR4) und CXC-Rezeptor sieben (CXCR7). SDF-1 ist in verschiedene physiologische Prozesse involviert. Es reguliert gemeinsam mit CXCR4 die Knochenmarkskolonisation hämatopoetischer Stammzellen, die Differenzierung von B-Lymphozyten und spielt eine wichtige Rolle in der Organogenese (Zou et al., 1998). Darüber hinaus ist SDF-1 bei unterschiedlichen pathologischen Vorgängen verstärkt exprimiert, darunter während Inflammation, Hypoxie oder malignen Erkrankungen (Wang et al., 2018, Teicher und Fricker, 2010).

Wie in Abbildung vier gezeigt reguliert SDF-1 im Knochenmark gemeinsam mit seinem Rezeptor CXCR4 die Freisetzung von myeloischen Zellen (wie neutrophilen Granulozyten) aber auch lymphatischen Zellen ins Blut (Liu et al., 2015). SDF-1 wird von den Stromazellen im Knochenmark exprimiert und inhibiert über seinen chemotaktischen Gradienten die Migration der PMNs ins Blut. Durch den Granulozyten-Kolonie stimulierenden Faktor (G-CSF) wird die SDF-1 Expression der Stromazellen sowie der CXCR4-Rezeptor der PMNs inhibiert und die neutrophilen Granulozyten gelangen in das Blut (Summers et al., 2010). Während inflammatorischer Prozesse ist hingegen die Produktion von SDF-1 im entzündeten Gewebe erhöht und es ist, neben anderen chemotaktisch wirksamen Zytokinen, wichtig für die Migration neutrophiler Granulozyten vom Kreislauf in Richtung Infektfokus (Summers et al., 2010, Konrad et al., 2017). Durch eine inflammationsbedingte Hochregulation der SDF-1 Rezeptoren der PMNs wird dies weiter gefördert (Summers et al., 2010). Chemotaktische Gradienten spielen insbesondere im Anschluss an die Migration durch das Endothel eine wichtige Rolle in der Neutrophilen-Migration (Kolaczkowska und Kubes, 2013). Neben den gewebspezifischen Zellen sind Thrombozyten ebenfalls eine wichtige SDF-1 Quelle in der Inflammation. Hierdurch wird die Migration und Aktivierung der Leukozyten beeinflusst (Chatterjee et al., 2015, Stellos et al., 2008). An der PMN-Organmigration während Inflammation sind beide bekannten Rezeptoren für SDF-1 involviert (Xu et al., 2007, Summers et al., 2010, Ngamsri et al., 2017). Jedoch scheint CXCR7 mit seiner erhöhten SDF-1 Affinität besonders in der Frühphase der Entzündung eine Rolle im PMN-Influx zu spielen (Ngamsri et al., 2017, Wang et al., 2018), während CXCR4 bei akuten Lungenschäden erst nach 24 Stunden am stärksten auf den neutrophilen Granulozyten exprimiert wird (Petty et al., 2007). Die Abbildung vier gibt einen Überblick über den Einfluss von SDF-1 und dessen Rezeptoren unter physiologischen Bedingungen und während Inflammation.

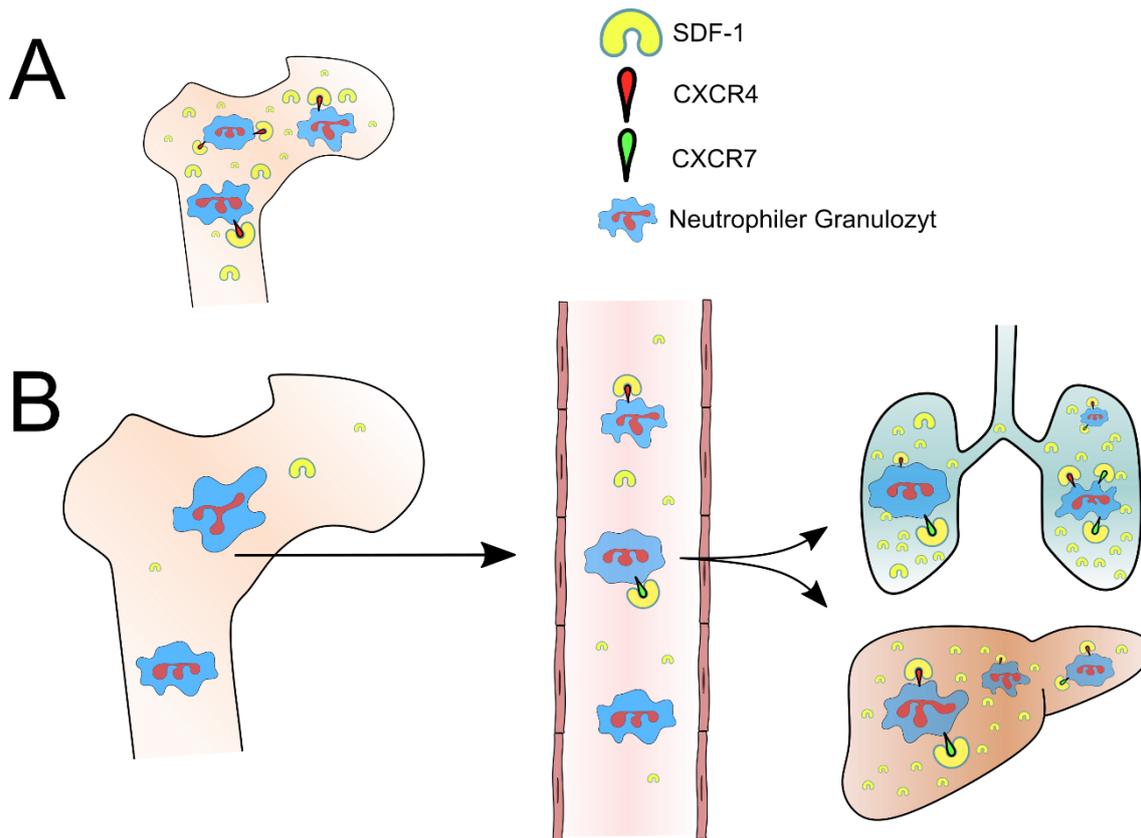


Abbildung 4: SDF-1, CXCR4 und CXCR7 und ihre Rolle in der Neutrophilen-Migration. Nach eigener Darstellung abgebildet sind SDF-1 (gelb) und seine Rezeptoren CXCR4 (rot) und CXCR7 (grün) unter physiologischen Bedingungen im Knochenmark (A) und während Inflammation (B). (A) SDF-1 (aus den Knochenmarks-Stromazellen) hält gemeinsam mit CXCR4 (auf den PMNs) in Abwesenheit einer Inflammation als Retentionsfaktor die PMNs im Knochenmark und hindert sie an der Migration ins Blut. (B) Durch die inflammatorische Reduktion der SDF-1 Expression der Stromazellen im Knochenmark werden die neutrophilen Granulozyten ins Blut freigesetzt. Während Sepsis ist durch die generalisierte Inflammation die SDF-1 Expression der Organe erhöht, die PMNs migrieren aus dem Blut in das Gewebe und vermitteln dort Organschäden (Summers et al., 2010, Liu et al., 2015, Xu et al., 2007, Phillipson und Kubes, 2011, Grommes und Soehnlein, 2011, Clark et al., 2007).

Beide Rezeptoren unterscheiden sich in den von ihnen ausgelösten Signalkaskaden. CXCR4 ist hauptsächlich über die Aktivierung von G-Proteinen aktiv, wohingegen CXCR7 als „atypischer Chemokinrezeptor drei“ (ACKR3) vornehmlich keine G-Proteine aktiviert (Tsou et al., 2018, Wang et al., 2018). Die Aktivierung von inhibitorischen G-Proteinen durch CXCR4 führt zur Aktivierung der „Extracellular-signal Regulated Kinase 1/2“ (ERK1/2), des „Phosphoinositid-3-Kinase / Proteinkinase B“ Signalweges (PI3K/Akt-Signalweg) und von NfκB. Darüber hinaus beeinflusst CXCR4 den „Januskinase / Signal Transducers and Activators of Transcription“ Signalweg (JAK/STAT-Signalweg) und wirkt über beta-Arrestin (Tsou et al., 2018). Hierdurch werden Chemotaxis, Genexpression und Zellzyklus beeinflusst (Tsou et al., 2018, Teicher und Fricker, 2010). CXCR7

wurde initial ausschließlich als Decoy-Rezeptor betrachtet, der mit seiner höheren Affinität für SDF-1 (Wang et al., 2018) als „Köder“ und damit kompetitiv antagonistisch um SDF-1 mit CXCR4 wirkt (Boldajipour et al., 2008). Er erleichtert hierdurch den Aufbau chemotaktischer Gradienten (Huynh et al., 2020). Jedoch werden auch intrazelluläre Effekte über CXCR7 vermittelt: CXCR7 kann sowohl inhibierend als auch verstärkend auf die SDF-1/CXCR4 Achse durch Heterodimerisation mit CXCR4 und durch Rekrutierung von β -Arrestin wirken (Levoye et al., 2009, Huynh et al., 2020).

2.3. Adenosinrezeptor A_{2B} in der Inflammation

Sowohl ATP als auch Adenosin sind für die Regulation von Entzündungsprozessen von Bedeutung und ihre extrazellulären Konzentrationen können akut während Inflammation stark ansteigen (Ohta und Sitkovsky, 2001, Bours et al., 2006). Durch hohe intrazelluläre Konzentrationen spielt insbesondere ATP als DAMP eine wichtige Rolle und wird beim Zelluntergang freigesetzt (Gotts und Matthay, 2016). Zusätzlich können sowohl ATP als auch Adenosin aktiv im Rahmen einer Inflammation durch zum Beispiel neutrophile Granulozyten sezerniert werden (Bours et al., 2006). Bei der Kontrolle extrazellulärer ATP- und Adenosinkonzentrationen spielen Ektoenzyme eine wichtige Rolle (Bours et al., 2006). Die Apyrase CD39 baut ATP zu Adenosindiphosphat (ADP) und Adenosinmonophosphat (AMP) ab und die 5'-Nukleotidase CD73 reguliert als Schlüsselenzym den Abbau von AMP zu Adenosin (Barletta et al., 2012). Beide Ektoenzyme können membrangebunden oder in löslicher Form vorkommen (Bours et al., 2006). Das extrazelluläre Adenosin besitzt nur eine kurze Halbwertszeit und wird entweder von der Adenosindeaminase zu Inosin abgebaut oder von der Adenosinkinase wieder zu AMP phosphoryliert (Barletta et al., 2012).

Extrazelluläres Adenosin bindet an einen der vier G-Protein gekoppelten Adenosinrezeptoren (Barletta et al., 2012). Die Adenosinrezeptoren A₁ und A₃ werden aufgrund ihrer hohen Affinität zu Adenosin durch niedrige Adenosinkonzentrationen aktiviert, wohingegen erst hohe Adenosinkonzentrationen die Adenosinrezeptoren A_{2A} und A_{2B} aktivieren

können. Alle vier Adenosinrezeptoren werden von neutrophilen Granulozyten exprimiert. Neutrophile Granulozyten können darüber hinaus nach Aktivierung die extrazelluläre Adenosinkonzentration weiter erhöhen, sowohl über die Freisetzung von ATP oder Adenosin als auch über die Inhibierung der Adenosindeaminase (Barletta et al., 2012, Bours et al., 2006). Bei niedrigen Konzentrationen fördert Adenosin über A1 und A3 die PMN-Chemotaxis und deren Aktivierung. In höheren Konzentrationen hemmt es dagegen über die A_{2A} und A_{2B} Adenosinrezeptoren die proinflammatorische Reaktion der neutrophilen Granulozyten, die damit einhergehende Gewebsschädigung sowie die Transmigration der PMNs durch eine Verbesserung der endothelialen Barrierefunktion (Barletta et al., 2012).

Der A_{2B} Adenosinrezeptor wirkt primär über die Aktivierung von G_s-Proteinen und die Bildung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) durch die Adenylatzyklase (Ham und Rees, 2008). Dieser Rezeptor wurde sowohl allgemein während Sepsis als auch auf zellulärer Ebene auf neutrophilen Granulozyten mit der Limitierung der Inflammationsreaktion in Verbindung gebracht (Csóka et al., 2010, Barletta et al., 2012, van der Hoeven et al., 2011). Seine Aktivierung vermindert die Permeabilität von Epithelien und Endothelien (Aherne et al., 2015, Barletta et al., 2012, Eckle et al., 2008, Konrad et al., 2017) und hemmt die PMN-Aktivierung (van der Hoeven et al., 2011). Mäuse ohne A_{2B} Adenosinrezeptor zeigten während einer polymikrobiellen Sepsis eine erhöhte Mortalität einhergehend mit gesteigerten Zytokin- und Chemokinkonzentrationen in den Organen und im Blutplasma (Csóka et al., 2010). Im Rahmen von hypoxischen Bedingungen und Ischämie reduzierte der A_{2B} Adenosinrezeptor kardiale und renale Zellschäden und die dortige Inflammation im Tierversuch (Grenz et al., 2008, Eckle et al., 2007). Entgegengesetzt hierzu gibt es auch experimentelle Hinweise auf proinflammatorische Auswirkungen des A_{2B} Adenosinrezeptors bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen wie Asthma bronchiale (Chandrasekaran et al., 2019, Zhong et al., 2004) oder chronischer Kolitis (Kolachala et al., 2008). Eine Verbindung des A_{2B} Adenosinrezeptors zum SDF-1/CXCR4- beziehungsweise CXCR7-Signalweg wurde bereits mehrfach beschrieben (Yang et al., 2008, Konrad et al., 2017, Richard et al., 2006). Beide

Signalwege beeinflussen sich gegenseitig während Inflammation und Hypoxie und modulieren hierdurch Zellfunktionen.

2.4. Fragestellungen der Arbeit

Sepsis ist eine ebenso häufige wie schwerwiegende Erkrankung, deren Pathophysiologie unvollständig verstanden ist und deren Therapie bisher nicht die fehlregulierte Immunantwort beheben kann. Ein besseres Verständnis dieser Mechanismen würde den Weg zu neuen Therapieoptionen eröffnen. Das Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung des Einflusses beider SDF-1 Rezeptoren auf die akute Inflammation bei Sepsis. Da Adenosin die Inflammationsreaktion beeinflusst und es Hinweise auf eine Verknüpfung des A_{2B} Adenosinsignalweges mit dem SDF-1 Signalweg gibt, wurde dieser Zusammenhang ebenfalls berücksichtigt. Um die Fragestellungen dieser Arbeit zu untersuchen, wurde durch Zymosan oder Mäusefäkalien eine Peritonitis und Sepsis in Mäusen induziert, diese prophylaktisch oder therapeutisch mit SDF-1 Rezeptorantagonisten behandelt und die Organmigration neutrophiler Granulozyten, die Bildung von PNCs und die Freisetzung inflammatorischer Mediatoren beurteilt.

Diese Arbeit beschäftigt sich im Detail mit den folgenden Fragestellungen:

- Welche Rolle besitzen die SDF-1 Rezeptoren CXCR4 und CXCR7 in der Zymosan- und fäkal-induzierten Peritonitis und Sepsis?
 - Wie wird die PMN-Migration in die Organe durch die spezifische CXCR4- (AMD3100) und CXCR7-Antagonisierung (CCX771) beeinflusst?
 - Welchen Einfluss haben die Antagonisten auf die histologisch sichtbare Entzündungsreaktion und den immunhistochemischen Nachweis der PMNs und PNCs in den Organen?
 - Wie wird die PNC-Bildung im Blut durch den Antagonismus beeinflusst?
 - Wie wird die Konzentration inflammatorischer Zytokine und Chemokine im Plasma durch die Antagonisten beeinflusst?

- Besitzt eine therapeutische Behandlung mit den SDF-1 Rezeptorantagonisten ebenfalls einen Einfluss auf die PMN-Migration und auf die Konzentrationen der inflammatorischen Zytokine im Plasma?
- Wird ein möglicher protektiver Effekt der SDF-1 Rezeptorantagonisten in der Zymosan-induzierten Sepsis durch den A_{2B} Adenosinrezeptor vermittelt?
 - Wird die PMN-Migration in die Organe in A_{2B} Knockout Tieren durch den CXCR4- und CXCR7-Antagonismus beeinflusst?
 - Welchen Einfluss haben die Antagonisten auf die histologisch sichtbare Inflammationsreaktion und den immunhistochemischen Nachweis der PMNs und PNCs in den Organen in A_{2B} Knockout Tieren?
 - Verändert sich die PNC-Bildung im Blut nach Antagonistengabe und A_{2B} Knockout?
 - Wie verändert sich in den Wildtyp-Tieren die Expression des A_{2B} Adenosinrezeptors während Zymosan-induzierter Peritonitis und Sepsis und SDF-1 Rezeptorantagonismus?
 - Wie ist die Konzentration inflammatorischer Zytokine und Chemokine nach Antagonistengabe und A_{2B} Knockout?

Zusammenfassend beschäftigt sich diese Arbeit mit der Frage, ob ein protektiver Effekt der SDF-1 Rezeptorantagonisten bei Sepsis besteht und dieser über den A_{2B} Adenosinrezeptor vermittelt wird. Die Ergebnisse werden im Hinblick auf ihre klinische Anwendbarkeit diskutiert.

3. Materialien und Methoden

3.1. Materialien

Für die in vivo Versuche wurden die Mäuse in natürlichen Tag-Nacht-Zyklen unter pathogenfreien Bedingungen gehalten. Die Mäuse waren männlich und bei Durchführung der Versuche zwischen acht und zwölf Wochen alt (Wildtyp: C57BL/6NCrl, Charles River, Sulzbach, Deutschland. A_{2B} Knockout Tiere: Katya Ravid PhD, Boston University, School of Medicine, Department of Biochemistry, USA). Die Genehmigung der Tierversuche wurde durch das Regierungspräsidium Tübingen erteilt (A04/16).

3.1.1. Geräte

Produktbezeichnung	Produkt-Nr.	Hersteller
BD FACS Canto II Flow Cytometer	338960	BD Bioscience, Heidelberg, DE
Eismaschine	AF-103	Scotsman, Vernon Hills, USA
Einbettgerät / Paraffinausgießstation / Histoembedder	EG-1160	Leica, Wetzlar, DE
Gewebeinfiltrationsautomat TP-1020	14042230543	Leica Biosystems, Nussloch, DE
Heraeus Fresco 17 Zentrifuge	75002420	Thermo Scientific, Bonn, DE
Homogenisator Precellys 24	03119-200-RD000	Bertin Technologies SAS, Montigny-le-Bretonneux, FR
Inkubationswasserbad	Typ 1003	GFL, Burgwedel, DE
Magnetrührer RCT basic	442-0603	IKA Labortechnik, Staufen, DE
Paraffin-Streichtisch / Wärmeplatte	HI-1220	Leica, Wetzlar, DE
Rotationsmikrotom	RM-2235	Leica, Wetzlar, DE
Wasserbad	HI-1210	Leica, Wetzlar, DE
Mastercycler gradient	950000015	Eppendorf, Hamburg, DE
Mehrkanalpipette	3114000158	Eppendorf, Hamburg, DE
Mikroskop: Leica DM IL	30301	Leica, Wetzlar, DE
Mikroskop: Leica DM IRB	55853	Leica, Wetzlar, DE

Nanodrop2000 Spectrophotometer	10045275	Peqlab Biotechnologie, Erlangen, DE
Neo Lab Shaker	7-0952	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, DE
PerfectSpin P, PCR-Platten-Zentrifuge	91-PSPIN-P	Peqlab Biotechnologie, Erlangen, DE
Pinzetten	BD312R, BD311R	Aesculap, Tuttlingen, DE
Hydroflex Elisa (Plate-washer)	30045769 / 1211006442	Tecan, Crailsheim, DE
Scheren	BC590R, BC060R	Aesculap, Tuttlingen, DE
T100 Thermal Cycler	1861096	Bio-Rad, Hercules, USA
CFX96	1855195	Bio-Rad, Hercules, USA
CFX Connect	1855200	Bio-Rad, Hercules, USA
Thermomixer	5436	Eppendorf, Hamburg, DE
Thermoschüttler	AK-82	Infors AG, Bottmingen, CH
Vortex-Genie 2	SI-0236-SI-0256	Scientific Industries Inc, New York, USA
Waage	HR-120	A&D Instruments Ltd, Abingdon, UK
Waage	PK-4800	Ohaus, Kirchheim, DE
Zentrifuge Biofuge fresco	75003327	Heraeus Instruments GmbH, Hanau, DE
Zentrifuge Megafuge 1.0R	75003060	Heraeus Instruments GmbH, Hanau, DE

3.1.2. Verbrauchsmaterialien

Produktbezeichnung	ID	Hersteller
Deckgläser	01-2460/1	R. Langenbrinck, Emmendingen, DE
Zellsieb / EASYstrainer 70 µm steril	542070	Greiner bio-one, Frickenhausen, DE
Einbettkassetten Rötילו	K113.1	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Falcon klein / Cellstar Tubes	188271	Greiner bio-one, Frickenhausen, DE
Filter Tip PP natural 0,1-10 µL super slim	07-613-8300	Nerbe plus GmbH, Winsen, DE
Filter Tip PP natural 0,1-10 µL short	07-602-8300	Nerbe plus GmbH, Winsen, DE
Filter Tip PP natural 0-20 µL	07-622-8300	Nerbe plus GmbH, Winsen, DE
Filter Tip PP natural 0-200 µL	07-662-8300	Nerbe plus GmbH, Winsen, DE
Filter Tip PP natural 100-1000 µL	07-693-8300	Nerbe plus GmbH, Winsen, DE
GAZIN Mullkompressen	18501	Lohmann & Rauscher, Neuwied, DE
Gesichtsmaske 3m Aura	9320+	3M, Saint Paul, USA
Untersuchungshandschuhe	290418	Abena, Oberderdingen, DE
Kanülen Microlance 20 G	301300	Becton Dickinson, Heidelberg, DE
Kanülen Microlance 24 G	304100	Becton Dickinson, Heidelberg, DE
Kanülen Microlance 25 G	300400	Becton Dickinson, Heidelberg, DE
Kanülen Microlance 27 G	302200	Becton Dickinson, Heidelberg, DE
Nunc Kryoröhrchen	368632	Thermo Scientific, Bonn, DE
Microseal B	MSB1001	Bio-Rad Laboratories, München, DE
Mikrotiterplatte	GB655101	Greiner bio-one, Frickenhausen, DE
Multiplate PCR Plates	MLL9601	Bio-Rad, Hercules, USA
Multi-Safe Seal Tubes	7083.1	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Objektträger	03-0004	R. Langenbrinck, Emmendingen, DE
Objektträger Superfrost+	03-0060	R. Langenbrinck, Emmendingen, DE
Parafilm M	PM-999	Carl Roth, Karlsruhe, DE

Falcon konisches Zentrifugenröhrchen 50ml	352070	Corning B.V. Life Sciences, Amsterdam, NLD
Polystyrene Round-Bottom Tube 5 ml	352052	Corning B.V. Life Sciences, Amsterdam, NLD
Pipettenspitze 10 µl	VT0210	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, DE
Pipettenspitze 0,5-20 µl	2500170	Ratiolab GmbH, Dreieich, DE
Pipettenspitze 200 µl	70760002	Sarstedt, Nürnberg, DE
Pipettenspitze 1000 µl	686290	Greiner bio-one, Frickenhausen, DE
Pipettenspitze 2000 µl	K315.1	Carl Roth, Heidelberg, DE
Precellys Ceramic Beads 1.4 mm	432-0293	Peqlab Biotechnologie, Erlangen, DE
Reaction Tubes 1.5 ml	616201	Greiner bio-one, Frickenhausen, DE
Safe-lock Tubes 0.5 ml	30121023	Eppendorf, Hamburg, DE
Spritze 1 ml	300013	Becton Dickinson, Heidelberg, DE
Spritze 2 ml	4606027V	Braun, Melsungen, DE
Spritze 5 ml	4606051V	Braun, Melsungen, DE
Spritze 10 ml	4606108V	Braun, Melsungen, DE
Stripetten 10 ml	356551	Corning B.V. Life Sciences, Amsterdam, NLD
Stripetten 25 ml	356525	Corning B.V. Life Sciences, Amsterdam, NLD
Stripetten 5 ml	356543	Corning B.V. Life Sciences, Amsterdam, NLD
Transfer-Pipette	LW 4000	Alpha laboratories limited, Eastleigh, UK
Zählkammer Neubauer	40441	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG, Sondheim vor der Rhön, DE

3.1.3. Chemikalien

Produktbezeichnung	ID	Hersteller
2-Propanol	I9516	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE

ABTS	A1888-2G	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Chloroform	C2432	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Ethanol 99 %	ETO-10000-99-1	SAV-Liquid Produktion GmbH, Flintsbach, DE
Methanol	106009	Merck, Darmstadt, DE
Na-Citrat	35801	Carl Roth, Karlsruhe, DE
NaCl	106404	Merck, Darmstadt, DE
NaN ₃ , Natriumazide	101541869	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Wasserstoffperoxid 30 %	108597	Merck, Darmstadt, DE
Xylol	9713.3	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Zitronensäure	818707	Merck, Darmstadt, DE
Zyosan A, Saccharomyces cerevisiae	Z4250	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE

3.1.4. Medien

Produktbezeichnung	ID	Hersteller
Avidin Blocking Kit	SP-2001	Vector Labs, Peterborough, UK
BD Cytometer Setup & Tracking Beads	641319	BD Bioscience, Heidelberg, DE
Bluing Reagent	7301	Thermo Scientific, Bonn, DE
Bovines Serumalbumin (BSA)	A7906-50G	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
DAB-Peroxidase Substrat-Kid	SK-4100	Vector Labs, Peterborough, UK
DPBS ohne Mg ²⁺ / Ca ²⁺	14190094	Gibco, Invitrogen, Darmstadt, DE
DuoSet ELISA IL-6	DY 406	R&D Systems, Wiesbaden, DE
DuoSet ELISA KC	DY 453	R&D Systems, Wiesbaden, DE
DuoSet ELISA MIP-2	DY 452	R&D Systems, Wiesbaden, DE
DuoSet ELISA TNF- α	DY 410	R&D Systems, Wiesbaden, DE
Fish Skin Gelatine Oil (FSGO)	G 7765	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE

Hämatoxylin	GHS316	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
iScript cDNA Synthesis Kit	70-8891	Bio-Rad Laboratories, München, DE
iTaq Universal SYBR Green Supermix	172-5124	Bio-Rad Laboratories, München, DE
Paraffin Rotiplast	6642.5	Carl Roth, Karlsruhe, DE
PBS-Tabletten Gibco	18912014	Thermo Scientific, Bonn, DE
Paraformaldehyd (PFA) 4 %	P6148	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Reagent Diluent	DY995	R&D Systems, Wiesbaden, DE
Stop Solution	80-184	Enzo Life Sciences, Hines Drive, USA
Substrat Solution	DY999	R&D Systems, Wiesbaden, DE
TriFast peqGOLD	30-2010	Peqlab Biotechnologie, Erlangen, DE
Triton X-100	A4975	AppliChem, Darmstadt, DE
Türk'sche Lösung	109277	Merck, Darmstadt, DE
Unmasking Solution	H-3300	Vector Labs, Peterborough, UK
Vectastain ABC-KIT	PK-4004	Vector Labs, Peterborough, UK

3.1.5. Enzyme

Produktbezeichnung	ID	Hersteller
Collagenase XI	C7657	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
DNAse	D4527	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Hyaluronidase	H3506	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE

3.1.6. Medikamente

Produktbezeichnung	ID	Hersteller
Desinfektionsspray Softasept	16464M14	Braun, Melsungen, DE
Heparin-Natrium	13083	Ratiopharm, Ulm, DE
Ketamin	436057	Hameln Pharma plus GmbH, Hameln, DE

NaCl 0,9 %	19LA09WB	Braun, Melsungen, DE
Rompun 2 %	KP09XOL	Bayer, Leverkusen, DE

3.1.7. Antikörper

Produktbezeichnung	ID	Hersteller
CD42b	M040-1	EMFRET Analytics GmbH & Co. KG, Würzburg, DE
CD45	103132	BioLegend, San Diego, USA
CD62L	104424	BioLegend, San Diego, USA
CD62P	148304	BioLegend, San Diego, USA
CD162 / PSGL-1	555306	BD Bioscience, Heidelberg, DE
Ly6G	127618	BioLegend, San Diego, USA
Normal rat IgG	sc-2026	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, DE
Rabbit Anti-Rat IgG Antibody	BA-4000	Vector Labs, Peterborough, UK
Rat Anti-Mouse CD11b	MCA711G	Bio-Rad Laboratories, München, DE
Rat Anti-Mouse CD41	SM2035P	OriGene, Herford, DE

3.1.8. CXCR4- und CXCR7-Antagonisten

Produktbezeichnung	ID	Hersteller
AMD3100	155148-31-5	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
CCX771	PC-60212	ChemoCentryx, Mountain View, USA

3.2. Methoden

3.2.1. In vivo PMN-Migration und PNC-Bildung

Induktion der Peritonitis und Sepsis

Die Peritonitis und Sepsis wurden durch eine intraperitoneale (i.p.) Injektion mit Zymosan (siehe Abbildung 5) oder Mäusefäkalien induziert. Zymosan ist ein Bestandteil des Hefepilzes *Saccharomyces cerevisiae*, der eine starke Immunreaktion hervorruft. Das Polysaccharid kommt in Verbindung mit Proteinen in der Zellwand von Hefen vor (Volman et al., 2005).

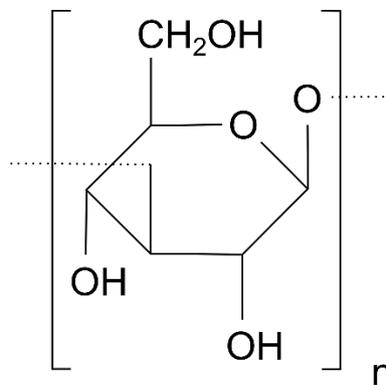


Abbildung 5: Strukturformel Zymosan A

Den Mäusen wurde vier Stunden vor der Entnahme der Peritoneallavage und der Organe ein ml Zymosanlösung injiziert (Konzentration: ein mg Zymosan pro ein ml 0,9 % NaCl). Für die fäkal-induzierte Peritonitis (FIP) wurde eine Lösung mit 80 mg Mäusefäkalien in einem ml Glukoselösung (einprozentige Glukose, 0,9 % NaCl) hergestellt. Hierfür wurden 15 g Mäusekot in 100 ml Glukose / NaCl Lösung gelöst und für 30 Minuten bei 37 °C im Überkopfschüttler vermischt. Anschließend wurde die Lösung mehrmals gefiltert und mit 87,5 ml Glukose / NaCl Lösung gespült. Die FIP-Lösung wurde zu je fünf ml aliquotiert und bei -20 °C eingefroren. Im Tierversuch wurde den Mäusen zehn ml/kg Körpergewicht (KG) der Fäkalien-Lösung verabreicht. Bei Eintreten von bestimmten Abbruchkriterien wie Tachypnoe, gesträubtem Fell oder Apathie des Tieres erfolgte der Versuchsabbruch.

Behandlung mit CXCR4- und CXCR7-Antagonisten

Es wurde zwischen einer prophylaktischen und einer therapeutischen Behandlung mit den CXCR4- und CXCR7-Antagonisten AMD3100 und CCX771 unterschieden. Die prophylaktische Gabe des CXCR4-Antagonisten (AMD3100, zehn mg/kg KG) erfolgte intraperitoneal eine Stunde vor der Zymosan- oder Fäkalieninjektion. Die prophylaktische Gabe des CXCR7-Antagonisten (CCX771, zehn mg/kg KG) erfolgte subkutan eine Stunde vor der Zymosan- oder Fäkalieninjektion. Im Zymosanmodell wurde ebenfalls eine therapeutische Gabe der beiden Antagonisten bei gleicher Dosierung und gleichem Injektionsort eine Stunde nach der Zymosaninjektion durchgeführt. Die A_{2B} Knockout Tiere wurden ausschließlich prophylaktisch eine Stunde vor der Zymosaninjektion mit den Antagonisten behandelt. Bei den A_{2B} Knockout Tieren wurde keine fäkal-induzierte-Peritonitis durchgeführt. Die folgende Abbildung fasst die Behandlungen in den Tierversuchen zusammen.

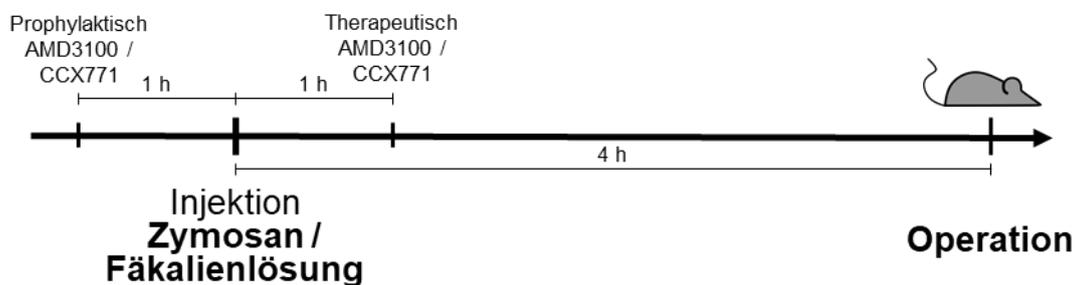


Abbildung 6: Prophylaktische und therapeutische Behandlung mit den Antagonisten AMD3100 und CCX771 in der Zymosan- und fäkal-induzierten Peritonitis und Sepsis.

Entnahme von Blut, Peritoneallavage und Organen

Vor der Organentnahme wurden die Versuchstiere durch eine intraperitoneal verabreichte Narkoselösung (10 µl/g KG) anästhesiert. Diese setzte sich aus 200 µl Ketamin (50 mg/ml), 50 µl Rompun (20 mg/ml) und 750 µl isotonischer Kochsalzlösung zusammen. Nach fünf Minuten wurde die Narkosetiefe überprüft (Ausbleiben der Reflexe, erniedrigte Herz- und Atemfrequenz) und die Mäuse mit Kanülen fixiert. Um Kontaminationen durch Tierhaare bei der Entnahme der Peritoneallavage (PL) und der Organe zu vermeiden, wurde das Fell mit Glycerin

benetzt. Anschließend wurde durch einen Hautschnitt die Sicht auf das Peritoneum und die darüberliegende Muskelschicht hergestellt und fünf ml kalte PBS-Lösung (Phosphate Buffered Saline, Ca²⁺/Mg²⁺-frei) intraperitoneal injiziert. Nach dem Verteilen der Flüssigkeit durch leichtes Massieren der Bauchdecke wurde die Haut abpräpariert und drei ml PL entnommen und kaltgestellt. Ein Teil des Peritoneums wurde gemeinsam mit der Bauchmuskulatur entfernt und für weitere Untersuchungen eingefroren. Das Zwerchfell wurde durchtrennt und der Thorax eröffnet. Aus dem rechten Ventrikel entnahmen wir 300-500 µl Blut und spülten den Kreislauf durch Injektion von drei ml PBS in den rechten Ventrikel nach Durchtrennen der Vena cava inferior oberhalb der Iliakalbifurkation. Hierdurch wurde das Blut aus den Organen entfernt. Das Herz-Lungen-Paket wurde entnommen. Der rechte Mittellappen der Lunge wurde gemeinsam mit der linken Lunge für durchflusszytometrische Untersuchungen in einer Petrischale zerkleinert und in einer Enzymlösung aus 2,5 ml PBS und je 2,5 µl Hyaluronidase, DNase und Kollagenase auf Eis kaltgestellt. Der rechte Oberlappen der Leber wurde ebenfalls zerkleinert und in einer Enzymlösung mit gleicher Zusammensetzung kaltgestellt. Der Ober- und Unterlappen der rechten Lunge wurde zusammen mit restlicher Leber, Niere, Milz und Darm für weitere Untersuchungen in Kryo-Tubes bei -80° C eingefroren.

Weitere Verarbeitung von Blut, PL, Lunge und Leber

Verarbeitung der Blutproben

Von den Blutproben wurden je zehn µl in 90 µl Türkscher Lösung gelöst und die Leukozyten in der Neubauer-Zählkammer bestimmt. In die Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) Röhrchen wurde 50 µl Antikörpermix vorgelegt, darauf 100 µl der Blutproben pipettiert und die Blutproben für 20 Minuten bei vier Grad Celsius im Dunkeln inkubiert. Die restlichen 200 – 400 µl der Blutproben wurden bei 1300 Umdrehungen pro Minute (rpm) und vier Grad Celsius für zehn Minuten zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und das Plasma für weitere Untersuchungen eingefroren.

Zusammensetzung Antikörper-Mix:	1 µl Ly6G PE-Cy7 (Phycoerythrin-Cyanine 7)
---------------------------------	---

1 µl CD45 PerCP (Peridinin-
Chlorophyll-Protein)
1 µl CD42b FITC (Fluorescein-
Isothiocyanat)
47 µl Färbepuffer (FP)

Zusammensetzung FP:

1 l PBS
10 g bovines
Serumalbumin (BSA)
5 ml NaNO₃

Anschließend wurde ein ml Erythrozyten-Lyse-Puffer hinzugegeben und die Proben inkubierten für weitere zehn Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur (RT).

Zusammensetzung Erythrozyten-Lyse-Puffer: 8 g NH₄Cl

840 mg NaHCO₃
37 mg EDTA
(Ethyldiamintetraacetat)
1 l Aqua dest. (destilliertes
Wasser)

Die Lyse wurde mit einem ml FP gestoppt und die Proben bei vier Grad Celsius und 1300 rpm für zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Lyse wiederholt. Dann wurden die Blutproben zweimal mit zwei ml FP gewaschen, jeweils bei 1300 rpm und vier Grad Celsius für zehn Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Es wurden 400 µl Cellfix hinzugegeben und die Proben bis zur Analyse im Durchflusszytometer lichtgeschützt bei vier Grad Celsius aufbewahrt.

Zusammensetzung Cellfix:

200 µl FP
200 µl Paraformaldehyd
(PFA), vierprozentig

Verarbeitung von PL und Organen

Die PL wurde für fünf Minuten bei 1300 rpm und vier Grad Celsius zentrifugiert und anschließend der Überstand für die Zytokinbestimmung aliquotiert. Das Zellpellet wurde in einem ml FP gelöst und die Zellzahl nach Anfärbung mit Türkscher-Lösung bestimmt. Die Organe in der Enzymlösung wurden für eine halbe Stunde bei 37 °C und 70 rpm im Schüttelinkubator inkubiert, durch ein 70 µm Zellsieb gesiebt und auf 20 ml mit PBS aufgefüllt. Darauf erfolgte eine Zentrifugation der Lungen- und Leberzellen für zehn Minuten bei 1300 rpm und vier Grad Celsius. Der Überstand wurde verworfen und in jedes Falcon 2,5 ml Erythrozyten-Lyse-Puffer gegeben. Durch Vortexen wurde das Pellet gelöst und im Lysepuffer für fünf Minuten inkubiert. Die Lyse wurde durch die Zugabe weiterer 17,5 ml des FP gestoppt und die Zellsuspension für zehn Minuten bei 1300 rpm und vier Grad Celsius zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen. Das Zellpellet der Lunge wurde in 500 µl und das Pellet der Leber in 2000 µl FP gelöst. Die Zellzahl der Leukozyten wurde wie beschrieben in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die PL und die Organproben wurden vor der Anfärbung noch auf eine Konzentration von 2000 Zellen/µl verdünnt oder resuspendiert. Zu 100 µl der verdünnten Zellsuspension wurden 50 µl Antikörper-Mix gegeben. Dieser inkubierte für 20 Minuten im Dunkeln bei vier Grad Celsius.

Nach der Inkubationszeit wurden die Proben noch zweimal mit zwei ml FP gewaschen und bei 1300 rpm und vier Grad Celsius für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde jeweils verworfen und 400 µl Cellfix nach dem Waschen zur Fixierung der Zellen hinzugegeben.

Durchflusszytometrische Bestimmung der transmigrierten neutrophilen Granulozyten und der Bildung von Plättchen-Neutrophilen-Komplexen (PNCs)

Die in Peritonealraum, Lunge und Leber migrierten neutrophilen Granulozyten wurden durchflusszytometrisch bestimmt (BD FACS Canto II). Die Auswertung erfolgte mit FlowJo (Version 7.8.2). Im Blut wurden die neutrophilen Granulozyten und die Plättchen-Neutrophilen-Komplexe (PNCs) bestimmt. Hierfür wurden die Leukozyten zuerst anhand ihres charakteristischen Verhaltens im Forward

Scatter und Side Scatter aufgetrennt. Es erfolgte zur Auswahl der Leukozyten eine weitere Unterteilung in CD45⁺- und CD45⁻-Populationen. CD45 ist ein allgemeiner Leukozytenmarker (Rheinländer et al., 2018). In der Population der CD45⁺ Zellen wurden die PMNs (Ly6G⁺-Zellen) ermittelt. Die Anzahl der PMNs wurde über die durchflusszytometrisch ermittelten prozentualen Anteile der CD45⁺- und Ly6G⁺-Zellen der in der Zählkammer ermittelten Leukozytengesamtzahlen errechnet. In den Blutproben wurde die Ly6G⁺-Population der PMNs weiter in CD42b⁺-Zellen unterteilt, um die PNC-Bildung darzustellen. Auf den PNCs wurde die mediane Fluoreszenzintensität (MFI) von P-Selektin (CD62P), L-Selektin (CD62L) und PSGL-1 (P-Selektin Glykoprotein Ligand-1, CD162) bestimmt. Die MFI ist ein Maß für die Menge an gebundenem fluoreszierendem Farbstoff pro gemessene Partikel. Hierfür wird der Median der Fluoreszenzintensität des ausgewählten Farbstoffes durch die FlowJo-Software errechnet. In der folgenden Abbildung werden die durchflusszytometrischen Auswertungen mit FlowJo dargestellt:

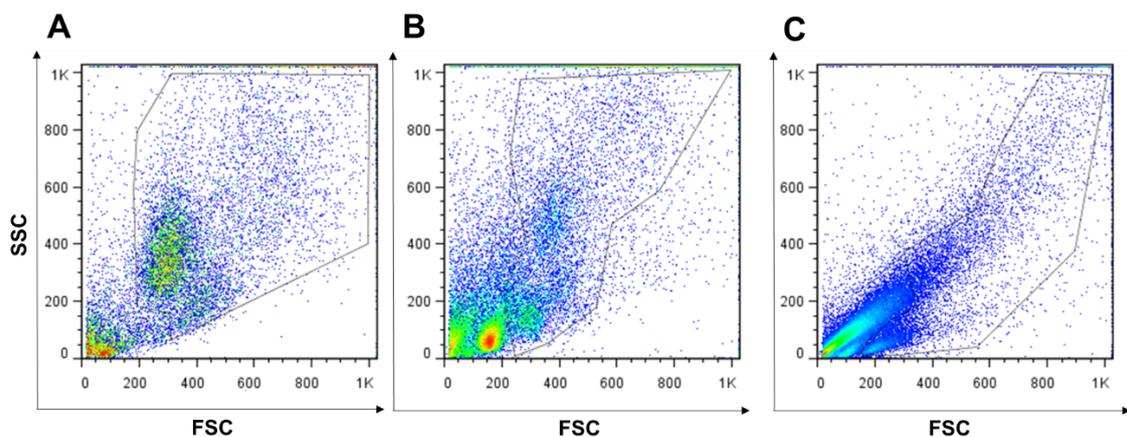


Abbildung 7: Auswertung mit FlowJo, Forward und Side Scatter. Die Gates fassen die Leukozytenpopulationen im Forward und Side Scatter. In (A) ist die peritoneale Lavage, in (B) die Lunge und in (C) die Leber abgebildet.

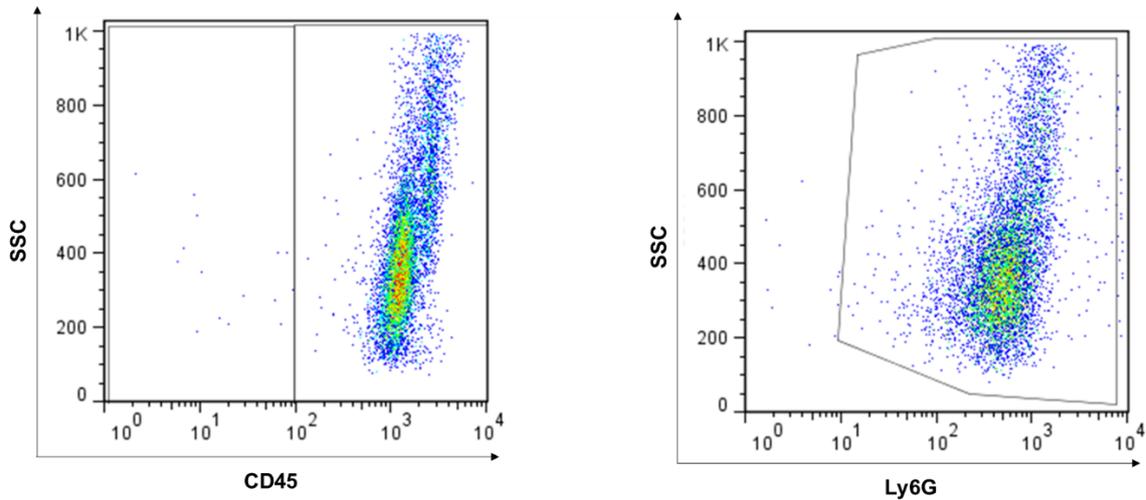


Abbildung 8: Auswertung der Leukozytengates am Beispiel der peritonealen Lavage. Links sind die Gates der CD45⁻ und CD45⁺-Populationen abgebildet, in der rechten Abbildung die Ly6G⁺-Population der PMNs innerhalb der CD45⁺-Zellen.

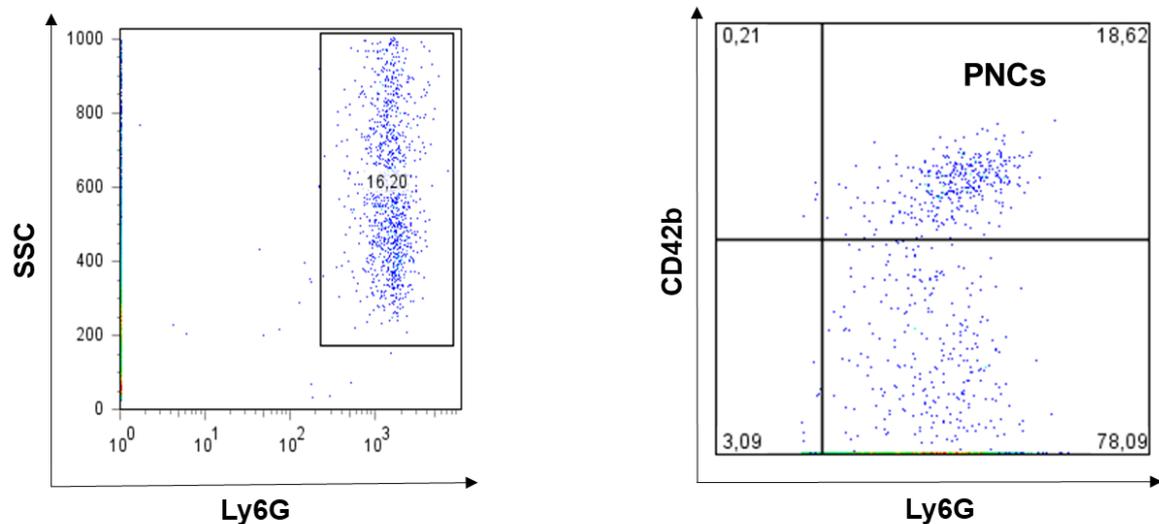


Abbildung 9: Auswertung der PNC-Quantifizierung in den Blutproben. Links ist die Auswahl der PMNs innerhalb CD45⁺-Population abgebildet. Diese wurde anschließend in die CD42b⁺-Zellen unterteilt, um die PNCs zu quantifizieren (im rechten Teil der Abbildung dargestellt).

3.2.2. Histologie

Induktion der Peritonitis und Sepsis, Organentnahme und Fixierung der Organe
 Peritonitis und Sepsis wurde wie beschrieben durch eine intraperitoneale Injektion von Zymosan oder der Fäkalienlösung ausgelöst. Die Tiere wurden eine Stunde zuvor prophylaktisch mit den CXCR4- oder CXCR7-Antagonisten behandelt. Nach Narkotisierung wurde das Peritoneum und der Thorax eröffnet,

die Vena cava inferior durchtrennt und der Kreislauf durch Injektion von drei ml PBS in den rechten Ventrikel gespült. Anschließend wurden die Lungen mit vierprozentigem Formalin fixiert. Dazu wurde die Haut vom Unterkiefer abwärts abpräpariert und die Trachea freigelegt. Die Trachea wurde mit einer arteriellen Kanüle punktiert und der Bronchialbaum mit Formalin umspült. Dafür wurde eine 20 ml Spritze 20 cm oberhalb der Maus befestigt und das Formalin passiv für fünf Minuten in die Lunge geleitet. Hierdurch wurde ein schonendes Entfalten der Lungen gewährleistet. Leber und Peritoneum wurden entnommen und gemeinsam mit der Lunge über 24 Stunden in Formalin gelagert.

Paraffineinbettung und Anfertigung der Gewebeschnitte

Die Organe wurden für zwei Stunden in 70 % Alkohol überführt. Mit dem Gewebeeinfiltrationsautomaten wurde das Gewebe in Paraffin eingebettet und mit dem Histoembedder in Paraffinblöcke gegossen. Am Rotationsmikrotom wurden drei µm dicke Organschnitte erstellt. Diese wurden zuerst in ein kaltes und anschließend in ein 37 °C warmes Wasserbad überführt. Von dort wurden sie auf Objektträgern fixiert und über Nacht auf einer Wärmeplatte getrocknet.

Immunhistochemische Färbung der PNCs

Die Objektträger wurden für fünf Minuten in Xylol und anschließend jeweils für fünf Minuten in einer Ethanolreihe fallender Konzentration inkubiert (100 %, 95 %, 70 %, Aqua dest.). Dies diente der Entparaffinierung und Rehydrierung. Zur Inaktivierung der endogenen Peroxidase wurden die histologischen Präparate für 30 Minuten in eine Lösung aus 200 ml Methanol und drei ml Wasserstoffperoxid (30 %) gegeben und danach zweimal für fünf Minuten in destilliertem Wasser gewaschen. Es wurden drei ml Unmasking-Solution in 320 ml Aqua dest. gelöst und die Objektträger für sieben Minuten in der Mikrowelle (600 Watt) in der Lösung erhitzt. Dabei wurde darauf geachtet die Präparate nicht Austrocknen zu lassen. Anschließend kühlten die Objektträger für eine Stunde bei RT ab. Die Präparate wurden in PBS gespült und mit dem Peroxidase-Anti-Peroxidase Pen (PAP-Pen) Kreise um die Organschnitte gezogen. In diese wurde die Avidin-Blocking-Solution aufgetragen.

die Avidin-Blocking-Solution mit NRS angesetzt und aufgetragen und danach der Primär-AK gemeinsam mit der Biotin-Blocking-Solution und NRS auf die Objektträger gegeben. Hierfür wurde ein PMN spezifischer AK (Rat Anti-Mouse, Ly6B.2) verwendet. Die Präparate inkubierten über Nacht bei vier Grad Celsius in einer feuchten Kammer. Am zweiten Tag wurde zuerst der Sekundär-AK (Rabbit Anti-Rat) aufgetragen und anschließend die ABC und DAB-Solutions wie in der PNC-Färbung aufgebracht. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämatoxylin für zehn Sekunden. Unter fließendem Wasser wurden die Objektträger für fünf Minuten gewaschen und die Präparate durch die aufsteigende Alkoholreihe und Xylol dehydriert. Die Einbettung erfolgte in Eukitt.

3.2.3. RNA-Isolation

Zur RNA-Isolation wurden die Organproben aufgetaut und mit Keramik-Beads und ein ml Trizol (Trifast) im Homogenisator bei 5500 rpm für 15 Sekunden homogenisiert. Nach fünf Minuten wurde 200 µl Chloroform hinzugegeben. Die Proben wurden stark geschüttelt oder erneut bei gleicher Einstellung homogenisiert. Nach zehn Minuten Inkubationszeit erfolgte eine Zentrifugation bei 12.000 g und RT für fünf Minuten. Der wässrige Überstand enthielt die RNA und wurde in neue 1,5 ml RNase freie Eppendorf Cups überführt. Es wurden 500 µl kaltes Isopropanol hinzugegeben, die Proben von Hand geschüttelt und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einer erneuten Zentrifugation bei 12.000 g und vier Grad Celsius für zehn Minuten bildete sich ein RNA-Pellet. Der Überstand wurde vollständig abpipettiert und die RNA zweimal mit 75 % Ethanol gewaschen. Die RNA wurde während den Waschschrinen jeweils bei 12.000 g und vier Grad Celsius für zehn Minuten zentrifugiert. Das Ethanol wurde abpipettiert und die Proben trockneten für 15 Minuten bei RT. Zum Schluss wurde die RNA in 40 µl Nuklease freiem Wasser (NFW) gelöst und eingefroren.

3.2.4. Umschrieb in complementary DNA (cDNA)

Vor dem RNA-Umschrieb in cDNA musste die Konzentration der RNA photometrisch bei 260 nm bestimmt und die gelöste RNA gegebenenfalls verdünnt werden. Aus der Konzentration an RNA in µg/ml ergab sich das Mischungsverhältnis von NFW und RNA. Die Gesamtmenge musste 15 µl

betragen. Zum eigentlichen Umschrieb der RNA in cDNA wurde das iScript cDNA Sythesis Kit von Bio-Rad verwendet. Dieses enthielt einen Reaction-Mix und die Reverse-Transkriptase.

Pro Probe (20 µl) wurde verwendet:

- 1 µl Reverse Transkriptase
- 4 µl Reaction-Mix
- 15 µl NFW + gelöste RNA

Der Umschrieb erfolgte im Thermocycler:

- 5 Minuten bei 20 °C
- 20 Minuten bei 46 °C
- 1 Minuten bei 90 °C
- 4° C hold

Zum Schluss wurde 140 µl NFW auf jede Probe gegeben.

3.2.5. Real-time Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Vor dem Pipettieren der Proben auf die PCR-Platte (96 wells) wurde der Primer-Mix (PM) und der Master-Mix (MM) hergestellt.

Zusammensetzung PM:

- 20 µl Forward-Primer
- 20 µl Reverse-Primer
- 160 µl NFW

Zusammensetzung MM für eine Platte:

- 500 µl Sybr Green
- 250 µl NFW
- 50 µl Primer Mix

Die Primer waren auf die Zielgene SDF-1, CXCR4, CXCR7 und A_{2B} gerichtet. Es wurden nun zuerst je vier µl der Proben, des Standards und des NFWs aufgetragen und dabei vier wells pro Probe verwendet. Somit wurden jeweils Duplikate des Zielgens und der Kontrolle angefertigt. Darauf folgten 16 µl des MM für Housekeeping- und Zielgen. Hierfür wurde zur Normalisierung der Werte des Zielgens ein Primer für die ribosomale 18S RNA als Housekeeping-Gen verwendet. Als Standard wurde mit einer positiv-Kontrolle (Lungengewebe von Zymosan- oder fäkal-stimulierten Mäusen ohne Antagonistengabe) eine Verdünnungsreihe (1:2, 1:4, 1:8, 1:16) hergestellt. Die PCR-Platte wurde

gevortext, zentrifugiert und im Cycler gestartet. Die Auswertung erfolgte mit CFX-Manager von Bio-Rad.

3.2.6. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Die Konzentration der Zytokine TNF α , IL-6, CXCL1 und CXCL2/3 im Plasma wurde mittels Sandwich-ELISA bestimmt.

Zusammensetzung ELISA-PBS:	4 l Aqua dest.
	32 g NaCl
	0,8 g KCl
	5,6 g Na ₂ HPO ₄
	0,8 g KH ₂ PO ₄

Das ELISA-PBS wurde filtriert (0,2 μ m) und der pH-Wert bei 7,2 - 7,4 eingestellt.

Zu Beginn wurde der Capture-Antikörper auf die 96-well Platten gegeben. Der Antikörper wurde zuvor nach Herstellerangaben in ELISA-PBS gelöst und 100 μ l/well pipettiert. Die Platten inkubierten über Nacht bei RT. Anschließend wurden die Platten zum Entfernen des ungebundenen Antikörpers mit 0,05 % Tween-Lösung gewaschen und mit 200 μ l Reagent-Diluent geblockt. Sie inkubierten für eine Stunde bei RT. Die Platten wurden gewaschen und 100 μ l der Plasma- und Standardproben in Duplikaten aufgetragen. Der Standard bestand aus einer siebenfachen Verdünnungsreihe mit bekannten Konzentrationen des Zytokins und Reagent-Diluent. Die Platten inkubierten für zwei Stunden bei RT. Nicht gebundenes Antigen wurde durch einen weiteren Waschschrift entfernt und der Detektions-Antikörper auf die Platten gegeben. Dieser inkubierte wieder für zwei Stunden bei RT. Überschüssiger Antikörper wurde durch Waschen entfernt und das für die Farbreaktion verantwortliche Enzym (Streptavidin-Horseradish-Peroxidase) auf die Platten pipettiert. Über das Streptavidin band das Enzym den biotinylierten Detektions-Antikörper. Nach 20 Minuten Inkubation wurde das Substrat (bestehend aus Wasserstoffperoxid und Tetramethylbenzidin) hinzugegeben. Dieses inkubierte für weitere 20 Minuten. Die Reaktion wurde durch Zugabe der Stop-Solution beendet. Die Extinktion der Proben wurde bei 450 und 540 nm gemessen. Die Extinktion ist abhängig von der Menge an

gebundenem Detektions-Antikörper, beziehungsweise dem gebundenen Antigen, und lässt somit über den Vergleich mit der Standardreihe Rückschlüsse auf deren Konzentrationen in der Probe zu.

3.2.7. Statistische Analyse

Die statistische Auswertung erfolgte mit Graph Pad Prism 9.0.1 (Graph Pad Software, San Diego, USA). Zum Vergleich von zwei Gruppen wurde der unpaired Student's *t*-test genutzt. Statistische Analysen von mehr als zwei Gruppen erfolgten per one-way ANOVA gefolgt vom Bonferroni post-hoc Test. P-Werte <0,05 wurden als signifikant angesehen. Die errechneten P-Werte wurden wie folgt angegeben: **p* < 0,05; ***p* < 0,01; ****p* < 0,001 und *****p* < 0,0001.

4. Ergebnisse

4.1. Gesteigerte Expression von SDF-1, CXCR4 und CXCR7 während Peritonitis und Sepsis

Um die Relevanz von SDF-1 und seinen Rezeptoren in der Inflammation der Zymosan- und fäkal-induzierten Peritonitis und Sepsis aufzuzeigen, wurde deren Genexpression in den Organen mittels real-time Polymerase-Kettenreaktion bestimmt. Die Genexpression wurde in Peritoneum, Lunge und Leber der unstimulierten und der stimulierten Wildtyp-Tiere vier Stunden nach Beginn der Inflammation bestimmt und in den beiden folgenden Abbildungen dargestellt. Vier Stunden nach der Zymosan- oder Fäkalieninjektion kam es, mit Ausnahme von SDF-1 in der Leber, zu einem Anstieg der Expression von SDF-1 und seinen Rezeptoren in Peritoneum, Lunge und Leber.

Im Peritoneum stieg die normalisierte Expression von SDF-1 im Vergleich der unstimulierten Kontrolltiere mit den Tieren vier Stunden nach Zymosaningjektion von $0,47 \pm 0,36$ auf $2,26 \pm 1,51$ (Mittelwerte \pm Standardabweichung) an. In der Lunge zeigte sich durch die Zymosangabe eine noch stärkere Erhöhung der SDF-1 Expression von $0,31 \pm 0,37$ auf $2,20 \pm 1,16$. Im Gegensatz hierzu kam es in der Leber zu keiner signifikanten Änderung der Expression von SDF-1. Die Kontrolle ohne Zymosan lag bei $1,05 \pm 0,54$ und die Gruppe vier Stunden nach Zymosaningjektion bei $0,95 \pm 1,00$.

Die Expression von CXCR4 steigerte sich in allen untersuchten Organen durch die Zymosaningjektion. Insbesondere in Peritoneum und Lunge zeigte sich ein deutlicher Anstieg vier Stunden nach der Stimulation mit Zymosan. Im Peritoneum lag die CXCR4-Expression der Kontrolle ohne Zymosan bei $0,22 \pm 0,19$ und vier Stunden nach der Zymosangabe bei $2,66 \pm 2,44$. In der Lunge wurde sie durch die Zymosangabe von $0,18 \pm 0,16$ auf $1,85 \pm 1,53$ erhöht. Auch in der Leber konnte eine signifikant gesteigerte Expression von CXCR4 nachgewiesen werden. Hier lag die Kontrolle ohne Zymosan bei einer CXCR4-Expression von $0,19 \pm 0,31$ und erhöhte sich durch die Zymosangabe auf $0,88 \pm 0,74$.

Auch für CXCR7 konnte durch die Inflammation im Rahmen der Zymosaninjektion eine Verstärkung der Expression in den untersuchten Organen nachgewiesen werden. Im Peritoneum wiesen wir in den unstimulierten Kontrolltieren eine CXCR7-Expression von $0,31 \pm 0,55$ nach, welche in den stimulierten Tieren nach vier Stunden auf $1,56 \pm 1,36$ anstieg. In der Lunge erhöhte sich die CXCR7-Expression von $0,07 \pm 0,16$ auf $4,56 \pm 4,53$ und in der Leber von $0,24 \pm 0,31$ auf $1,02 \pm 0,72$.

In der folgenden Abbildung ist die Expression von SDF-1 und seinen Rezeptoren in Peritoneum, Lunge und Leber bei der Kontrolle ohne Zymosangabe und vier Stunden nach intraperitonealer Zymosanapplikation dargestellt.

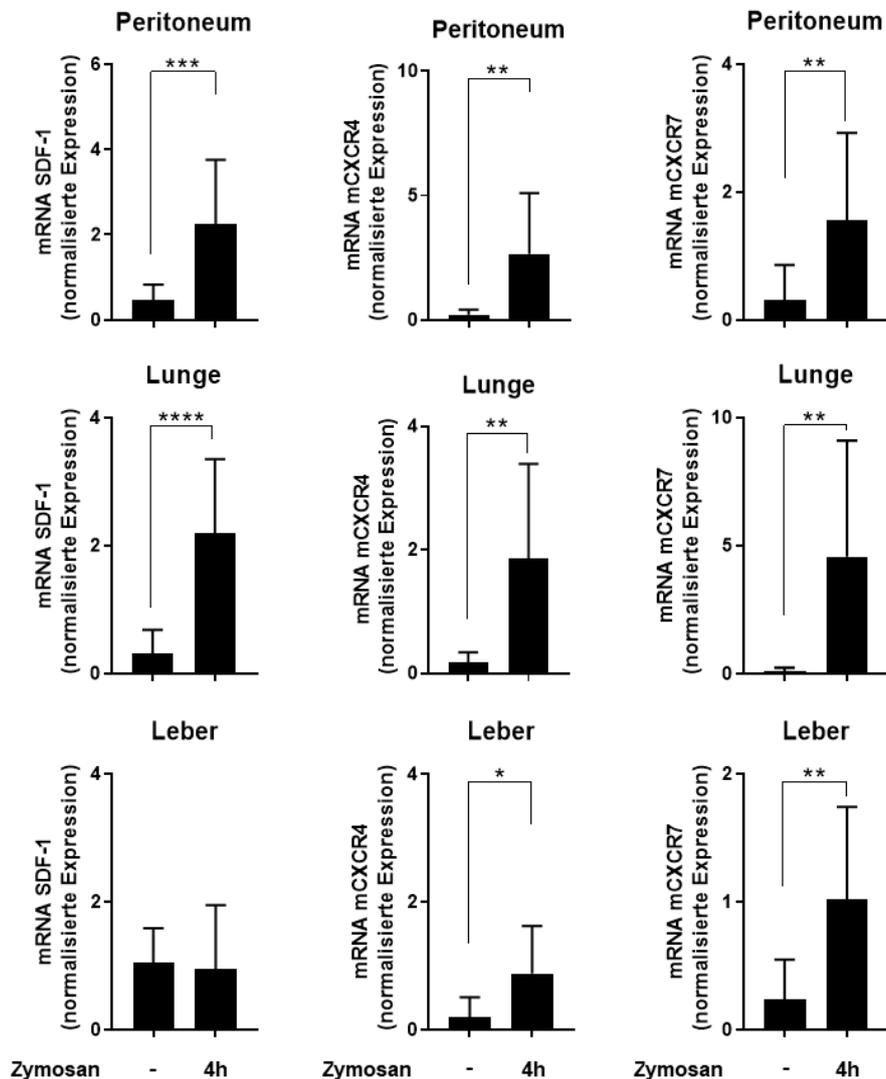


Abbildung 10: Verstärkte Genexpression von SDF-1, CXCR4 und CXCR7 während der Zymosan-induzierten Peritonitis und Sepsis in Peritoneum, Lunge und Leber beim Wildtyp. Diese Abbildung vergleicht die Kontrollgruppe ohne intraperitoneale Injektion von Zymosan mit der stimulierten Gruppe vier Stunden nach Zymosaninjektion. Angegeben sind die Mittelwerte der normalisierten Expression mit den Standardabweichungen (n=8-14), *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001 und ****p < 0,0001. (Ngamsri et al., 2020)

In der fäkal-induzierten Peritonitis ergaben sich in Bezug auf die Expression von SDF-1 und seinen Rezeptoren ähnliche Ergebnisse. Durch die Inflammation erhöhte sich auch hier die Expression von SDF-1 und seinen Rezeptoren in den untersuchten Organen. Eine Ausnahme stellte wiederum die SDF-1 Expression der Leber dar und zeigte, wie im Zymosanmodell, keine durch die Inflammation verstärkte Expression. Die Kontrolle ohne FIP lag hier bei $1,42 \pm 1,05$ und die Tiere vier Stunden nach Injektion der Fäkalienlösung bei $0,90 \pm 0,45$. Im

Peritoneum und der Lunge wurde vier Stunden nach der intraperitonealen Injektion der Fäkalienlösung eine verstärkte Expression von SDF-1 im Vergleich mit den Kontrolltieren festgestellt. Sie erhöhte sich im Peritoneum von $0,24 \pm 0,32$ in den unstimulierten Kontrollen auf $2,31 \pm 1,41$ nach fäkal-induzierter Inflammation. In der Lunge wurde eine Erhöhung der SDF-1 Expression von $0,11 \pm 0,11$ auf $0,79 \pm 0,25$ nachgewiesen (Abbildung 11).

In allen untersuchten Organen verstärkte sich die CXCR4-Expression durch die intraperitoneale Injektion der Fäkalienlösung. Im Peritoneum stieg diese von $0,19 \pm 0,21$ in der unstimulierten Kontrolle auf $3,11 \pm 1,74$ bei den Tieren vier Stunden nach Inflammationsbeginn an. In der Lunge konnten wir eine Erhöhung der CXCR4-Expression von $0,12 \pm 0,18$ auf $3,14 \pm 1,60$ und in der Leber von $0,08 \pm 0,07$ auf $3,72 \pm 1,46$ nachweisen.

Bezogen auf CXCR7 sahen wir insbesondere in der Lunge eine verstärkte Expression durch die Injektion mit der Fäkalienlösung. Die Expression erhöhte sich hier von $0,01 \pm 0,01$ bei den Kontrolltieren auf $0,52 \pm 0,36$ vier Stunden nach Fäkalieninjektion. Im Peritoneum steigerte sich die CXCR7-Expression von $0,05 \pm 0,07$ in der Kontrolle auf $2,32 \pm 2,85$ in den Tieren vier Stunden nach Injektion der Fäkalienlösung. In der Leber sahen wir bei den unstimulierten Tieren eine CXCR7-Expression von $0,00 \pm 0,00$, welche sich durch die Inflammation im Rahmen Peritonitis und Sepsis auf $1,23 \pm 1,43$ änderte.

In der nachfolgenden Abbildung wird die Expression von SDF-1, CXCR4 und CXCR7 in Peritoneum, Lunge und Leber während der fäkal-induzierten Peritonitis dargestellt.

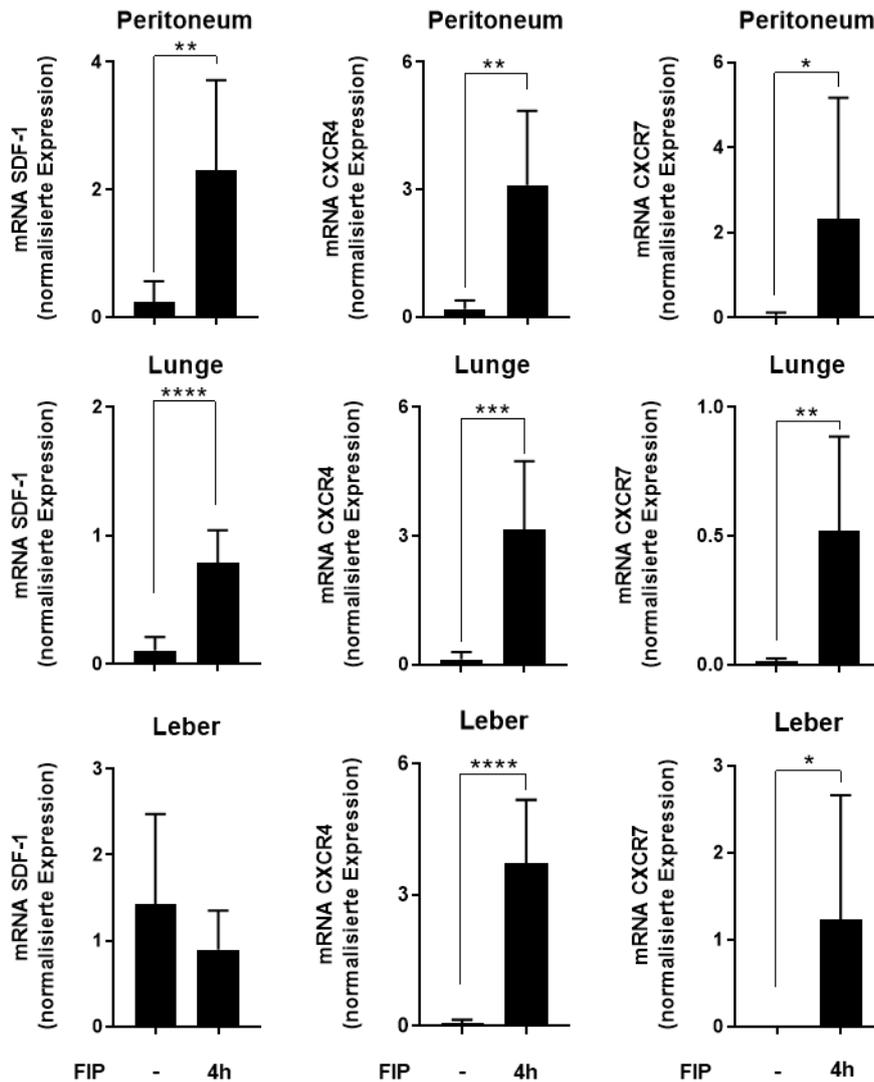


Abbildung 11: Gesteigerte Genexpression von SDF-1 und dessen Rezeptoren während der fäkal-induzierten Peritonitis (FIP) und Sepsis in den Organen der Wildtyp-Mäuse. Es wird die Kontrollgruppe ohne Fäkalieninjektion mit den Tieren vier Stunden nach Injektion der polymikrobiellen Fäkalienlösung verglichen. Angegeben werden die Mittelwerte der normalisierten Expression mit den Standardabweichungen (n=6-12), *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001 und ****p < 0,0001. (Ngamsri et al., 2020)

4.2. Reduktion der PMN-Migration in die Organe durch den SDF-1 Rezeptorantagonismus

Neutrophile Granulozyten oder PMNs sind wichtige Zellen des angeborenen Immunsystems und spielen in der Sepsis eine herausragende Rolle. Aus diesem Grund haben wir mittels durchflusszytometrischen Untersuchungen deren Ansammlung im Blut, der Peritoneallavage, der Lunge und der Leber bestimmt. In den Wildtyp-Mäusen wurde zwischen einer unstimulierten Kontrolle ohne Zymosangabe, einer stimulierten Kontrolle vier Stunden nach Zymosaninjektion

und den prophylaktisch mit den CXCR4- und CXCR7-Antagonisten behandelten Gruppen unterschieden. Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie wurden in Abbildung zwölf dargestellt. Zusätzlich wurden die neutrophilen Granulozyten in Peritoneum, Lunge und Leber immunhistochemisch angefärbt (siehe Abbildung 13). Zur Veranschaulichung wurden die Aufnahmen der PMNs hier einmalig vergrößert und getrennt dargestellt. In den folgenden Abbildungen wurden die Ergebnisse der Durchflusszytometrie und histologischen Aufnahmen gemeinsam abgebildet. Die PMNs stellen sich in der Histologie braun dar.

Im Blut kam es vier Stunden nach Zymosangabe aufgrund der Durchwanderung der Granulozyten in die Organe zu keinem signifikanten Anstieg der Zellzahlen (Mittelwerte \pm Standardabweichung). Die Kontrolle ohne Zymosangabe lag bei $4,07 \pm 3,61 \cdot 10^4$ im Vergleich zu $9,62 \pm 11,43 \cdot 10^4$ Zellen vier Stunden nach Inflammationsbeginn. Durch die CXCR4- und CXCR7-Blockade ergab sich im Vergleich zur alleinigen Zymosangabe keine signifikante Änderung der Zellzahlen. Die Zellzahlen lagen nach CCX771-Gabe bei $3,22 \pm 3,05 \cdot 10^5$ und nach AMD3100-Gabe bei $3,33 \pm 1,55 \cdot 10^5$.

Durch die Inflammation migrierten vier Stunden nach Zymosangabe verstärkt PMNs in die Organe und in die Peritoneallavage. Hier steigerten sich die nachgewiesenen Neutrophilen von $1,31 \pm 2,76 \cdot 10^5$ bei der unstimulierten Kontrolle auf $5,29 \pm 1,73 \cdot 10^6$ bei den Tieren vier Stunden nach Beginn der Inflammation. In der Lunge erhöhte sich die PMN-Anzahl von $1,30 \pm 0,72 \cdot 10^5$ bei der Kontrolle auf $6,92 \pm 2,44 \cdot 10^5$ vier Stunden nach der Zymosaninjektion und in der Leber von $1,18 \pm 0,55 \cdot 10^5$ auf $6,61 \pm 2,34 \cdot 10^5$.

Durch den prophylaktischen Antagonismus der SDF-1 Rezeptoren wurde diese Migration reduziert und es befanden sich vier Stunden nach der Zymosaninjektion weniger PMNs in der PL und den Organen. Eine Ausnahme stellte hierbei der CXCR4-Antagonismus mit AMD3100 in der Leber dar, wo es zu keiner signifikanten Reduktion der migrierten PMNs kam. In der PL sank durch den CXCR7-Antagonismus die PMN-Anzahl von $5,29 \pm 1,73 \cdot 10^6$ in den stimulierten Kontrolltieren auf $3,32 \pm 0,70 \cdot 10^6$ und durch die Antagonisierung von CXCR4 auf $3,04 \pm 0,87 \cdot 10^6$. In der Lunge ergab sich eine Reduktion von $6,92 \pm$

$2,44 \cdot 10^5$ bei der stimulierten Kontrolle auf $4,00 \pm 0,80 \cdot 10^5$ durch den CXCR7-Antagonismus und durch den CXCR4-Antagonismus auf $3,94 \pm 1,20 \cdot 10^5$. In der Leber verminderten sich die migrierten PMNs lediglich bei Antagonisierung von CXCR7. Die PMN-Anzahl sank hier von $6,61 \pm 2,34 \cdot 10^5$ in den lediglich mit Zymosan behandelten Mäusen auf $1,89 \pm 0,74 \cdot 10^5$ nach Verabreichung von CCX771 und zeigte keine signifikante Reduktion bei Gabe von AMD3100. Die Zellzahl lag hier bei $4,37 \pm 3,66 \cdot 10^5$.

In der Histologie waren in den unstimulierten Kontrollgruppen der Wildtypiere kaum oder keine PMNs im Stroma oder den Gefäßen sichtbar. Das Peritonealepithel zeigte sich intakt und die Lungenalveolen präsentierten sich schmal und nicht ödematös verändert. Vier Stunden nach der Zymosaninjektion migrierten verstärkt PMNs in die Organe und die Epithelstruktur erschien aufgelockert. Die prophylaktische Behandlung mit den CXCR4- und CXCR7-Antagonisten AMD3100 und CCX771 führte in den Wildtypieren zu einer reduzierten Migration der PMNs. Somit bestätigt die Histologie die Ergebnisse aus der Durchflusszytometrie hinsichtlich einer Reduktion der PMN-Migration durch die prophylaktische Antagonisierung der SDF-1 Rezeptoren.

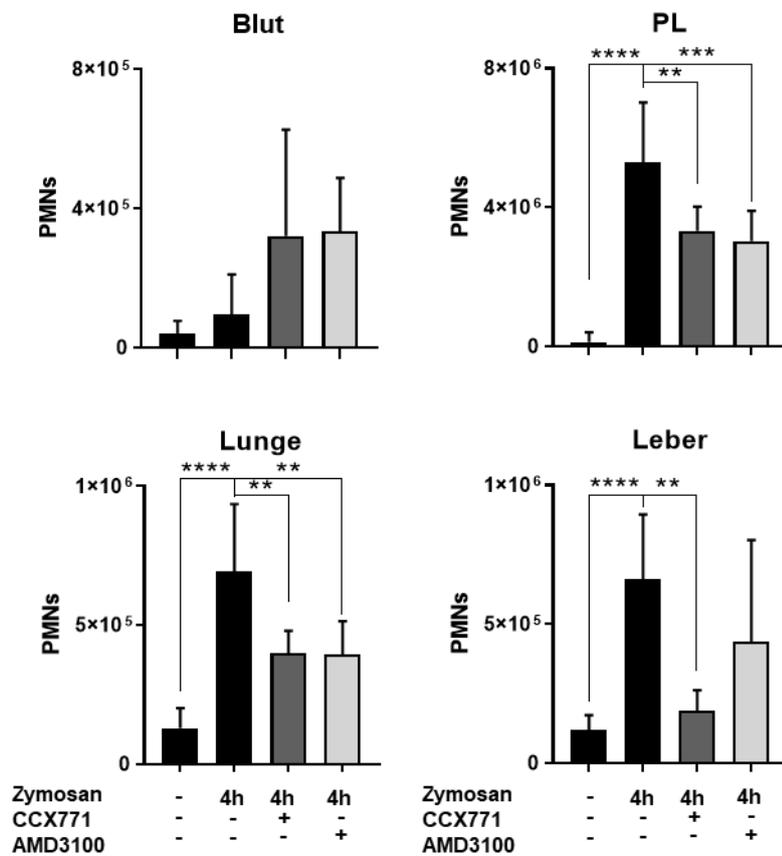
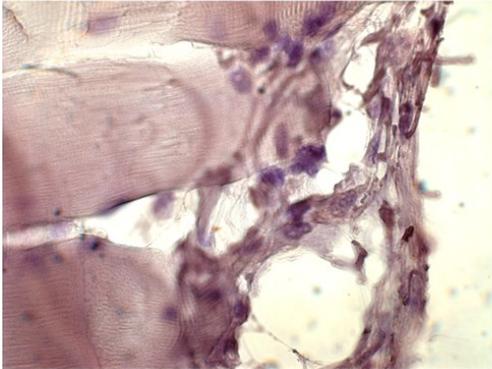


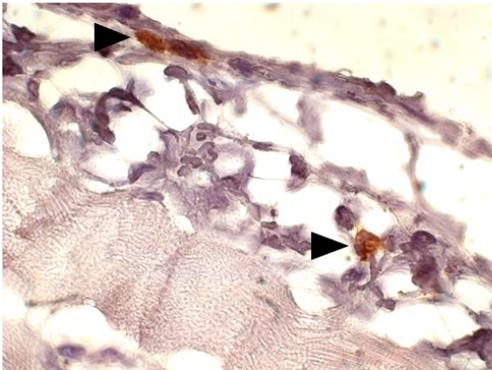
Abbildung 12: Durchflusszytometrisch erfasste PMN-Migration beim Wildtyp in Blut, Peritoneallavage (PL), Lunge und Leber. Die Organmigration der neutrophilen Granulozyten der Tiere ohne Zymosaningektion wird hier mit der PMN-Migration der mittels Zymosan stimulierten Kontrolltiere (vier Stunden nach i.p. Injektion) und der PMN-Migration der prophylaktisch mit den Antagonisten behandelten Gruppen (ebenfalls vier Stunden nach Zymosangabe) verglichen. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte \pm der Standardabweichung (n=4-8), *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001 und ****p < 0,0001. (Ngamsri et al., 2020)

A

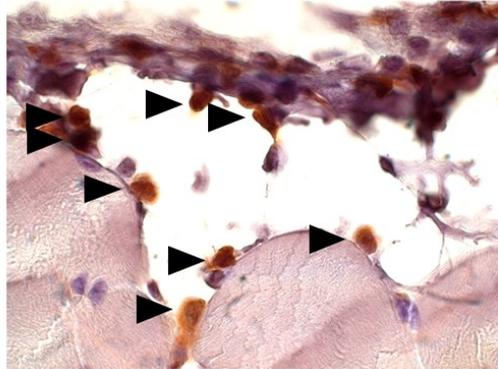
Kontrolle ohne Zymosan



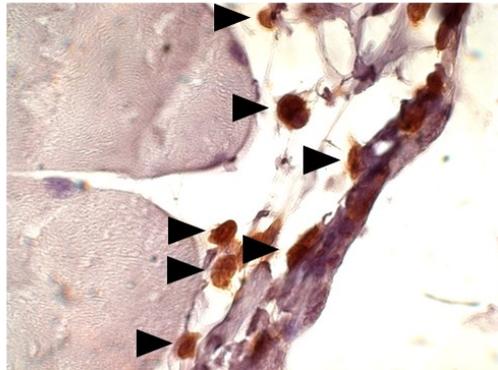
4h Zymosan + AMD3100



4h Zymosan

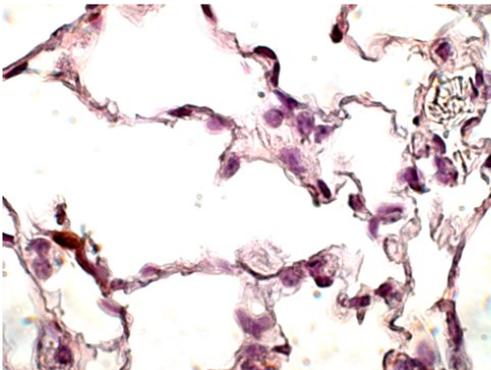


4h Zymosan + CCX771

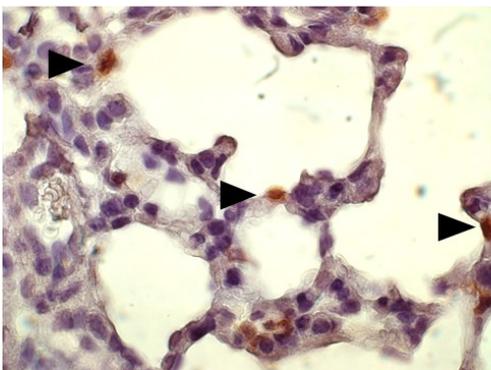


B

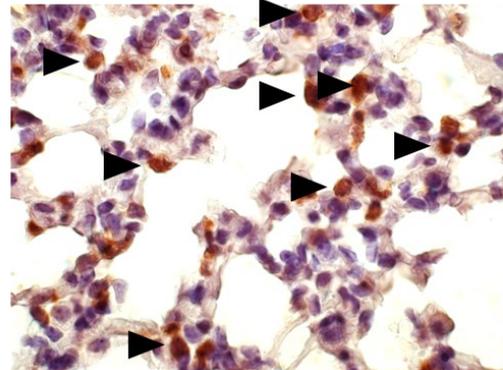
Kontrolle ohne Zymosan



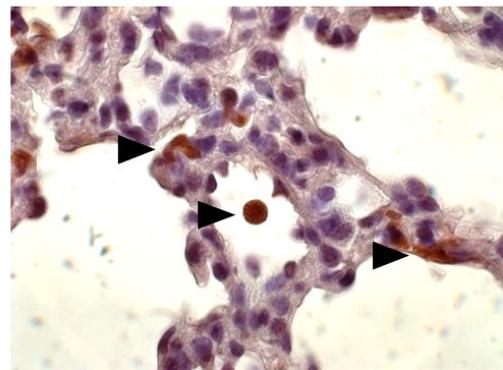
4h Zymosan + AMD3100



4h Zymosan



4h Zymosan + CCX771



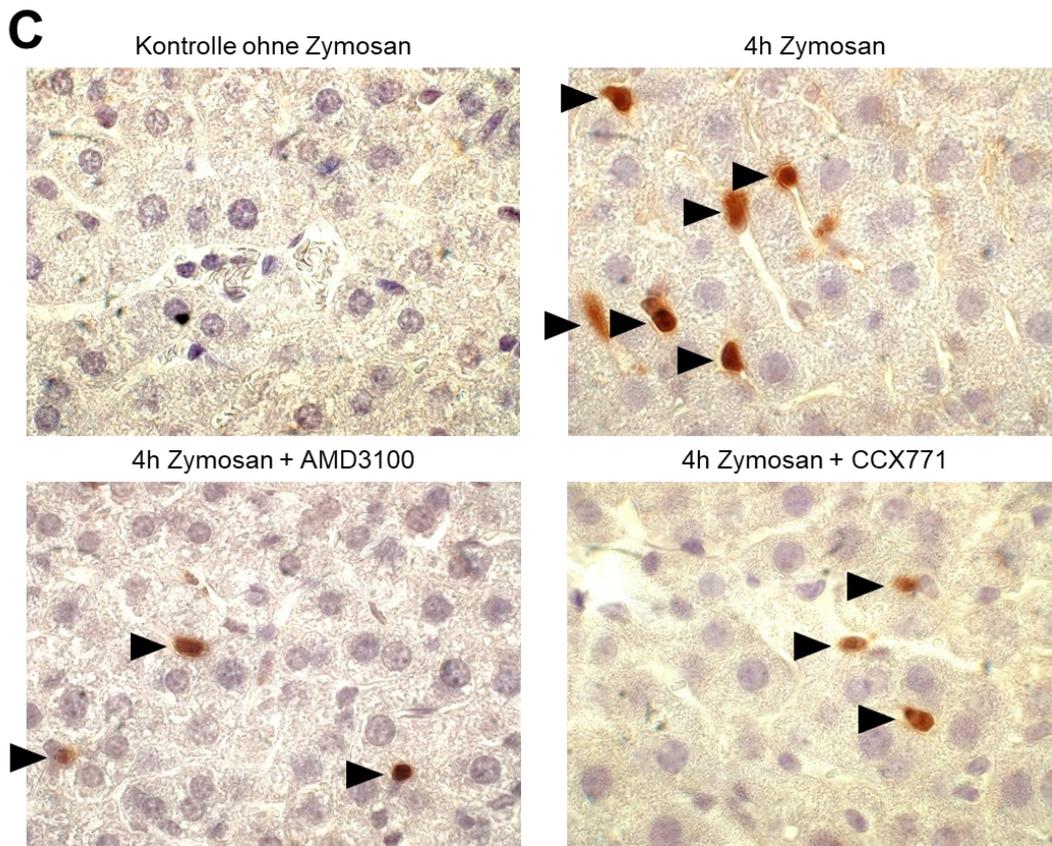


Abbildung 13: Immunhistochemische Anfärbung der PMNs (braun) beim Wildtyp in Peritoneum (A), Lunge (B) und Leber (C). Dargestellt ist die unstimulierte Kontrolle ohne Zymosan, die stimulierte Kontrolle vier Stunden nach Zymosangabe und die prophylaktisch mit den Antagonisten behandelten Gruppen vier Stunden nach Zymosangabe. Die PMNs wurden mit Pfeilen markiert. Zur Anschaulichkeit wurden die histologischen Abbildungen der PMNs hier vergrößert dargestellt. 100x Vergrößerung, n=3 (Ngamsri et al., 2020).

Die immunhistochemisch gefärbten PMNs wurden zur Quantifizierung in repräsentativen Ausschnitten von Peritoneum, Lunge und Leber ausgezählt und deren Zellzahlen während der Zymosan-induzierten Peritonitis und Sepsis in der nachfolgenden Abbildung dargestellt. Im Peritoneum stieg im Vergleich der unstimulierten Kontrolle mit den Tieren vier Stunden nach Inflammationsbeginn die Anzahl der PMNs von $0,00 \pm 0,00$ auf $10,00 \pm 4,36$ an. In der histologischen Auszählung konnte keine signifikante Reduktion der PMN-Migration ins Peritoneum durch die SDF-1 Rezeptorantagonisten nachgewiesen werden und die PMN-Zahlen lagen bei CCX771-Gabe bei $6,33 \pm 5,13$ und bei AMD3100-Gabe bei $3,33 \pm 0,58$. In der Lunge zeigte sich ebenfalls ein Anstieg der PMN-Organmigration durch die Inflammation: Die Kontrolle ohne Zymosan lag bei $0,67 \pm 0,58$ ausgezählten Zellen im Vergleich zu $18,00 \pm 3,61$ vier Stunden nach

Zymosaninjektion. Es ergab sich eine Reduktion durch die SDF-1 Rezeptorblockade auf $6,67 \pm 2,31$ bei CCX771-Gabe und auf $8,67 \pm 4,04$ nach prophylaktischer Gabe von AMD3100. Gleiches sahen wir in der Leber. Durch die Inflammation vermehrte sich die PMN-Anzahl von $0,33 \pm 0,58$ bei der unstimulierten Kontrolle auf $7,76 \pm 2,08$ vier Stunden nach Zymosangabe an und reduzierte sich durch die Gabe der Antagonisten. Die ausgezählten Zellen lagen bei $2,33 \pm 0,58$ nach Gabe von CCX771 und bei $4,33 \pm 1,16$ bei AMD3100-Gabe.

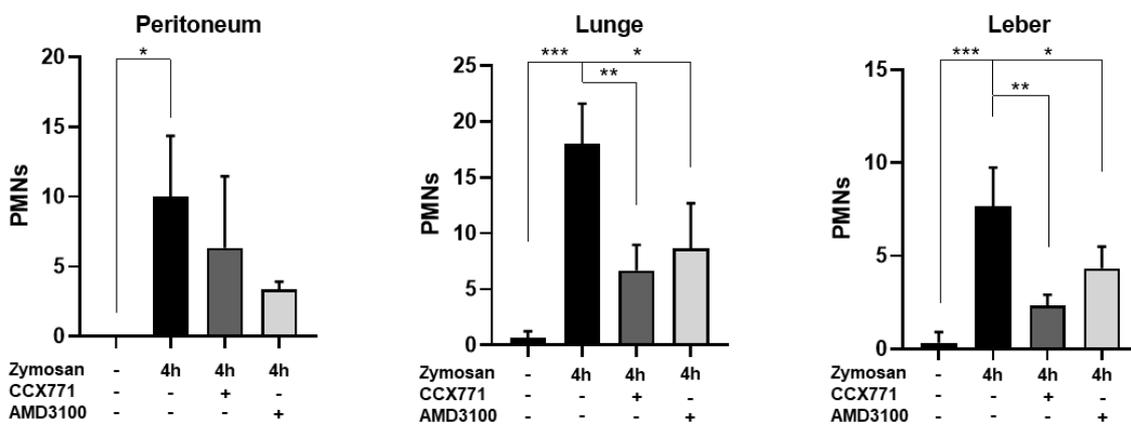


Abbildung 14: Auszählung der PMNs in Peritoneum, Lunge und Leber in der Zymosan-induzierten Peritonitis und Sepsis beim Wildtyp. Die PMNs wurden in repräsentativen Ausschnitten ausgezählt. Verglichen wird eine unstimulierte mit einer stimulierten Kontrolle und die Änderung der PMN-Zahlen nach Antagonistengabe im Vergleich zu den stimulierten Kontrolltieren. Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardabweichung (n=3), *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001 und ****p < 0,0001.

4.3. Aufhebung des protektiven Effektes der CXCR4- und CXCR7-Antagonisten durch den A_{2B} Knockout

Um die Verbindung der SDF-1 Rezeptoren mit dem A_{2B} Adenosinrezeptor zu untersuchen wurden anstatt der Wildtyp-Mäuse A_{2B}-KO-Tiere für den in vivo Transmigrationsversuch verwendet. Die nachfolgende Abbildung fasst die durchflusszytometrisch und histologisch erfassten Veränderungen der PMN-Migration im Blut und den Organen während Zymosan-induzierter Peritonitis zusammen.

Vier Stunden nach Zymosaninjektion stieg die durchflusszytometrisch ermittelte Anzahl der PMNs in Blut, PL, Lunge und Leber an (Mittelwerte \pm Standardabweichung). Im Blut erhöhte sich die Anzahl der PMNs durch die Inflammation von $0,00 \pm 0,00$ in der unstimulierten Kontrolle auf $3,46 \pm 2,30 \cdot 10^5$

vier Stunden nach Zymosaninjektion, in der PL von $5,36 \pm 6,11 \cdot 10^4$ auf $3,74 \pm 1,61 \cdot 10^6$, in der Lunge von $8,85 \pm 6,46 \cdot 10^4$ auf $3,80 \pm 1,68 \cdot 10^5$ und in der Leber von $8,85 \pm 6,46 \cdot 10^4$ auf $7,48 \pm 3,68 \cdot 10^5$. Die prophylaktische Behandlung mit den SDF-1 Rezeptorantagonisten hatte in den A_{2B}-KO-Tieren keine Auswirkung auf die PMN-Zahlen im Blut, der PL oder den Organen. Im Blut lag die PMN-Zahl nach Behandlung mit CCX771 bei $3,69 \pm 1,26 \cdot 10^5$ und nach Gabe von AMD3100 bei $3,71 \pm 1,20 \cdot 10^5$. In der PL befanden sich nach der CCX771-Gabe $4,00 \pm 1,20 \cdot 10^6$ PMNs pro ml PL und nach AMD3100-Behandlung $3,04 \pm 0,87 \cdot 10^6$ PMNs. Die PMN-Zahlen in den Organen fanden sich nach CCX771-Gabe bei $2,64 \pm 0,54 \cdot 10^5$ in der Lunge und bei $6,72 \pm 2,69 \cdot 10^5$ in der Leber. Nach Behandlung mit AMD3100 konnten wir $5,03 \pm 1,53 \cdot 10^5$ PMNs in der Lunge und $8,74 \pm 3,58 \cdot 10^5$ Neutrophile in der Leber nachweisen.

Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie wurden durch die immunhistochemische Anfärbung der PMNs in Peritoneum, Lunge und Leber bestätigt: Der Antagonismus mit AMD3100 und CCX771 hatte in den A_{2B}-KO-Tieren keine sichtbare Auswirkung auf die PMN-Migration. Unbehandelt zeigten die A_{2B}-KO-Tiere in den Organen und insbesondere in der Lunge eine erhöhte Anzahl an neutrophilen Granulozyten. Vier Stunden nach Zymosangabe sahen wir bei den A_{2B}-KO-Tieren eine im Vergleich zum Wildtyp verstärkte Ausprägung der Inflamationsreaktion, erkennbar durch vermehrte PMN-Zahlen und eine verstärkte Auflockerung der Organstruktur. Die Behandlung mit den Antagonisten führte bei den A_{2B}-KO-Tieren zu keiner ersichtlichen Reduktion der Neutrophilenanzahl oder der Inflamationsreaktion.

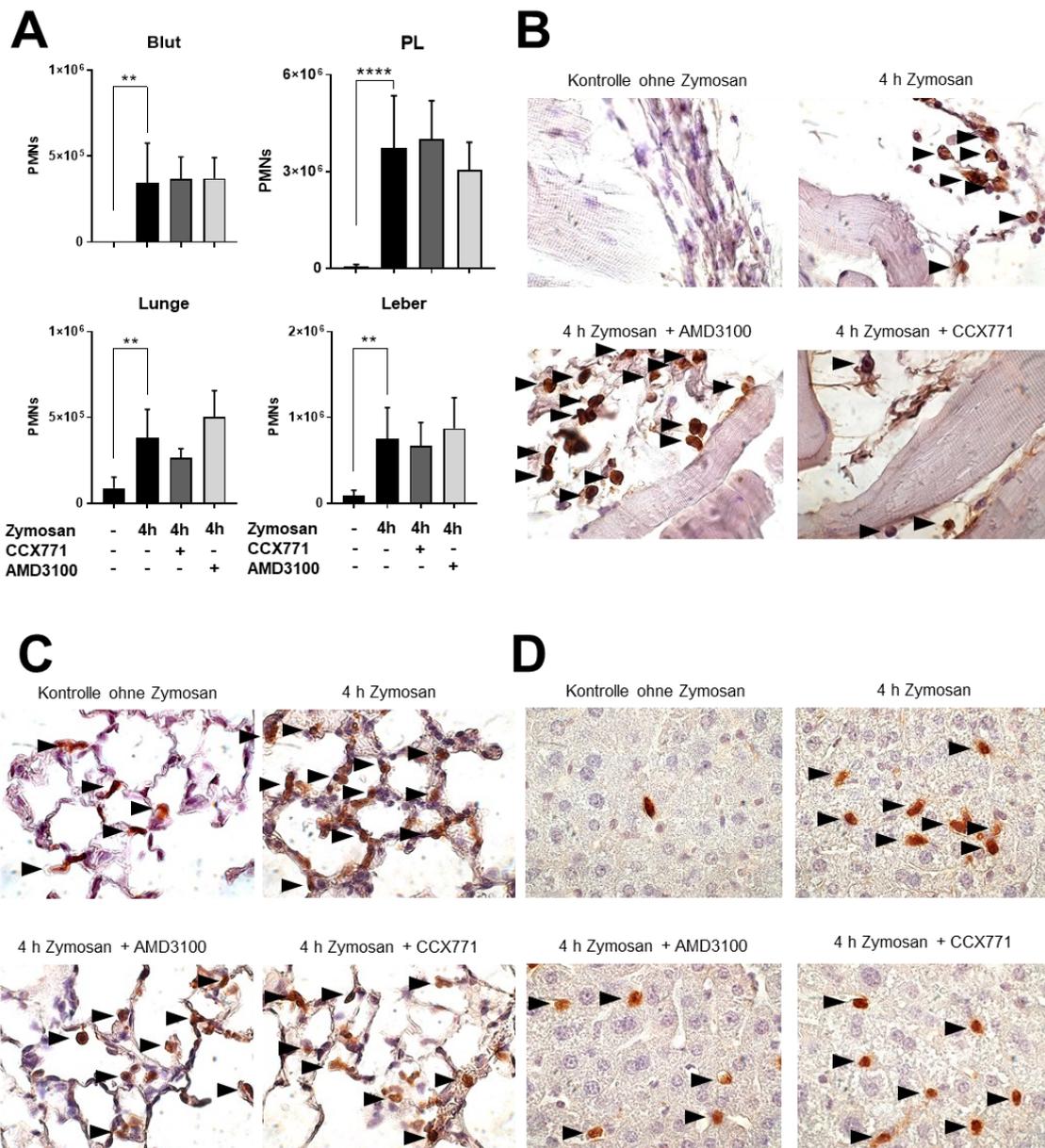


Abbildung 15: Ergebnisse der Durchflusszytometrie in Bezug auf die PMN-Migration (A) im Blut, der PL, der Lunge und der Leber. Immunhistochemische Anfärbung (C-D) der PMNs der A_{2B} -KO-Tiere während Zymosan-induzierter Peritonitis und Sepsis. (A) Durchflusszytometrie: Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardabweichung (n=4-14), *p < 0,05; **p < 0,01; *p < 0,001 und ****p < 0,0001. Immunhistochemische Anfärbung der PMNs in Peritoneum (B), Lunge (C) und Leber (D). Die PMNs sind braun und wurden mit Pfeilen markiert, 100x Vergrößerung, n=3. Sowohl in der Durchflusszytometrie als auch in den histologischen Abbildungen werden die unstimulierten Tiere mit den stimulierten Tieren und mit den prophylaktisch mit den SDF-1 Rezeptorantagonisten behandelten Gruppen (jeweils vier Stunden nach Zymosangabe) verglichen (Ngamsri et al., 2020).**

In der repräsentativen Auszählung der PMNs der A_{2B} -KO-Mäuse während Zymosan-induzierter Sepsis (Abbildung 16) stieg vier Stunden nach Inflammationsbeginn die Anzahl migrierter PMNs im Peritoneum von $0,00 \pm 0,00$ auf $5,67 \pm 1,16$ an. In der Lunge verstärkte sich die PMN-Anzahl durch die

Inflammation von $5,33 \pm 0,58$ auf $22,00 \pm 8,54$ und in der Leber erhöhte sich diese von $0,67 \pm 0,58$ auf $8,00 \pm 1,73$. In allen Organen der A_{2B} -KO-Tiere konnte wie auch in der Durchflusszytometrie keine signifikante Reduktion der PMNs nach prophylaktischem SDF-1 Antagonismus nachgewiesen werden. Im Peritoneum lag die Zahl der ausgezählten PMNs nach CCX771-Gabe bei $3,67 \pm 2,52$ und nach AMD3100-Gabe bei $7,00 \pm 1,73$. In der Lunge wurden bei CXCR7-Antagonismus $14,67 \pm 1,53$ und nach CXCR4-Antagonismus $17,67 \pm 3,51$ PMNs ausgezählt. Die Zahlen der PMNs fanden sich in der Leber bei $6,00 \pm 1,00$ nach CXCR7-Antagonismus und bei $5,67 \pm 0,58$ nach prophylaktischem CXCR4-Antagonismus.

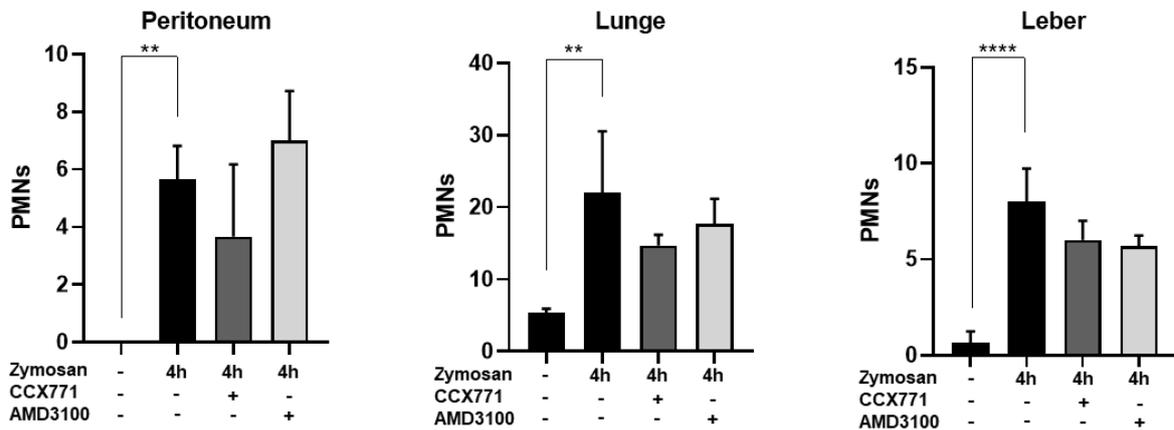


Abbildung 16: Ausgezählte PMNs in Peritoneum, Lunge und Leber in der Zyosan-induzierten Peritonitis und Sepsis bei den A_{2B} -KO-Tieren. Es zeigt sich keine Reduktion der PMN-Zahlen durch den SDF-1 Antagonismus in repräsentativen Ausschnitten. Verglichen wird die unstimulierte mit der stimulierten Kontrolle und die prophylaktisch mit den Antagonisten behandelten Gruppen (je vier Stunden nach Zyosanangabe). Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n=3$), * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ und **** $p < 0,0001$.

4.4. Expression des A_{2B} Adenosinrezeptors unter SDF-1 Rezeptorantagonismus während Zyosan-induzierter Peritonitis und Sepsis

Um die Verbindung des A_{2B} Adenosinrezeptors mit den SDF-1 Rezeptoren weiter zu untersuchen, wurde die A_{2B} Expression im Wildtyp in der Zyosan-induzierten Peritonitis und Sepsis bestimmt. Die Expression wurde im Peritoneum der unstimulierten und der stimulierten Kontrolle vier Stunden nach Zyosaninjektion

und bei den prophylaktisch mit den Antagonisten AMD3100 und CCX771 behandelten Tieren bestimmt (Abbildung 17).

Durch die Zymosaninjektion reduzierte sich die Expression des A_{2B} Adenosinrezeptors im Peritoneum. Die A_{2B} Expression der Kontrolle ohne Zymosangabe lag bei 13,65 ± 4,58 im Vergleich zu 1,30 ± 1,23 (Mittelwerte ± Standardabweichung) in den behandelten Tieren vier Stunden nach der Injektion von Zymosan. Durch den prophylaktischen CXCR4- oder CXCR7-Antagonismus stieg die A_{2B} Expression im Peritoneum wieder an. Sie lag bei 11,88 ± 8,86 nach CCX771-Gabe und bei 10,94 ± 6,35 nach der Gabe von AMD3100.

Die folgende Abbildung zeigt die Expression des A_{2B} Adenosinrezeptors im Peritoneum während Zymosan-induzierter Inflammation und bei zusätzlicher SDF-1 Rezeptorblockade.

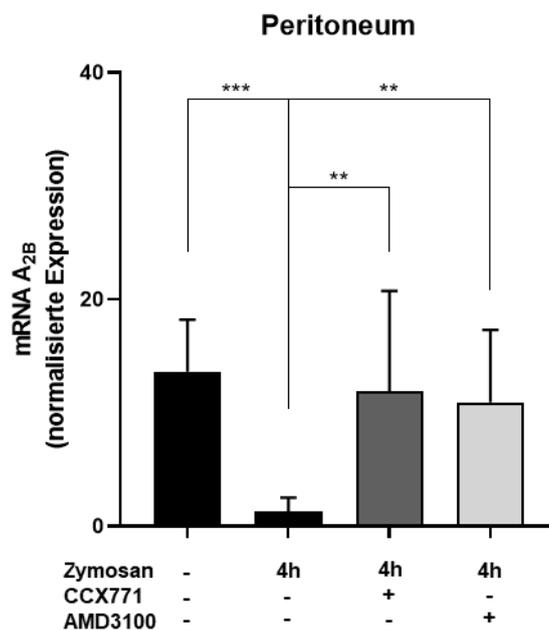


Abbildung 17: Expression des A_{2B} Adenosinrezeptors im Peritoneum beim Wildtyp während Zymosan-induzierter Peritonitis. Durch die Inflammation sinkt die Expression des Rezeptors im Peritoneum und steigt bei zusätzlicher SDF-1 Antagonistengabe wieder an. Zu sehen sind die unstimulierte Kontrolle ohne Zymosan, die stimulierte Kontrolle vier Stunden nach der Zymosangabe und die prophylaktisch mit den Antagonisten behandelten Gruppen ebenfalls vier Stunden nach Zymosangabe. Mittelwerte ± Standardabweichung (n=7-8), **p < 0,01 und ***p < 0,001. (Ngamsri et al., 2020).

4.5. Reduktion der PMN-Organmigration durch SDF-1 Rezeptorantagonismus während polymikrobieller Peritonitis und Sepsis

Um die Ätiologie und Pathophysiologie der Peritonitis-assoziierten Sepsis besser abzubilden, wurde in einem weiteren in vivo Modell beim Wildtyp die Inflammation durch eine polymikrobielle Fäkalienlösung induziert. Die PMN-Migration wurde wie im Modell der Zymosan-induzierten Sepsis vier Stunden später durchflusszytometrisch bestimmt und immunhistochemisch dargestellt. Die nachfolgende Abbildung fasst die Ergebnisse der PMN-Migration während fäkal-induzierter Peritonitis zusammen.

Vier Stunden nach der Injektion der Fäkalienlösung erhöhte sich die durchflusszytometrisch erfasste PMN-Anzahl in Blut, Peritoneallavage, Lunge und Leber (Mittelwerte \pm Standardabweichung). Im Blut steigerte sie sich von $4,07 \pm 3,61 \cdot 10^4$ in der unstimulierten Kontrolle auf $3,16 \pm 2,28 \cdot 10^5$ vier Stunden nach Inflammationsbeginn. In der PL ergab sich eine Erhöhung der PMN-Zahl von $1,31 \pm 2,76 \cdot 10^5$ auf $3,97 \pm 0,88 \cdot 10^6$. In den Organen vermehrten sich die nachgewiesenen PMNs im Verlauf der Inflammation von $1,30 \pm 0,72 \cdot 10^5$ auf $1,74 \pm 0,57 \cdot 10^6$ in der Lunge und von $1,18 \pm 0,55 \cdot 10^5$ auf $1,29 \pm 0,39 \cdot 10^6$ in der Leber.

Die prophylaktische Antagonisierung der SDF-1 Rezeptoren CXCR4 und CXCR7 reduzierte die Migration der neutrophilen Granulozyten in die Organe und die Peritoneallavage. In der PL lag die PMN-Anzahl nach CCX771-Gabe bei $2,72 \pm 1,00 \cdot 10^6$ PMNs pro ml und nach AMD3100-Behandlung bei $2,70 \pm 0,93 \cdot 10^6$. In der Lunge verminderte sich die Zahl der migrierten PMNs bei prophylaktischer CCX771-Gabe auf $1,04 \pm 0,37 \cdot 10^6$ und nach AMD3100-Behandlung auf $7,99 \pm 2,83 \cdot 10^5$. Wir wiesen in der Leber nach CCX771-Gabe $6,35 \pm 4,61 \cdot 10^5$ PMNs nach und nach AMD3100-Gabe $3,57 \pm 1,97 \cdot 10^5$. Im Blut reduzierte der CXCR7-Antagonismus mit CCX771 die PMN-Anzahl auf $1,10 \pm 0,81 \cdot 10^5$. Durch die AMD3100-Behandlung ergab sich keine signifikante Veränderung und die PMN-Anzahl lag bei $1,46 \pm 1,42 \cdot 10^5$.

In der immunhistochemischen Anfärbung der PMNs wurden die durchflusszytometrischen Ergebnisse bestätigt. Vier Stunden nach der Injektion

der Fäkalienlösung migrierten verstärkt PMNs in die Organe. Das Epithel des Peritoneums stellte sich gelockert und die Alveolarsepten der Lunge verdickt dar. Es zeigte sich histologisch beurteilt eine verstärkte Ausprägung der Inflammation im Vergleich zum Zymosan-induzierten Modell. Durch den Antagonismus der SDF-1 Rezeptoren konnten im FIP-Modell die protektiven Eigenschaften in Bezug auf eine reduzierte PMN-Migration histologisch bestätigt werden.

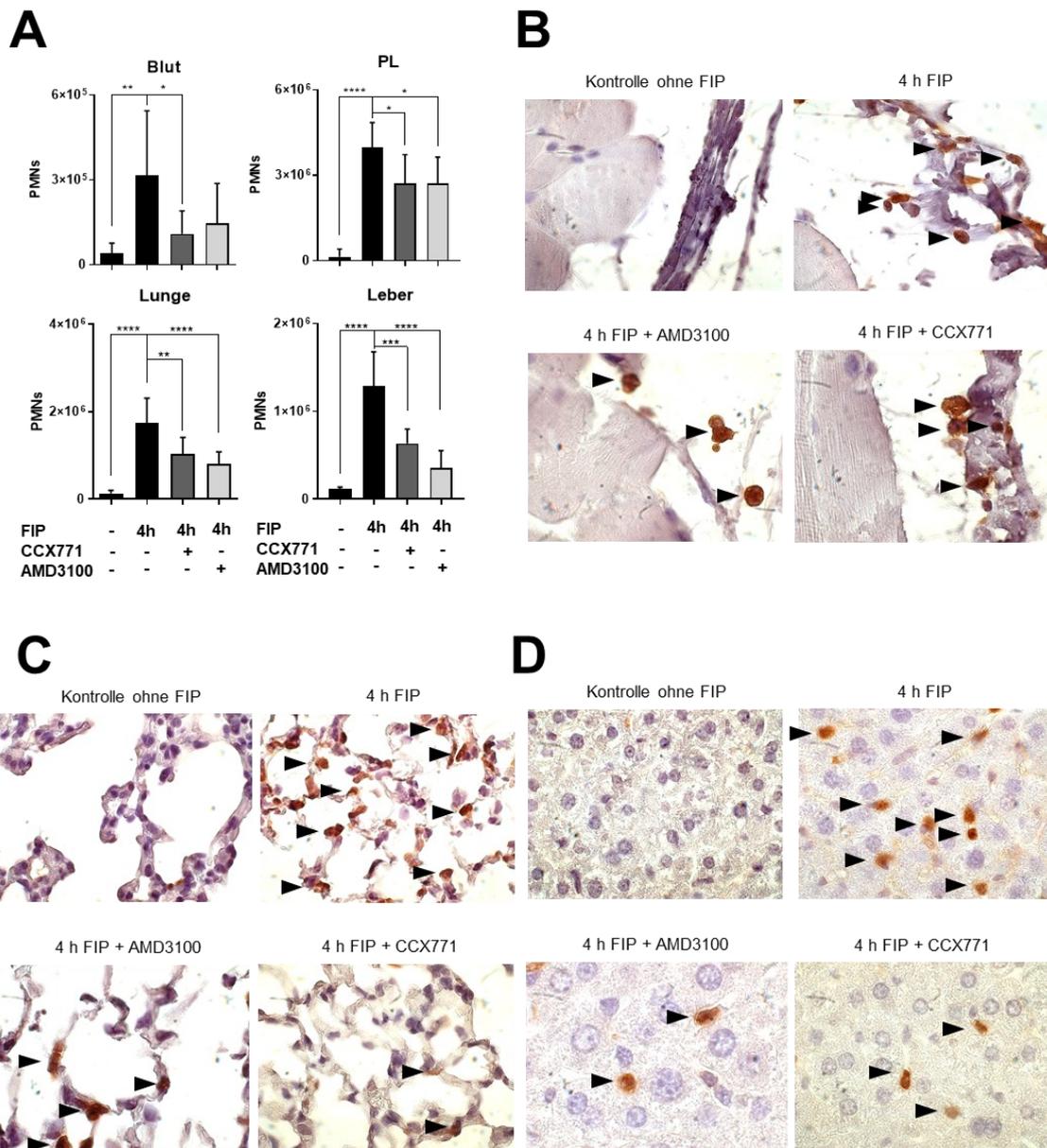


Abbildung 18: Migration (A) und immunhistochemische Anfärbung (C-D) der PMNs des Wildtyps während polymikrobieller bzw. fäkal-induzierter Peritonitis und Sepsis (FIP). (A) Durchflusszytometrie: Abgebildet ist hier die unstimulierte Kontrolle im Vergleich zur fäkal-stimulierten Kontrolle (vier Stunden nach Injektion der Fäkalienlösung). Zusätzlich sind die prophylaktisch mit den Antagonisten behandelten Gruppen zu sehen, ebenfalls vier Stunden nach Injektion der Fäkalienlösung. Dargestellt sind hier die Mittelwerte ±

der Standardabweichung (n=6-12), *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001 und ****p < 0,0001. Immunhistochemische Anfärbung der PMNs in Peritoneum (B), Lunge (C) und Leber (D). Die PMNs sind braun und wurden durch Pfeile markiert, 100x Vergrößerung, n=3. (Ngamsri et al., 2020)

Zur Quantifizierung wurden die immunhistochemisch angefärbten PMNs wie auch im Zymosanmodell in repräsentativen Ausschnitten ausgezählt und in der folgenden Abbildung dargestellt. In Peritoneum, Lunge und Leber führte die Injektion der Fäkalienlösung nach vier Stunden zu höheren PMN-Zahlen verglichen mit der unstimulierten Kontrolle im Parenchym der Organe. Im Peritoneum stieg die Anzahl von $0,00 \pm 0,00$ auf $10,67 \pm 3,22$, in der Lunge erhöhte sie sich von $0,67 \pm 0,58$ auf $12,00 \pm 3,00$ und in der Leber ergab sich ein Zuwachs von $0,33 \pm 0,58$ auf $7,33 \pm 1,53$. Die Antagonisierung der SDF-1 Rezeptoren reduzierte die PMN-Organinfiltration in den repräsentativen Ausschnitten: Nach CXCR7-Antagonismus lag die PMN-Anzahl im Peritoneum bei $3,33 \pm 2,31$, in der Lunge bei $4,33 \pm 3,22$ und in der Leber bei $2,33 \pm 0,58$. Der CXCR4-Antagonismus führte im Peritoneum zu einer signifikanten Reduktion der PMNs auf $2,33 \pm 1,56$, in der Lunge auf $3,67 \pm 1,53$ PMNs und in der Leber auf $1,33 \pm 0,58$ PMNs.

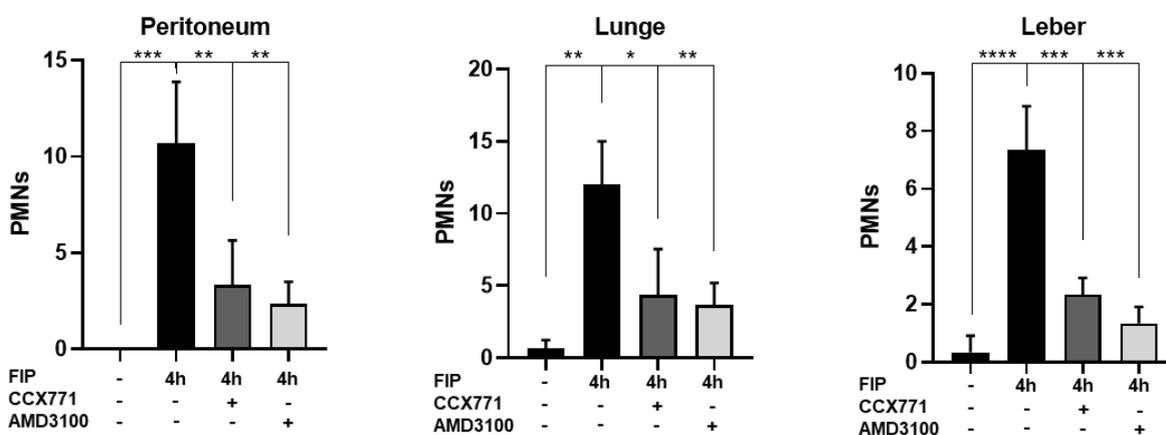


Abbildung 19: Auszählung der PMNs in Peritoneum, Lunge und Leber in der fäkal-induzierten Peritonitis und Sepsis beim Wildtyp. In dieser Abbildung sind die ausgezählten neutrophilen Granulozyten dargestellt. Es bestätigen sich die Ergebnisse der Durchflusszytometrie in einem Vergleich der unstimulierten Kontrolle mit der fäkal-stimulierten Kontrolle und den prophylaktisch mit den Antagonisten behandelten Gruppen (je vier Stunden nach Inflammationsbeginn). Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung (n=3), *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001 und ****p < 0,0001.

4.6. Reduktion der Bildung von Plättchen-Neutrophilen-Komplexen durch SDF-1 Rezeptorantagonismus

Der Einfluss der SDF-1 Rezeptorantagonisten auf die Bildung von Plättchen-Neutrophilen-Komplexen (PNCs) im Blut und in den Organen wurde durch durchflusszytometrische Auszählung und immunhistochemische Anfärbung der PNCs bestimmt. Im Blut wurden neben den PNCs ebenfalls die beteiligten Selektine (P-Selektin, L-Selektin und PSGL-1) bzw. deren Fluoreszenzintensität durchflusszytometrisch ermittelt und in der folgenden Abbildung dargestellt. Zur Darstellung der PNCs in den Organen wurden zuerst die PMNs blaugrün und anschließend die Thrombozyten braun angefärbt. Die histologischen Aufnahmen der PNCs während Zymosan-induzierter Peritonitis werden hier zur Veranschaulichung erneut einmalig vergrößert dargestellt (siehe Abbildung 21). Ebenfalls wurden die PNCs in den Organen in repräsentativen Ausschnitten ausgezählt und die Ergebnisse in Abbildung 22 zusammengefasst.

Vier Stunden nach der Zymosaninjektion bildeten sich im Blut vermehrt Komplexe aus neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten. Angegeben ist der Anteil der PNCs an der Gesamtzahl der PMNs (Anteil der CD42b- und Ly6G-positiven Zellen innerhalb aller Ly6G-positiven Zellen; Mittelwerte \pm Standardabweichung). Der PNC-Anteil stieg von $1,71 \pm 1,53$ % in der unstimulierten Kontrolle auf $25,30 \pm 8,83$ % in den Tieren vier Stunden nach Zymosaninjektion an. Durch die prophylaktische Gabe der SDF-1 Rezeptorantagonisten reduzierte sich der PNC-Anteil innerhalb der PMNs auf $4,55 \pm 2,12$ % bei CCX771-Gabe und auf $4,32 \pm 1,11$ % nach Gabe von AMD3100. Die mediane Fluoreszenzintensität (MFI) von P-Selektin auf den PNCs erhöhte sich im Blut vier Stunden nach der Zymosaninjektion und nahm durch den prophylaktischen CXCR4- und CXCR7-Antagonismus wieder ab. In den unstimulierten Kontrollen konnte kein P-Selektin auf den PNCs nachgewiesen werden ($0,00 \pm 0,00$) und in der stimulierten Kontrolle lag die MFI bei $2,40 \pm 0,54 \cdot 10^3$. Durch die Gabe von CCX771 reduzierte sich P-Selektin auf den PNCs auf $8,04 \pm 4,41 \cdot 10^2$ und durch AMD3100 auf $8,74 \pm 4,98 \cdot 10^2$. Die MFI von L-Selektin vermehrte sich auf den PNCs durch die Inflammation von $51,84 \pm 5,41$ auf $31,96 \pm 6,82 \cdot 10^2$. L-Selektin wurde nur durch die prophylaktische

CCX771-Gabe signifikant im Vergleich zur stimulierten Kontrolle auf $23,21 \pm 5,30 \cdot 10^2$ reduziert. Durch AMD3100 ergab sich keine Veränderung und die MFI von L-Selektin lag hier bei $25,67 \pm 7,52 \cdot 10^2$. Dagegen reduzierte nur die prophylaktische AMD3100-Gabe PSGL-1 auf den PNCs. Die MFI von PSGL-1 stieg von $7,85 \pm 1,44 \cdot 10^2$ bei der Kontrolle ohne Zymosangabe auf $2,31 \pm 0,34 \cdot 10^3$ in den Mäusen vier Stunden nach Zymosaninjektion an, wurde durch die CCX771-Gabe nicht reduziert und lag hier bei $3,54 \pm 0,27 \cdot 10^3$. Die AMD3100-Gabe führte zu einer Reduktion der MFI auf $1,45 \pm 0,51 \cdot 10^3$.

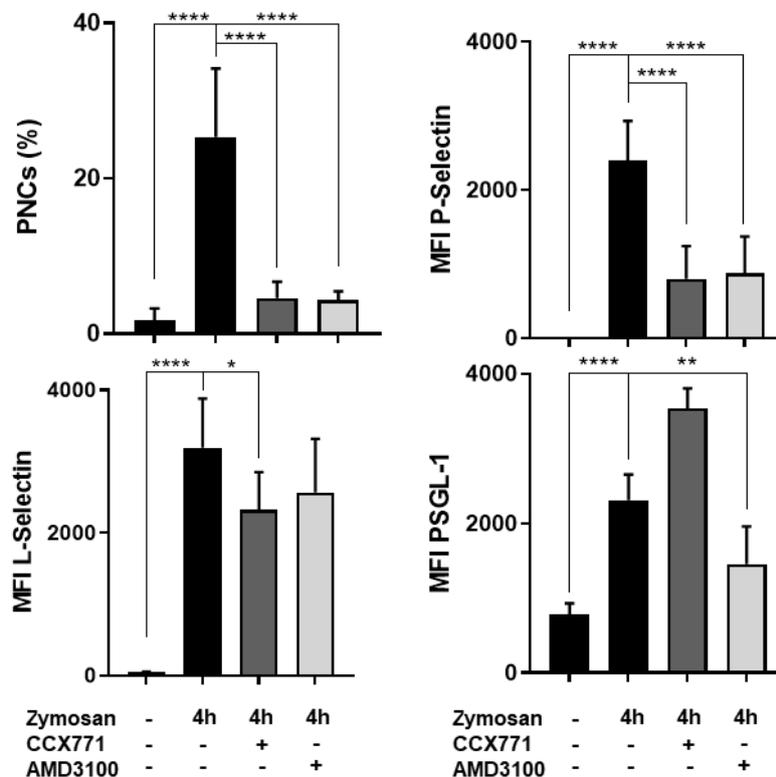


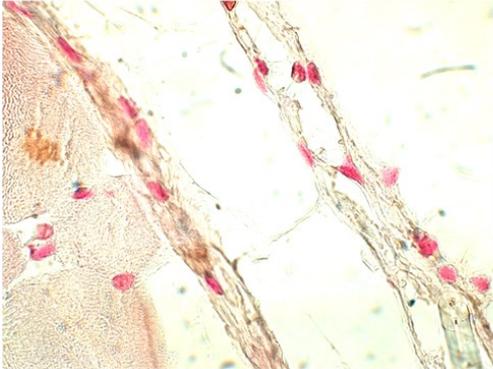
Abbildung 20: PNC-Bildung im Blut und mediane Fluoreszenzintensität (MFI) von P-Selektin, L-Selektin und PSGL-1 auf den PNCs beim Wildtyp während Zymosan-induzierter Peritonitis und Sepsis. Es werden die unstimulierten Tiere mit denen der alleinigen Zymosangabe (stimulierte Kontrollen) und mit den zusätzlich prophylaktisch mit den SDF-1 Rezeptorantagonisten behandelten Tieren verglichen. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte mit der Standardabweichung (n=4-14), *p < 0,05; **p < 0,01 und ****p < 0,0001. (Ngamsri et al., 2021)

Um die Einwanderung der PNCs in die Organe in den histologischen Bildern zu quantifizieren, wurden die PNCs in Peritoneum, Lunge und Leber angefärbt und anschließend in repräsentativen Ausschnitten ausgezählt. Vier Stunden nach der Zymosaninjektion bildeten sich verstärkt PNCs in den Organen. Durch die prophylaktische Gabe der SDF-1 Antagonisten AMD3100 und CCX771

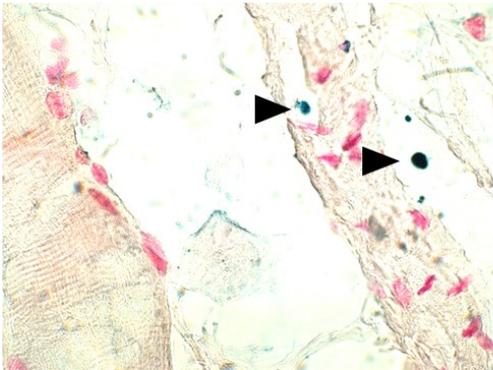
reduzierten sich die nachgewiesenen PNCs (im Folgenden werden Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben). Im Peritoneum stieg die Anzahl der PNCs von $1,00 \pm 1,16$ bei den unstimulierten Tieren auf $7,75 \pm 2,75$ bei den Tieren mit alleiniger Zymosaninjektion an. Durch den Antagonismus von CXCR7 reduzierten sich die PNCs im Peritoneum auf $2,50 \pm 1,29$ und auf $3,25 \pm 1,26$ durch CXCR4-Antagonismus. In der Lunge erhöhte sich die PNC-Anzahl von $0,75 \pm 1,50$ ohne Zymosaninjektion auf $5,50 \pm 1,73$ vier Stunden nach Injektion und reduzierte sich durch den Antagonismus auf $2,75 \pm 0,96$ (CCX771) und $1,25 \pm 0,96$ (AMD3100). Die PNCs der repräsentativen Ausschnitte der Leber lagen ohne Stimulation bei $0,25 \pm 0,50$ und bildeten sich hier durch die Zymosangabe verstärkt ($14,00 \pm 0,82$). Der CXCR7-Antagonismus reduzierte die PNCs in der Leber auf $5,00 \pm 2,16$ und die Antagonisierung von CXCR4 auf $8,75 \pm 1,89$.

A

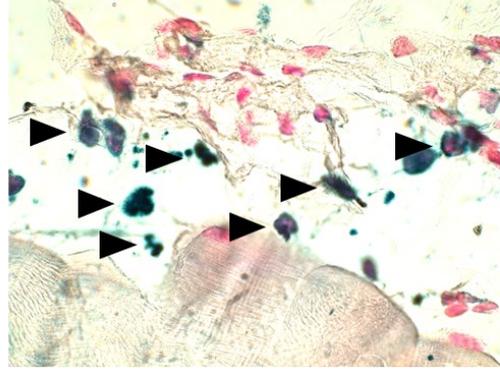
Kontrolle ohne Zymosan



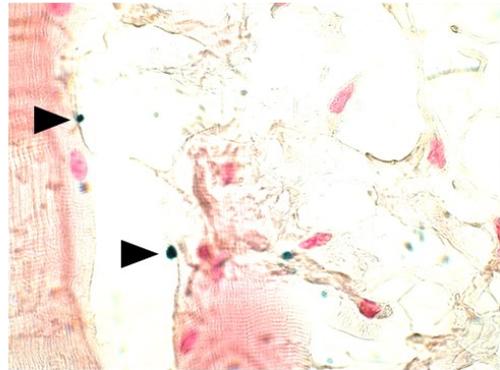
4h Zymosan + AMD3100



4h Zymosan

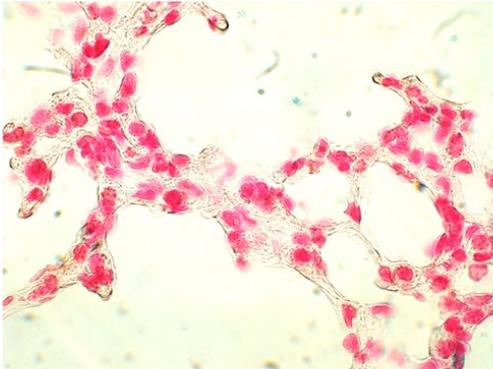


4h Zymosan + CCX771

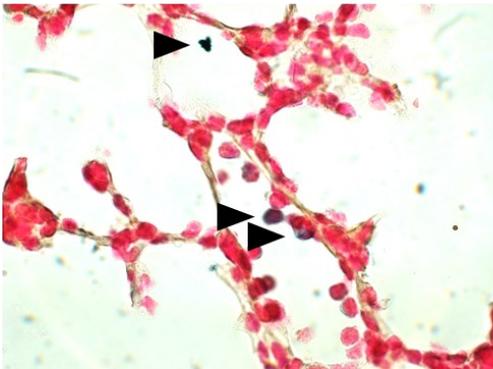


B

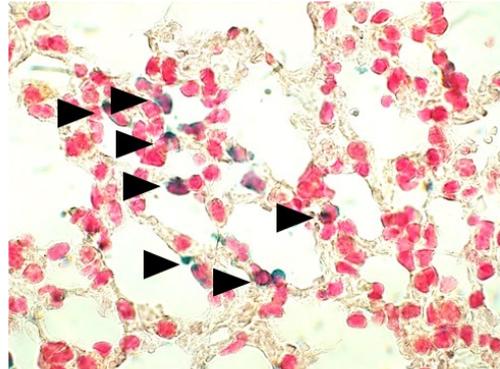
Kontrolle ohne Zymosan



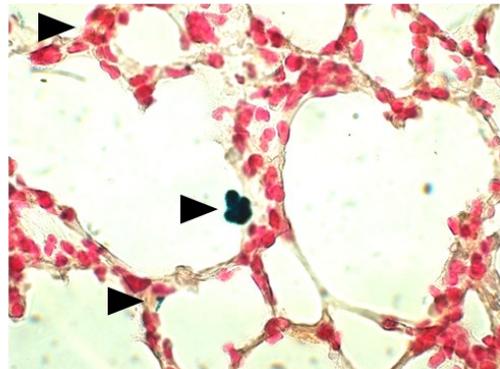
4h Zymosan + AMD3100



4h Zymosan



4h Zymosan + CCX771



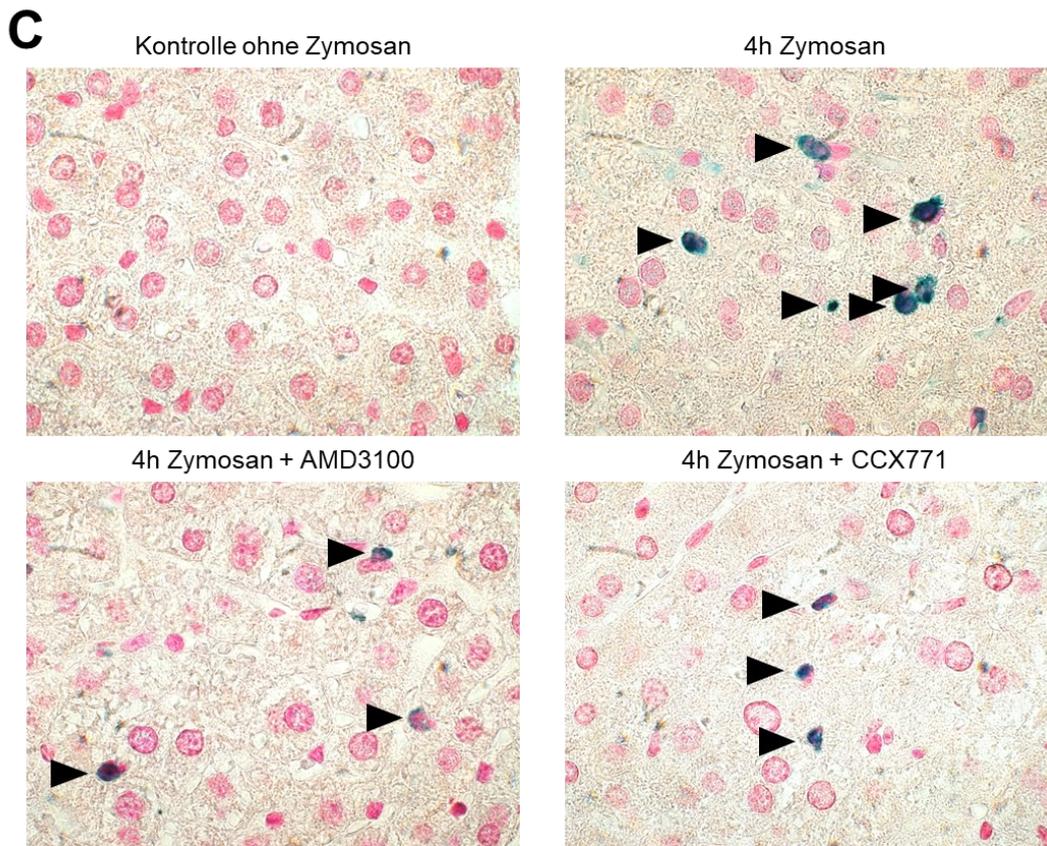


Abbildung 21: Immunhistochemische Anfärbung der PNCs in Peritoneum (A), Lunge (B) und Leber (C) während Zymosan-induzierter Peritonitis und Sepsis beim Wildtyp. Durch den Antagonismus stellt sich in den histologischen Bildern das Epithel des Peritoneums intakter, die Alveolarsepten verschmälert und die PNC-Bildung (durch Pfeile markiert) reduziert dar. In dieser Färbung erscheinen die PMNs bläulich, die Thrombozyten braun und die PNCs blau / schwarz. Diese Abbildung wurde zur Veranschaulichung vergrößert dargestellt. Es werden die unbehandelten Mäuse mit den stimulierten Mäusen (vier Stunden nach Zymosangabe) und die prophylaktisch mit den Antagonisten behandelten Tiere (ebenfalls vier Stunden nach Zymosangabe) abgebildet. 100x Vergrößerung, n=4. (Ngamsri et al., 2021)

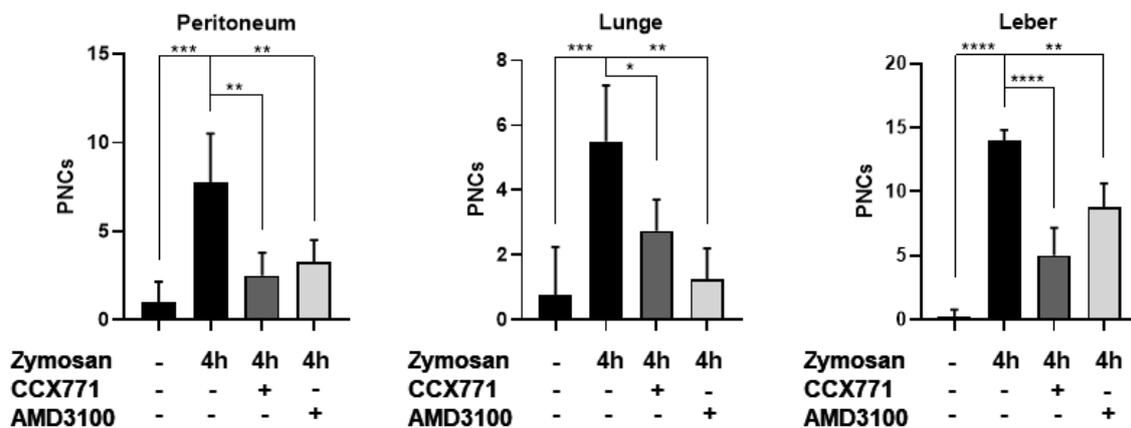


Abbildung 22: Auszählung der PNCs in Peritoneum, Lunge und Leber in der Zymosan-induzierten Peritonitis und Sepsis beim Wildtyp. Es bestätigen sich die Ergebnisse der Durchflusszytometrie in der

Auszählung der PNCs in repräsentativen Ausschnitten. Es wird die stimulierte mit der nicht-stimulierten Kontrolle verglichen sowie die beiden prophylaktisch mit den Antagonisten behandelten Gruppen. Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardabweichung (n=4), *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001 und ****p < 0,0001. (Ngamsri et al., 2021)

4.7. Aufhebung der Effekte der SDF-1 Rezeptorantagonisten auf die PNC-Bildung durch A_{2B} Knockout

Um die Auswirkungen des A_{2B} Adenosinrezeptors auch auf die PNC-Bildung unter SDF-1 Rezeptorantagonismus zu untersuchen, wurde die PNC-Bildung in A_{2B}-KO-Mäusen in der unstimulierten Kontrolle, der stimulierten Kontrolle vier Stunden nach Zymosangabe und nach prophylaktischem CXCR4- und CXCR7-Antagonismus betrachtet. Die nachfolgende Abbildung fasst die Ergebnisse der durchflusszytometrisch erfassten PNC-Bildung im Blut, die daran beteiligten Selektine und die histologischen Aufnahmen der PNCs in den Organen zusammen.

Wie in den Wildtyptieren bildeten sich im Blut vier Stunden nach der Zymosaninjektion verstärkt Komplexe aus Thrombozyten und neutrophilen Granulozyten (Mittelwerte \pm Standardabweichung). Der Anteil der PNCs an der PMN-Gesamtzahl stieg von $2,12 \pm 1,56$ % bei der unstimulierten Kontrolle auf $29,28 \pm 6,03$ % vier Stunden nach Zymosaninjektion an. Ebenso erhöhte sich die mediane Fluoreszenzintensität von P-Selektin auf den PNCs durch die Inflammation von $6,29 \pm 2,53 \cdot 10^2$ auf $2,22 \pm 0,60 \cdot 10^3$. Die MFI von L-Selektin steigerte sich durch die Inflammation von $8,50 \pm 2,38 \cdot 10$ auf $1,83 \pm 0,28 \cdot 10^3$ und die von PSGL-1 von $8,89 \pm 7,65 \cdot 10^2$ auf $3,58 \pm 2,19 \cdot 10^3$. Der SDF-1 Rezeptorantagonismus führte in den A_{2B} Knockout Tieren zu keiner Reduktion der PNCs oder der Adhäsionsmoleküle. Der Anteil der PNCs lag nach prophylaktischer CCX771-Gabe bei $23,99 \pm 8,24$ % und nach Gabe von AMD3100 bei $25,50 \pm 5,91$ %. P-Selektin wurde durch den Antagonismus bei den KO-Tieren nicht reduziert nachgewiesen und dessen Fluoreszenzintensität auf den PNCs wiesen wir bei erfolgter CCX771-Gabe mit $3,42 \pm 0,59 \cdot 10^3$ nach und mit $2,70 \pm 1,49 \cdot 10^3$ nach AMD3100-Gabe. L-Selektin konnte durch den Antagonismus der SDF-1 Rezeptoren ebenfalls nicht vermindert werden und wurde nach CCX771-Gabe mit einer medianen Fluoreszenzintensität von $1,89 \pm 0,98 \cdot 10^3$ und mit $1,44 \pm 0,80 \cdot 10^3$ nach AMD3100-Gabe auf den PNCs

nachgewiesen. Ebenso ergab sich für PSGL-1 keine Reduktion und die MFI lag nach dem Antagonismus von CXCR7 bei $4,36 \pm 1,57 \cdot 10^3$ und nach dem CXCR4-Antagonismus bei $4,10 \pm 0,76 \cdot 10^3$.

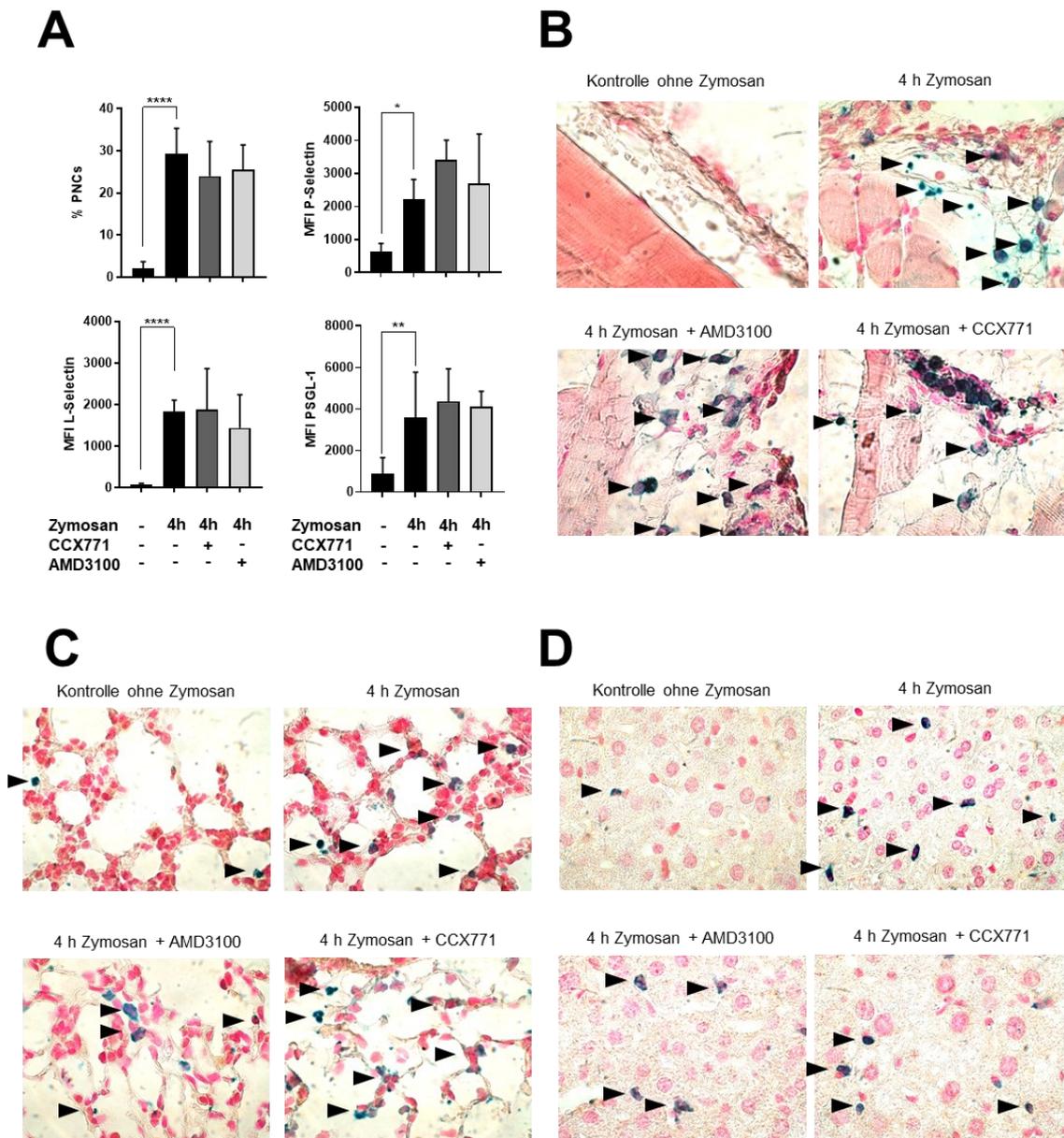


Abbildung 23: Bildung von PNCs im Blut und in den Organen in den A_{2B} Knockout Tieren. In (A) ist die durchflusszytometrisch erfasste PNC-Bildung im Blut und die mediane Fluoreszenzintensität (MFI) von P-Selektin, L-Selektin und PSGL-1 auf den PNCs in den A_{2B}-KO-Tieren während Zymosan-induzierter Peritonitis und Sepsis abgebildet. Im Vergleich der unstimulierten Kontrolle, der stimulierten Kontrolle und den prophylaktisch mit den Antagonisten behandelten Gruppen zeigt sich in den Knockout Tieren keine Reduktion der PNC-Bildung oder der Selektine durch den SDF-1 Rezeptorantagonismus. Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardabweichung (n=4-12), *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001 und ****p < 0,0001. (B-D) bildet die immunhistochemische Anfärbung der PNCs in Peritoneum (B), Lunge (C) und Leber (D) ab. Die

PNCs stellen sich blau / schwarz dar und wurden durch Pfeile gekennzeichnet, 100x Vergrößerung, n=4. (Ngamsri et al., 2021)

Die durchflusszytometrischen Ergebnisse zur PNC-Bildung im Blut konnten durch immunhistochemische Anfärbung und Auszählung der PNCs in den Organen bestätigt werden (siehe Abbildung 24). Durch die Inflammation stieg die PNC-Anzahl in den Organen an und konnte durch den prophylaktischen Antagonismus der SDF-1 Rezeptoren in den A_{2B}-KO-Tieren nicht reduziert werden (angegeben sind Mittelwerte \pm Standardabweichung). Im Peritoneum vermehrten sich die ausgezählten PNCs von $0,00 \pm 0,00$ in den unbehandelten Mäusen auf $10,75 \pm 3,59$ in der stimulierten Kontrolle. Durch die CCX771-Gabe ergab sich wie durch die AMD3100-Gabe keine Reduktion der Zellzahlen. Die ausgezählten PNCs lagen hier bei $9,50 \pm 1,73$ nach Gabe von CCX771 und bei $20,25 \pm 3,40$ in der AMD3100-Gruppe. In den repräsentativen Ausschnitten der Lunge konnte eine Steigerung der PNCs von $1,25 \pm 0,96$ auf $8,75 \pm 1,71$ in den unbehandelten und den alleinig mit Zymosan behandelten Tieren ausgezählt werden. Nach dem Antagonismus fanden sich die PNCs ohne signifikante Reduktion bei $7,50 \pm 1,29$ nach CCX771-Gabe und bei $7,25 \pm 0,50$ nach Gabe von AMD3100. Die PNCs der Leber steigerten sich von $1,00 \pm 0,82$ in der unstimulierten Kontrolle auf $16,75 \pm 3,30$ vier Stunden nach Zymosaninjektion. Durch den Antagonismus der SDF-1 Rezeptoren ergab sich keine Reduktion: Nach CCX771-Gabe zählten wir $14,50 \pm 1,29$ PNCs und nach Gabe von AMD3100 $13,25 \pm 2,63$.

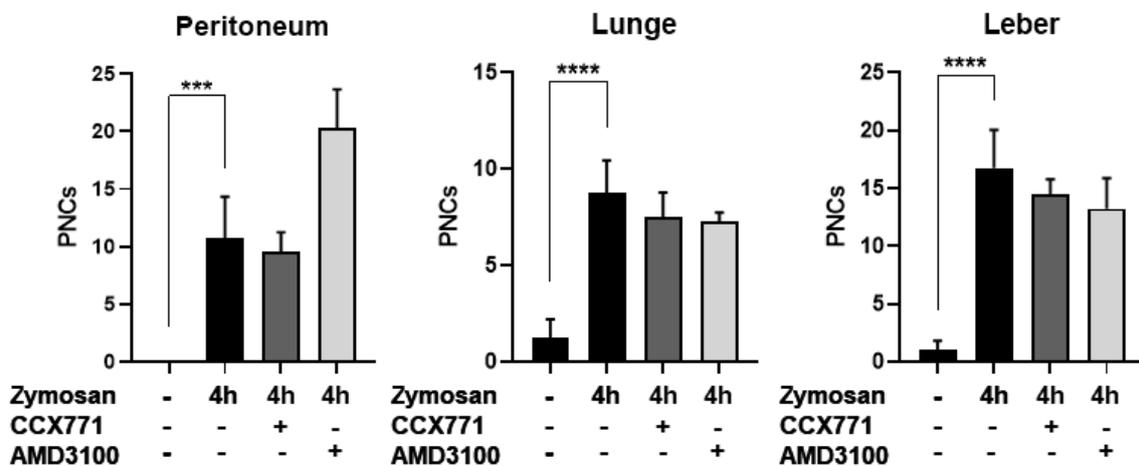


Abbildung 24: Ausgezählte PNCs in den Organen während der Zymosan-induzierten Peritonitis und Sepsis in den A_{2B}-KO-Tieren. Es wurden repräsentative Ausschnitte ausgewählt und die PNCs in diesen ausgezählt. Verglichen wird die nicht-behandelte Kontrolle mit der mit Zymosan stimulierten Kontrolle und die prophylaktisch mit den Antagonisten behandelten Gruppen je vier Stunden nach Zymosangabe. Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardabweichung (n=4), *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001 und ****p < 0,0001. (Ngamsri et al., 2021)

4.8. Reduktion der Bildung von Plättchen-Neutrophilen-Komplexen durch SDF-1 Rezeptorantagonismus in der polymikrobiellen Peritonitis und Sepsis

Die PNC-Bildung im Blut und die mediane Fluoreszenzintensität (MFI) der Selektine auf den PNCs wurde während der fäkal-induzierten Peritonitis und Sepsis durchflusszytometrisch bestimmt. In den Organen wurden die PNCs zudem immunhistochemisch angefärbt und ausgezählt. Die Ergebnisse zur PNC-Bildung während polymikrobieller Sepsis werden in den beiden nachfolgenden Abbildungen dargestellt.

Es konnte vier Stunden nach Injektion der Fäkalienlösung eine verstärkte PNC-Bildung im Blut beobachtet werden (Mittelwerte \pm Standardabweichung). Der Anteil der PNCs an der PMN-Gesamtanzahl lag bei der unstimulierten Kontrolle bei $1,71 \pm 1,53$ % und steigerte sich vier Stunden nach Injektion der Fäkalienlösung auf $13,05 \pm 7,12$ %. Durch die Antagonisierung der SDF-1 Rezeptoren ergab sich auch im Modell der fäkalen Stimulation eine Reduktion der PNCs im Blut. Der Anteil der PNCs lag nach CCX771-Behandlung bei $7,11 \pm 6,90$ % und bei AMD3100-Gabe bei $5,79 \pm 4,10$ %. Die MFI der Selektine auf den

PNCs verstärkte sich durch die fäkal-induzierte Inflammation: P-Selektin steigerte sich von $0,00 \pm 0,00$ bei den unstimulierten Tieren auf $8,54 \pm 0,76 \cdot 10^2$ vier Stunden nach intraperitonealer Injektion der Fäkalienlösung. L-Selektin erhöhte sich von $0,00 \pm 0,00$ auf $1,73 \pm 4,50 \cdot 10^3$ und PSGL-1 von $1,20 \pm 0,49 \cdot 10^3$ auf $2,65 \pm 1,28 \cdot 10^3$. Der Antagonismus beider SDF-1 Rezeptoren führte zu einer Reduktion der auf den PNCs bestimmten MFI von PSGL-1. Die Gabe von CCX771 ergab eine MFI von $1,38 \pm 0,36 \cdot 10^3$ und die von AMD3100 von $1,50 \pm 0,50 \cdot 10^3$. Für die P-Selektin-Intensität ergab sich keine Reduktion durch den CXCR4- oder CXCR7-Antagonismus und die medianen Fluoreszenzwerte lagen nach CCX771-Gabe bei $8,89 \pm 2,26 \cdot 10^2$ und bei $1,03 \pm 0,51 \cdot 10^3$ nach AMD3100-Behandlung. L-Selektin konnte nur durch den CXCR4-Antagonismus signifikant auf den PNCs vermindert werden. Nach AMD3100-Gabe lag die mediane Intensität bei $1,11 \pm 0,21 \cdot 10^3$ und nach CCX771-Gabe bei $1,49 \pm 0,01 \cdot 10^3$.

Die in den Organpräparaten immunhistochemisch gefärbten und ausgezählten PNCs steigerten sich im Rahmen der Inflammationsreaktion nach Injektion der polymikrobiellen Fäkalienlösung. Der prophylaktische Antagonismus mit CCX771 und AMD3100 reduzierte mit Ausnahme von CCX771 in der Lunge die Anzahl der PNCs in den Organen. Im Peritoneum ergab sich eine Erhöhung der PNC-Anzahl von $1,00 \pm 1,16$ bei der unstimulierten Kontrolle auf $8,00 \pm 2,16$ in der stimulierten Kontrolle. Durch den CXCR7-Antagonismus reduzierte sich die Anzahl der ausgezählten PNCs auf $4,50 \pm 1,73$ und auf $4,00 \pm 1,41$ nach CXCR4-Antagonismus. In der Lunge lag die PNC-Anzahl bei der Kontrolle ohne FIP bei $0,75 \pm 1,50$ und stieg vier Stunden nach der Stimulation mit der Fäkalienlösung auf $6,75 \pm 0,96$ an. Nur durch den CXCR4-Antagonismus wurde die PNC-Anzahl auf $3,50 \pm 1,29$ reduziert. Nach CXCR7-Antagonisierung lagen die PNCs in der Lunge bei $5,50 \pm 0,58$. In der Leber betrug die Zahl der PNCs $0,25 \pm 0,50$ in der Kontrolle ohne FIP und erhöhte sich signifikant auf $10,50 \pm 2,08$ im Rahmen der Inflammation. Die Gabe von CCX771 reduzierte die PNCs auf $4,00 \pm 1,41$ und die Behandlung mit AMD3100 auf $6,00 \pm 2,00$.

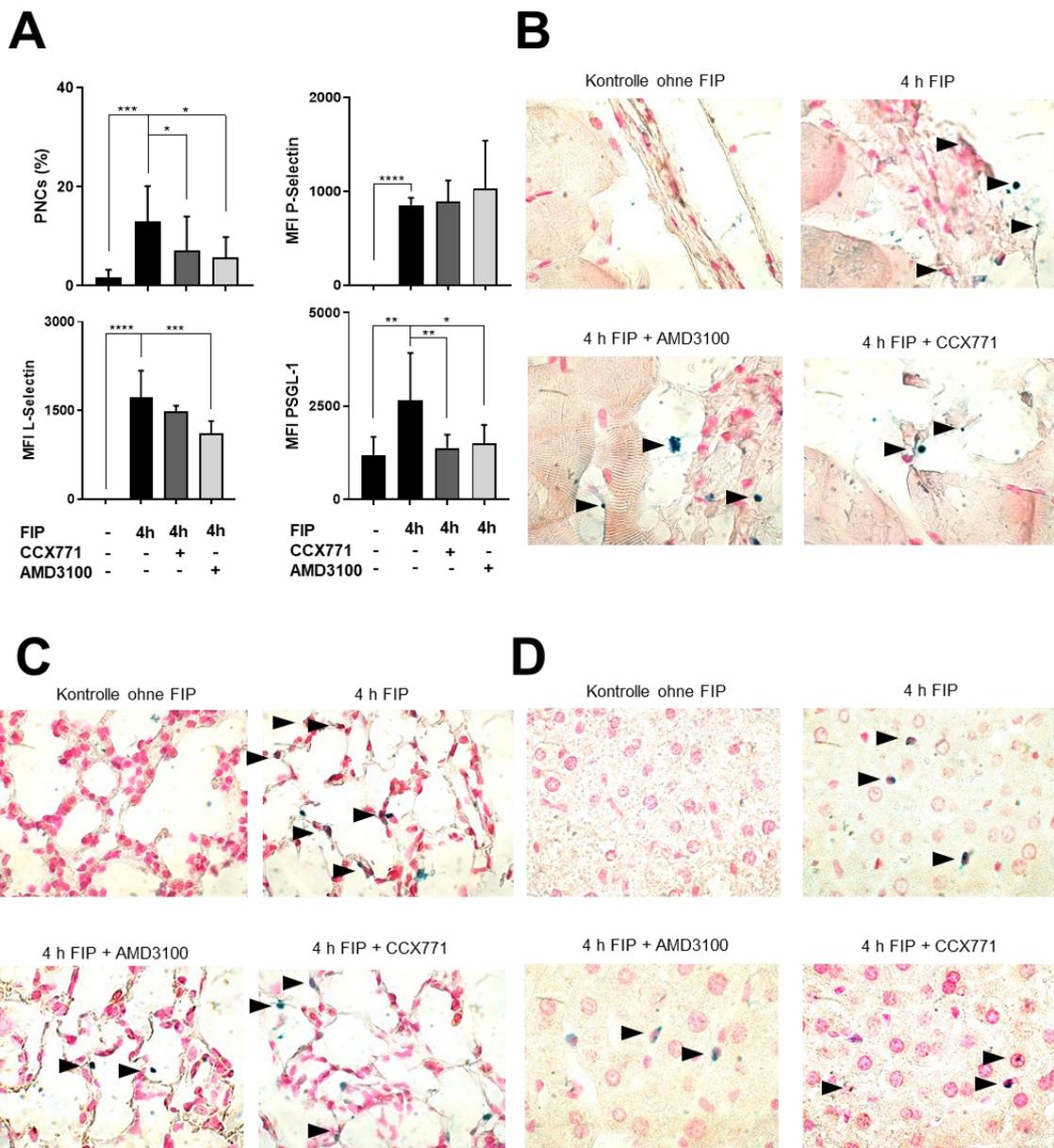


Abbildung 25: PNC-Bildung im Blut und in den Organen während fäkal-induzierter Peritonitis und Sepsis im Wildtyp (FIP). (A) zeigt die durchflusszytometrisch erfasste PNC-Bildung im Blut und die mediane Fluoreszenzintensität (MFI) der Selektine auf den Wildtyp-PNCs in der polymikrobiellen Inflammation. Es werden die unbehandelten Mäuse mit den alleinig mit Fäkalienlösung stimulierten Tieren und die prophylaktisch mit den Antagonisten behandelten Gruppen verglichen (jeweils vier Stunden nach Injektion der Fäkalienlösung). Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n=5-17$), * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ und **** $p < 0,0001$. In (B-D) ist die immunhistochemische Anfärbung der PNCs im Peritoneum (B), der Lunge (C) und der Leber (D) dargestellt. Die PNCs stellen sich blau bzw. schwarz dar und wurden zusätzlich mit Pfeilen markiert, 100x Vergrößerung, $n=4$. (Ngamsri et al., 2021)

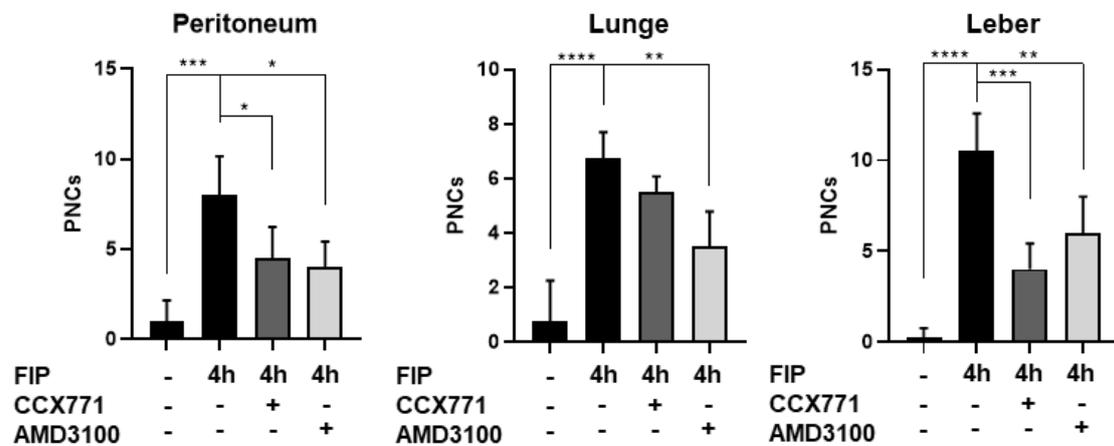


Abbildung 26: Quantifizierung der PNCs in den Organen während der polymikrobiellen Peritonitis und Sepsis im Wildtyp (FIP). Die PNCs wurden in repräsentativen Ausschnitten ausgezählt. Verglichen wird die unstimulierte mit der stimulierten Kontrolle und die mit den Antagonisten prophylaktisch behandelten Gruppen (alle vier Stunden nach Injektion der Fäkalienlösung). Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardabweichung (n=4), *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001 und ****p < 0,0001. (Ngamsri et al., 2021)

4.9. Reduktion inflammatorischer Zytokine und Chemokine im Plasma durch SDF-1 Rezeptorantagonismus

Die Konzentrationen der proinflammatorischen Zytokine TNF α und IL-6 und der Chemokine CXCL1 und CXCL2/3 wurden im Blutplasma der Mäuse während Zymosan-induzierter Peritonitis und Sepsis bestimmt und in Abbildung 27 dargestellt.

Vier Stunden nach der Zymosaninjektion stiegen bei allen untersuchten Zytokinen bzw. Chemokinen die Plasmakonzentrationen an und wurden durch die SDF-1 Rezeptorantagonisten reduziert (Mittelwerte \pm Standardabweichung, Angaben in pg/ml Plasma und $\cdot 10^2$). Im Plasma der unbehandelten Tiere lag TNF α bei $0,26 \pm 0,05$ und erhöhte sich durch die Inflammation auf $2,07 \pm 0,12$. Es wurde durch den CXCR7-Antagonismus auf $1,85 \pm 0,02$ und durch die Antagonisierung von CXCR4 auf $1,71 \pm 0,07$ reduziert. IL-6 wurde im Plasma der unstimulierten Kontrolle nicht nachgewiesen ($0,00 \pm 0,00$ pg/ml). Im Rahmen der Inflammation konnte es mit gesteigerter Konzentration mit $2,51 \pm 0,72$ (vier Stunden nach Zymosaninjektion) gemessen werden und wurde durch die CCX771-Gabe auf $1,64 \pm 0,54$ und durch die AMD3100-Behandlung auf $0,81 \pm 0,52$ reduziert. CXCL1 steigerte sich von $0,30 \pm 0,02$ in der nicht-behandelten

Gruppe auf $0,67 \pm 0,31$ nach alleiniger Zymosangabe. Es reduzierte sich durch den Antagonismus mit CCX771 auf $0,44 \pm 0,14$ und die Behandlung mit AMD3100 auf $0,34 \pm 0,07$. Der Plasmaspiegel von CXCL2/3 vermehrte sich von $1,59 \pm 0,08$ auf $6,49 \pm 3,09$ im Rahmen der Inflammation. Die Behandlung mit CCX771 konnte die Konzentration des Zytokins auf $3,35 \pm 1,83$ senken und die prophylaktische Gabe von AMD3100 auf $3,74 \pm 0,60$.

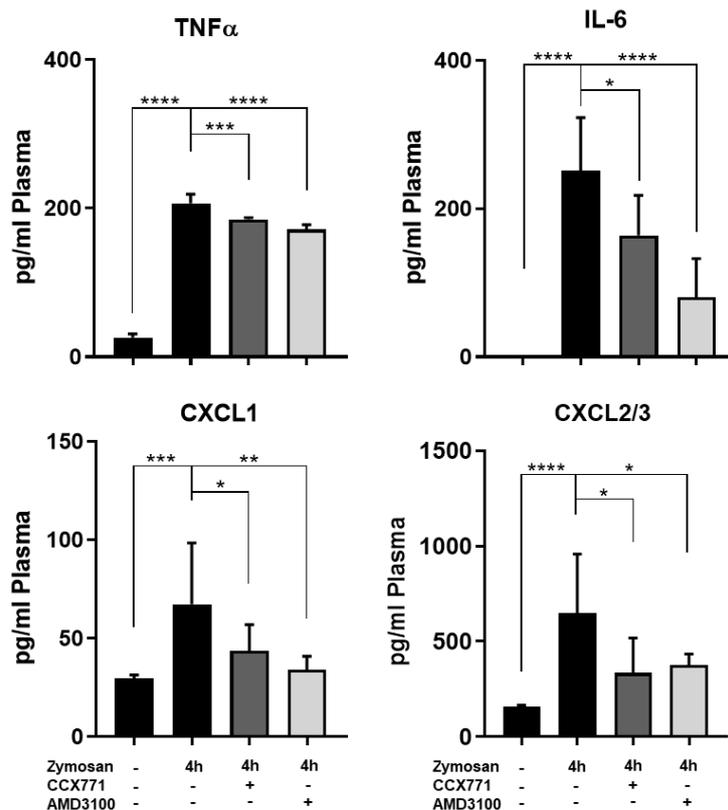


Abbildung 27: Proinflammatorische Mediatoren bzw. Chemokine im Plasma während Zymosan-induzierter Peritonitis und Sepsis bei den Wildtyp Tieren. In der Abbildung sind die Zytokine TNF α , IL-6, CXCL1 und CXCL2/3 beim Wildtyp dargestellt. Nach einer Steigerung im Rahmen der Inflammation kommt es zu einer Reduktion der Plasmakonzentrationen durch den SDF-1 Rezeptorantagonismus. Es werden die unstimulierten Kontrollen, die stimulierten Kontrollen vier Stunden nach Zymosanjektion und die prophylaktisch mit den SDF-1 Rezeptorantagonisten behandelten Gruppen vier Stunden nach Zymosanjektion verglichen. Angegeben sind Mittelwerte und die Standardabweichung (n=6-10), *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001 und ****p < 0,0001. (Ngamsri et al., 2020)

4.10. Einfluss der SDF-1 Rezeptorantagonisten auf die Zytokine im Plasma der A_{2B}-KO-Tiere bei Zymosan-induzierter Peritonitis und Sepsis und während polymikrobieller Peritonitis und Sepsis beim Wildtyp

Die Zytokinkonzentrationen von TNF α und CXCL2/3 wurden im Plasma während der Zymosan-induzierten Peritonitis und Sepsis auch in den A_{2B}-KO-Tieren untersucht. Vier Stunden nach der intraperitonealen Zymosaninjektion zeigte sich eine Erhöhung der Konzentrationen der proinflammatorischen Zytokine im Plasma (Mittelwerte \pm Standardabweichung, pg/ml). TNF α steigerte sich hier von $2,74 \pm 0,70 \cdot 10$ in den unbehandelten Tieren auf $9,68 \pm 8,39 \cdot 10$ in den nur mit Zymosan behandelten Mäusen (vier Stunden nach Injektion). Auch CXCL2/3 stieg im Rahmen der Inflammation von $2,03 \pm 5,73 \cdot 10$ auf $1,71 \pm 1,86 \cdot 10^3$ an. Der prophylaktische SDF-1 Rezeptorantagonismus führte in den A_{2B}-KO-Tieren zu keiner Reduktion beider Zytokine. Die TNF α -Plasmakonzentration lag nach CXCR7-Antagonisierung bei $7,27 \pm 2,39 \cdot 10$ und nach Antagonisierung von CXCR4 bei $8,68 \pm 2,89 \cdot 10$. CXCL2/3 wurde ebenfalls in den KO-Tieren nicht durch den Antagonismus beeinflusst und die Plasmakonzentrationen des Zytokins waren $1,48 \pm 0,92 \cdot 10^3$ bei CCX771-Gabe und $2,53 \pm 1,20 \cdot 10^3$ nach Behandlung mit AMD3100.

Im Modell der polymikrobiellen Peritonitis und Sepsis stiegen vier Stunden nach Injektion der polymikrobiellen Fäkalienlösung die Plasmakonzentrationen der Zytokine TNF α und CXCL2/3 an. Die Plasmalevel von TNF α lagen bei den nicht-stimulierten Wildtyptieren unterhalb der Nachweisgrenze ($0,00 \pm 0,00$) und erhöhten sich im Rahmen der fäkal-induzierten Inflammation auf $1,64 \pm 0,63 \cdot 10^2$. Ebenfalls verstärkte sich inflammationsbedingt die Konzentration von CXCL2/3 im Plasma von $2,17 \pm 0,31 \cdot 10^2$ auf $5,02 \pm 2,35 \cdot 10^3$. Durch den prophylaktischen CXCR4- und CXCR7-Antagonismus kam es zu einer Reduktion der Zytokine im Plasma. TNF α wurde durch die Gabe von CCX771 auf $1,00 \pm 0,24 \cdot 10^2$ und durch die Gabe von AMD3100 auf $9,65 \pm 3,14 \cdot 10$ reduziert. Der Antagonismus mit CCX771 führte zu einer Reduktion der Plasmakonzentration von CXCL2/3 auf $2,24 \pm 1,26 \cdot 10^3$ und die AMD3100-Behandlung zu einer Reduktion auf $1,95 \pm 1,45 \cdot 10^3$.

Die folgende Abbildung fasst die Zytokinkonzentrationen im Plasma der A_{2B}-KO-Tiere im Zymosan-induzierten Sepsismodell und die der Wildtypiere während polymikrobieller Peritonitis und Sepsis zusammen.

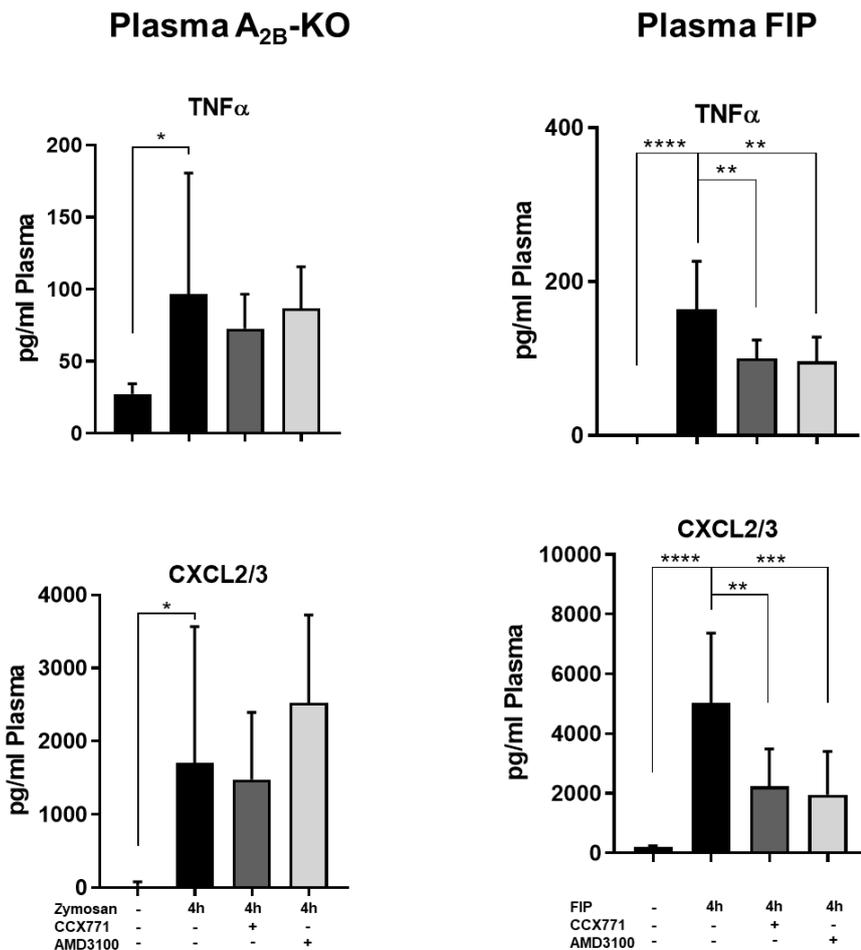


Abbildung 28: Zytokine im Plasma bei den A_{2B} Knockout Tieren während Zymosan-induzierter Peritonitis und Sepsis und während polymikrobieller Peritonitis und Sepsis beim Wildtyp (FIP). Es werden die Zytokine TNF α und CXCL2/3 im Blutplasma der unbehandelten und der stimulierten Tiere (je vier Stunden nach Zymosan- oder Fäkalieninjektion) und die zusätzlich prophylaktisch mit den CXCR4- oder CXCR7-Antagonisten behandelten Gruppen verglichen (ebenfalls vier Stunden nach Inflammationsbeginn). Der Antagonismus der SDF-1 Rezeptoren zeigt keine Auswirkungen in den Knockout Tieren, jedoch im Wildtyp im Rahmen der fäkalen Inflammation. Angegeben sind die Mittelwerte und die Standardabweichung (n=7-16), *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001 und ****p < 0,0001. (Ngamsri et al., 2021)

4.11. Therapeutischer SDF-1 Rezeptorantagonismus: Reduktion der PMN-Organmigration und der Zytokine im Plasma

Im Modell der Zymosan-induzierten Peritonitis und Sepsis wurde bei den Wildtyp-Tieren eine therapeutische Behandlung mit den CXCR7- und CXCR4-Antagonisten CCX771 und AMD3100 eine Stunde nach der Zymosaninjektion durchgeführt. Durch diese therapeutische Gabe konnte eine Reduktion der PMN-Migration in die Peritoneallavage und eine reduzierte Konzentration von TNF α und CXCL2/3 im Plasma erzielt werden (siehe Abbildung 29 und 30).

Im Blut erhöhte sich die PMN-Anzahl von $1,83 \pm 2,51 \cdot 10^5$ (Mittelwerte \pm Standardabweichung) bei der mit Zymosan stimulierten Kontrolle auf $5,08 \pm 3,07 \cdot 10^5$ in der Gruppe mit zusätzlich therapeutischer AMD3100-Behandlung. Ansonsten ergaben sich im Blut keine signifikanten Veränderungen. Die PMN-Zahl lag in der Kontrolle ohne Zymosan bei $4,07 \pm 3,61 \cdot 10^4$ und bei $1,35 \pm 0,94 \cdot 10^5$ nach therapeutischer CCX771-Gabe.

Vier Stunden nach der intraperitonealen Zymosaninjektion migrierten verstärkt PMNs in Peritoneallavage, Lunge und Leber. In der PL steigerte sich die PMN-Zahl durch die Inflammation von $1,31 \pm 2,76 \cdot 10^5$ bei den unstimulierten Tieren auf $4,08 \pm 1,71 \cdot 10^6$ vier Stunden nach Zymosaninjektion. In der Lunge ergab sich eine Steigerung der PMNs von $1,30 \pm 0,72 \cdot 10^5$ auf $7,05 \pm 3,81 \cdot 10^5$ und in der Leber von $1,18 \pm 0,55 \cdot 10^5$ auf $7,33 \pm 2,25 \cdot 10^5$. Nur in der PL konnte die PMN-Migration durch die therapeutische Gabe der Antagonisten CCX771 und AMD3100 reduziert werden. Die PMN-Zahlen lagen nach therapeutischem CXCR7-Antagonismus bei $1,84 \pm 0,35 \cdot 10^6$ und bei $2,49 \pm 0,96 \cdot 10^6$ nach therapeutischer CXCR4-Antagonisierung. In Lunge und Leber konnte keine signifikante Veränderung der Migration der PMNs durch die therapeutische SDF-1 Rezeptorblockade nachgewiesen werden. In den Lungen befanden sich nach therapeutischer CCX771-Gabe $5,75 \pm 3,19 \cdot 10^5$ PMNs und nach therapeutischer AMD3100-Behandlung $4,64 \pm 1,83 \cdot 10^5$ PMNs. In der Leber wurden nach therapeutischer CXCR7-Antagonisierung $5,95 \pm 4,05 \cdot 10^5$ und nach therapeutischer Behandlung mit AMD3100 $5,95 \pm 2,39 \cdot 10^5$ PMNs durchflusszytometrisch erfasst.

Die folgende Abbildung zeigt die therapeutischen Effekte der SDF-1 Rezeptorantagonisten bezogen auf die PMN-Migration in Blut, PL, Lunge und Leber.

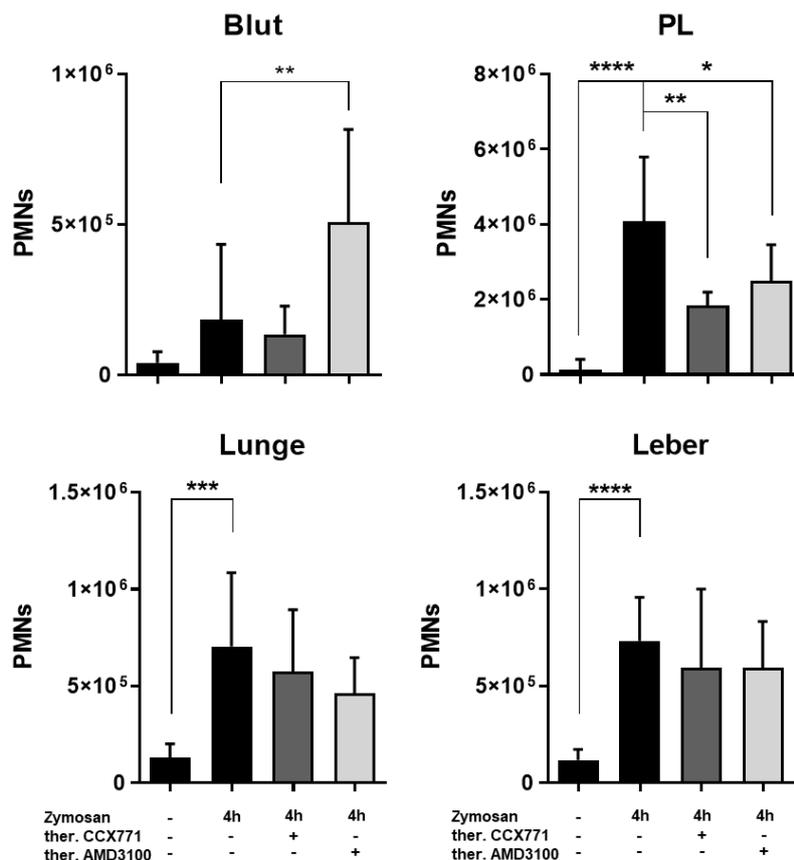


Abbildung 29: Durchflusszytometrisch erfasste PMN-Migration beim Wildtyp während Zymosan-induzierter Peritonitis und Sepsis und therapeutischem SDF-1 Rezeptorantagonismus. In den ersten beiden Säulen ist jeweils die PMN-Organmigration der unbehandelten und der alleinig mit Zymosan behandelten Kontrollen abgebildet. Die mit Zymosan stimulierte Kontrolle wird mit den zusätzlich therapeutisch mit den Antagonisten behandelten Gruppen verglichen (Zeitpunkt des Antagonismus: Eine Stunde nach Zymosanjektion, Zeitpunkt der Operation: Vier Stunden nach Zymosanjektion). Durch die therapeutische Antagonisierung zeigt sich eine signifikante Reduktion der neutrophilen Granulozyten in der Peritoneallavage. Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n=6-12$), * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ und **** $p < 0,0001$.

Die Konzentration der Zytokine TNF α und CXCL2/3 wurde mittels ELISA im Plasma der therapeutisch mit den Antagonisten behandelten Wildtypiere bestimmt und in der folgenden Abbildung dargestellt. Die Zytokine erhöhten sich durch die Inflammation und wurden nach der therapeutischen Behandlung mit CCX771 und AMD3100 reduziert im Plasma nachgewiesen (Angabe in pg/ml). Die Plasmakonzentration von TNF α stieg von $5,37 \pm 0,25 \cdot 10^2$ bei der unstimulierten Kontrolle auf $1,95 \pm 0,88 \cdot 10^2$ bei der stimulierten Kontrolle an. Die Konzentration von CXCL2/3 steigerte sich ebenfalls inflammationsbedingt von $1,93 \pm 0,06 \cdot 10^2$ auf $6,30 \pm 2,30 \cdot 10^2$. Durch die therapeutische Gabe von CCX771 reduzierte sich das TNF α -Plasmalevel auf $9,36 \pm 2,82 \cdot 10$ und die Konzentration von CXCL2/3 auf $3,63 \pm 1,59 \cdot 10^2$. Die therapeutische Behandlung mit AMD3100

fürte zu einer Reduktion des TNF α -Plasmaspiegels auf $9,86 \pm 3,65 \cdot 10$ und senkte den CXCL2/3-Spiegel auf $3,40 \pm 1,53 \cdot 10^2$.

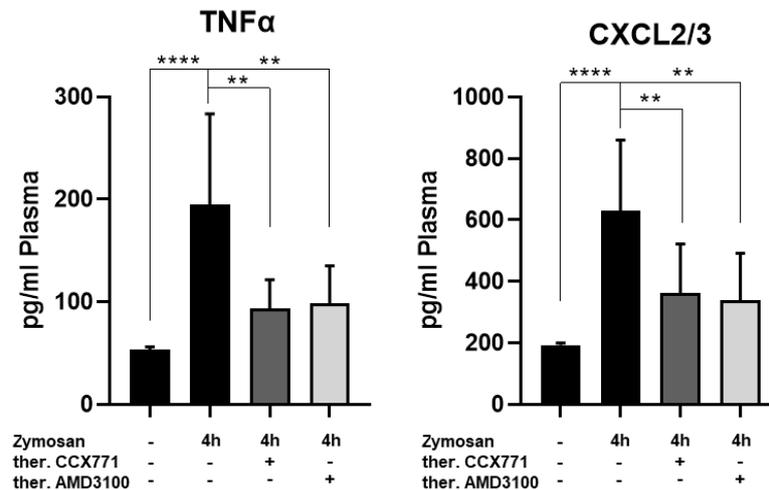


Abbildung 30: Zytokine im Plasma während Zymosan-induzierter Peritonitis und Sepsis und therapeutischem SDF-1 Rezeptorantagonismus beim Wildtyp. TNF α und CXCL2/3 sind hier in der unstimulierten Kontrolle, der mit Zymosan stimulierten Kontrolle und in der therapeutisch mit den CXCR4- und CXCR7-Antagonisten behandelten Gruppen dargestellt und wurden beide durch den therapeutischen Antagonismus reduziert im Plasma nachgewiesen (je vier Stunden nach Zymosanjektion). Der therapeutische Antagonismus erfolgte eine Stunde nach Zymosanjektion. Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardabweichung (n=7-16), *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001 und ****p < 0,0001.

5. Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Rolle der SDF-1 Rezeptoren CXCR4 und CXCR7 in der akuten Inflammation der Peritonitis-assoziierten Sepsis untersucht. Dazu wurde in zwei Modellen eines in vivo Migrationsversuches durch intraperitoneale Injektion von Zymosan oder Fäkalienlösung eine Peritonitis und Sepsis in Mäusen induziert. Die Tiere wurden prophylaktisch oder therapeutisch mit den SDF-1 Rezeptorantagonisten AMD3100 (CXCR4-Antagonist) oder CCX771 (CXCR7-Antagonist) behandelt. Die Transmigration neutrophiler Granulozyten und die Bildung von Plättchen-Neutrophilen-Komplexen (PNCs) wurde anschließend durchflusszytometrisch und durch immunhistochemische Anfärbung bestimmt. Die systemische Inflammationsreaktion wurde durch die Bestimmung der proinflammatorischen Zytokine und Chemokine im Plasma abgebildet. Ebenfalls wurde der Einfluss des A_{2B} Adenosinrezeptors während SDF-1 Rezeptorblockade bei Zymosan-bedingter Peritonitis und Sepsis untersucht.

SDF-1 ist als Chemokin an der Migration neutrophiler Granulozyten vom Knochenmark zum Entzündungsfokus beteiligt. Durch eine reduzierte SDF-1 Expression der Stromazellen des Knochenmarks und eine Internalisierung von CXCR4 seitens der PMNs werden diese aus dem Knochenmark freigesetzt (Furze und Rankin, 2008). Gleichzeitig ist SDF-1 mit seinen Rezeptoren an der Migration der neutrophilen Granulozyten in das entzündete Gewebe durch seine Rolle als Chemokin involviert (Summers et al., 2010, Konrad et al., 2017). Um die Relevanz von SDF-1 und seinen Rezeptoren während akuter Inflammation darzulegen, wurde deren Expression im Zymosan- und fäkal-induzierten Modell in den Organen unstimulierter und stimulierter Tiere verglichen. SDF-1, CXCR4 und CXCR7 wurden durch die Entzündungsreaktion verstärkt in den Organen exprimiert. Unsere Expressionsdaten decken sich mit Studien aus Inflammations- oder Hypoxie-Modellen, welche ebenfalls eine vermehrte SDF-1 Expression nachweisen konnten (Kollet et al., 2003, Tsou et al., 2018, Costello et al., 2012). In klinischen Studien wurde aufgrund der gesteigerten Expression der SDF-1/CXCR4 Achse sowohl das Chemokin als auch sein Rezeptor als möglicher Biomarker für eine Sepsis in Betracht gezogen (Franchini et al., 2015, Tunc et

al., 2015, Badr et al., 2018). Die Zymosan- bzw. Fäkalien-bedingte systemische Inflammation führte in unserer Arbeit zusätzlich zur erhöhten SDF-1 Expression im Peritoneum auch zu einer gesteigerten SDF-1 Expression im pulmonalen Gewebe der Wildtyp-Tiere. Vergleichbar konnten im Tierversuch bei direkter Lungenschädigung durch Lipopolysaccharid-Inhalation erhöhte SDF-1 Level in der Lunge nachgewiesen werden (Ngamsri et al., 2017, Konrad et al., 2017). Auch weitere Inflammationsprozesse gehen mit einer verstärkten Expression von SDF-1 bzw. seinen Rezeptoren einher und bestätigen unsere Ergebnisse (Konrad et al., 2017, Petty et al., 2007, Tsou et al., 2018). Hypoxie und Zellschäden scheinen ebenso die Expression der SDF-1 Rezeptoren CXCR4 und CXCR7 auf endothelialen (Vorläufer-) Zellen zu steigern (Costello et al., 2012, Mousavi, 2020). Im Rahmen der Inflammation kommt es häufig zur Gewebshypoxie, welche eine Stabilisierung der durch Hypoxie induzierbaren Faktoren (HIFs) induziert (Eltzschig et al., 2014). HIF sind eine Gruppe von intrazellulären Signalproteinen, die einen Sauerstoffmangel detektieren können. Diese Signalproteine bestehen aus einer sauerstoffabhängigen α - und einer sauerstoffunabhängigen β -Domäne. Beim Menschen sind drei verschiedene HIF-Unterformen bekannt: HIF-1 α , HIF-2 α und HIF-3 α . Während der Hypoxie stabilisieren sich diese α -Untereinheiten, binden β -Untereinheiten im Kern und bewirken durch eine Veränderung der Genexpression eine Anpassung an hypoxische Bedingungen (Eltzschig et al., 2014, Balamurugan, 2016). Die Optimierung des Sauerstoffangebotes und -verbrauches spielt hierbei eine zentrale Rolle (Semenza, 2014). Des Weiteren wird der (Glukose-) Stoffwechsel im inflammatorischen Gewebe (beispielsweise durch Beeinflussung des Glukosetransporters GLUT1) und die Migration, Aktivierung und Regulation von Immunzellen durch HIF beeinflusst (Balamurugan, 2016). In Bezug auf SDF-1 wurde HIF-1 in Tierversuchen mit einer gesteigerten SDF-1, CXCR4- und CXCR7-Expression in Verbindung gebracht (Liu et al., 2010, Ceradini et al., 2004, Loh et al., 2009). Übereinstimmend stieg in unseren Versuchen die Expression der SDF-1 Rezeptoren im Rahmen der Sepsis in den untersuchten Organen an. Auch beim Myokardinfarkt spielt SDF-1 durch die beschriebene Verbindung von Inflammation und Hypoxie eine Rolle und wird in der

ischämischen Region verstärkt exprimiert (Tsou et al., 2018). Ebenso zeigten Mäuse ohne endothelialen CXCR7-Rezeptor eine gestörte Angiogenese nach Myokardinfarkt (Hao et al., 2017). Das alles legt übereinstimmend mit unseren Ergebnissen eine Beteiligung von SDF-1 und seinen Rezeptoren an der Inflamationsreaktion und der Migration der Leukozyten nahe. Eine Ausnahme bildete in unseren Versuchen die Expression von SDF-1 in der Leber, welche in beiden Modellen im Rahmen der Inflammation nicht anstieg. Im Gegensatz hierzu konnten in einer durch Bestrahlung ausgelösten Leberzellschädigung erhöhte SDF-1 Werte in der murinen Leber in ELISAs festgestellt werden (Kollet et al., 2003). Eine reduzierte Inflamationsreaktion in der Leber könnte Ursache für diesen Unterschied sein. Jedoch konnten wir trotz der unveränderten SDF-1 Expressionslage in der Leber in der FACS-Analyse sowie histologisch sowohl nach fäkal- als auch nach Zymosan-induzierter Peritonitis eine signifikant gesteigerte PMN-Migration beobachten, welche durch die pharmakologische CXCR4- und CXCR7-Inhibition größtenteils aufgehoben werden konnte. Die von uns ebenfalls nachgewiesene und durch den SDF-1 Rezeptorantagonismus reduzierte systemische Inflammation könnte diesen scheinbaren Widerspruch erklären.

PMNs spielen eine Schlüsselrolle in der Pathophysiologie der Sepsis und vermitteln durch ihre Aktivierung Organschäden. Dabei spielt die Freisetzung zytotoxischer und proinflammatorischer Mediatoren wie reaktiver Sauerstoffspezies, verschiedener Enzyme und proinflammatorischer Zytokine eine wichtige Rolle (Phillipson und Kubes, 2011, Grommes und Soehnlein, 2011, Clark et al., 2007, Gotts und Matthay, 2016). Durch den prophylaktischen Antagonismus der SDF-1 Rezeptoren wurde sowohl im Zymosan- als auch im fäkal-induzierten Modell unserer Arbeit eine reduzierte PMN-Migration in die verschiedenen Organe detektiert. Unsere Daten decken sich mit eigenen Vorarbeiten aus der akuten pulmonalen Inflammation. Hierbei konnte zudem gezeigt werden, dass der SDF-1 Rezeptorantagonismus nicht nur die PMN-Migration, sondern auch die endotheliale Permeabilität verbessert (Konrad et al., 2017, Ngamsri et al., 2017). Auch Petty et al. konnten darlegen, dass die PMN-Migration in die Lunge mit SDF-1 und seinen Rezeptoren in Verbindung steht.

Ein SDF-1 Antagonismus führte in einem murinen Modell der pulmonalen Inflammation zu einer Reduktion der PMNs in der bronchoalveolären Lavage (BAL) 24 Stunden nach Inflammationsbeginn (Petty et al., 2007). Auch bei allergischem Asthma wurde ein Nutzen der Inhibierung der SDF-1 Rezeptoren nachgewiesen. Im Mausmodell konnte eine Inhibierung von CXCR4 und CXCR7 die Leukozytenmigration in die BAL und die inflammatorisch bedingte Hyperreagibilität der Atemwege reduzieren (Chang et al., 2018, Gonzalo et al., 2000). Im Tiermodell zu chronisch entzündlichen Darmerkrankungen konnte eine gesteigerte CXCR4-Expression auf Leukozyten bzw. eine erhöhte SDF-1 Präsentation auf dem Darmepithel nachgewiesen werden (Mikami et al., 2008). Durch einen CXCR4-Antagonismus konnte während experimenteller Kolitis die intestinale Inflammation und die histologisch betrachtete Leukozyteninfiltration reduziert werden (Mikami et al., 2008). In einem murinen Modell zur rheumatoiden Arthritis wurde ebenfalls eine verstärkte CXCR4-positive Zellmigration in die Synovialflüssigkeit beobachtet (Matthys et al., 2001). Ebenso konnte ein CXCR4-Antagonismus in einem Tiermodell zur rheumatoiden Arthritis die Erkrankungshäufigkeit einhergehend mit einer reduzierten Migration proinflammatorischer Zellen verringern (De Klerck et al., 2005). Auch bei systemischem Lupus erythematodes wurde der CXCR4-Antagonismus im Tiermodell unter anderem durch eine Limitation der Leukozytenmigration mit einer Reduktion der Organschäden und einer verminderten Krankheitsaktivität in Verbindung gebracht (Wang et al., 2009, Chong und Mohan, 2009). In Tiermodellen zum Myokardinfarkt oder Apoplex konnte durch einen CXCR4-Antagonismus sowohl der inflammationsbedingte Schaden durch eine reduzierte Leukozytenmigration und -aktivierung vermindert werden als auch eine verstärkte Freisetzung protektiver Vorläuferzellen aus dem Knochenmark erwirkt werden (Tsou et al., 2018, Hsu et al., 2015, Wu et al., 2017). Die genetische Depletion von CXCR4 führte im Mausmodell der Myokardischämie ebenfalls zu einer reduzierten PMN-Infiltration und bestätigt unsere Ergebnisse über die Effekte einer spezifischen CXCR4-Blockade auf die PMN-Migration (Liehn et al., 2011). Ausschließlich die in die Leber migrierten neutrophilen Granulozyten konnten durch den CXCR4-Antagonismus im prophylaktischen Zymosan-Modell

nicht signifikant reduziert werden, im Modell der fäkal-induzierten Peritonitis ergab sich allerdings eine Reduktion durch die AMD3100-Gabe. In einem LPS-Endotoxin-Modell konnten erhöhte PMN-Zahlen nach CXCR4-Antagonismus mit AMD3100 in Leber und Milz festgestellt werden. Die Autoren der Arbeit führen dies auf eine gestörte Rezirkulation der neutrophilen Granulozyten ins Knochenmark zurück (Seemann und Lupp, 2016). Neben der prophylaktischen resultierte auch die therapeutische Behandlung mit AMD3100 und CCX771 in unserer Arbeit in einer eingeschränkten PMN-Migration in die Peritoneallavage und einer Reduktion der proinflammatorischen Zytokine im Blutplasma. Es finden sich somit in Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen vielfach Hinweise auf eine Begrenzung der Inflammationsreaktion durch die SDF-1 Rezeptorblockade vermittelt durch eine Limitation der Leukozytenmigration und -aktivierung am Entzündungsfokus.

Dennoch existieren ebenfalls widersprüchliche Daten zum SDF-1 Rezeptorantagonismus während Inflammation oder Ischämie. Im Gegensatz zu unseren Daten zeigte Delano et al., dass die direkte SDF-1 Inhibition in der polymikrobiellen Sepsis negative Effekte haben kann (Delano et al., 2011). Hierbei führte die SDF-1 Blockade zur gesteigerten Bakterienlast und damit einhergehend zur erhöhten Letalität. Im Gegensatz zu unserer Studie könnte die direkte SDF-1 Inhibition zur Beeinträchtigung der PMN-Freisetzung im Knochenmark führen und somit die widersprüchlichen Ergebnisse erklären. In Ischämie- und Reperusionsmodellen des Myokards und des Gehirns konnten der SDF-1/CXCR4 Achse protektive Effekte zugesprochen werden (Tsou et al., 2018, Hsu et al., 2015, Wu et al., 2017). Hierbei wurde gezeigt, dass eine längerfristige CXCR4-Inhibition die Migration von Vorläuferzellen zum Infarktort und die Revaskularisierung reduziert (Mao et al., 2014, Dai et al., 2010, Petit et al., 2007, Tsou et al., 2018). Ähnliches wurde für die Rolle von CXCR7 während Hypoxie beschrieben: Bei Mäusen ohne endotheliale CXCR7-Expression wurde eine gestörte Angiogenese und Endothelzellproliferation nach Myokardinfarkt beobachtet (Hao et al., 2017). Diese Unterschiede lassen sich einerseits auf Unterschiede in der Beeinflussung der SDF-1 Achse und abweichende verwendete Modelle zurückführen. Andererseits zeigen sie zeigen die vielfältige

Wirkung der SDF-1 Rezeptorantagonisten auf unterschiedliche Zellen während Inflammation und Ischämie auf.

Gesteigerte IL-1, IL-6 oder TNF α Konzentrationen werden häufig im Rahmen der dysregulierten Immunantwort während einer Sepsis beobachtet (Gotts und Matthay, 2016). In unserer Arbeit führte die pharmakologische Blockade von CXCR4 und CXCR7 zu einer signifikant reduzierten Freisetzung von TNF α und IL-6. Die Chemokine CXCL1 und CXCL2/3 spielen eine wichtige Rolle in der Migration der PMNs zum Inflammationsort (Phillipson und Kubes, 2011, Cheng et al., 2019). In der vorliegenden Arbeit reduzierte die Gabe der SDF-1 Rezeptorantagonisten ebenfalls die Konzentrationen von CXCL1 und CXCL2/3 im Plasma der Wildtypiere. Übereinstimmend mit unseren Ergebnissen führte die CXCR4- und CXCR7-Blockade in einem murinen Modell zur akuten pulmonalen Inflammation zu einer reduzierten Freisetzung von TNF α , IL-6, CXCL1 und CXCL2/3 in der BAL (Ngamsri et al., 2017, Konrad et al., 2017). Yaxin et al. konnten in einem Modell der akuten Lungenschädigung an Mäusen auch während der fortgeschrittenen Phase der Inflammation nach 24 und 72 Stunden eine Reduktion von IL-1 β und TNF α in der BAL durch die prophylaktische Gabe von AMD3100 nachweisen (Yaxin et al., 2014). Der Einfluss der SDF-1 Rezeptorantagonisten auf die systemische Inflammation bzw. die proinflammatorischen Mediatoren konnte in weiteren entzündlichen Erkrankungen nachgewiesen werden. In einem Mäusemodell zur rheumatoiden Arthritis konnte die IL-6 Serumkonzentration durch einen CXCR4-Antagonismus reduziert werden (De Klerck et al., 2005). Auch in einem murinen Modell der experimentellen Kolitis führte der Antagonismus von CXCR4 zu einer reduzierten TNF α Produktion in mesenterialen Lymphknotenzellen (Mikami et al., 2008). Im Gegensatz zu diesen Daten konnte ein CXCR4-Antagonismus in einem Modell der polymikrobiellen Sepsis bei Mäusen die inflammatorischen Zytokine im Serum 24 Stunden nach Inflammationsbeginn nicht signifikant reduzieren (Ramonell et al., 2017). Der prophylaktische SDF-1 Rezeptorantagonismus von CXCR4 und CXCR7 konnte in dem polymikrobiell- bzw. fäkal-induzierten Modell unserer Studie sowohl TNF α als auch CXCL2/3 signifikant reduzieren. Durch die Bestimmung der Zytokine nach 24 Stunden, die fehlende Bestimmung der

Chemokine CXCL1 und CXCL2/3 und im Allgemeinen die Konzentration auf die späte Immunreaktion weicht die Arbeit von Ramonell et al. in wichtigen Punkten von der unsrigen ab, wodurch die Unterschiede erklärt werden können.

Thrombozyten sind in der Lage Pathogene zu erkennen und können neutrophile Granulozyten aktivieren (Phillipson und Kubes, 2011). Die Bildung von PNCs führt zu einer verstärkten Aktivierung der PMNs (Clark et al., 2007) und begünstigt deren Migration zum Inflammationsort (Sreeramkumar et al., 2014). Selektine spielen eine wichtige Rolle in der Interaktion verschiedener Zellen und insbesondere auch im Zusammenspiel von PMNs mit Thrombozyten (McEver, 2015). Das Zusammenspiel von P-Selektin (auf Thrombozyten) und PSGL-1 (auf PMNs) ist notwendig für die Bildung von PNCs und fördert die Aktivierung der PMNs und deren weitere Migration zum Ort der Inflammation (McEver, 2015, Kornerup et al., 2010, Yang et al., 1999). In unserer Arbeit führte die CXCR4- und CXCR7-Blockade in beiden Peritonitis-bedingten Sepsis-Modellen zu einer reduzierten Bildung von Plättchen-Neutrophilen-Komplexen im Blut und in den untersuchten Organen. Übereinstimmend konnte in einer Vorarbeit gezeigt werden, dass CXCR4 in der Thrombozyten-vermittelten leukozytären Migration involviert ist (Witte et al., 2021). Zusätzlich konnte in einer Arbeit zur Sichelzellanämie die CXCR4-Expression auf PMNs durch lösliche, von Thrombozyten stammende Mediatoren gesteigert werden (Garcia et al., 2020). In der erwähnten Arbeit präsentierten zudem neutrophile Granulozyten von Patienten mit Sichelzellanämie vermehrt CXCR4 auf ihrer Oberfläche und bildeten in vitro verstärkt Plättchen-Neutrophilen-Aggregate im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden. Chatterjee et al. konnten in einem murinen Peritonitismodell vermehrte Plättchen-Makrophagen Komplexe im Rahmen der Inflammation nachweisen. In vitro beeinflusste in der erwähnten Arbeit von Plättchen stammendes SDF-1 in Verbindung mit CXCR4 die Chemotaxis bei Monozyten und in Verbindung mit CXCR7 deren Adhäsion an Plättchen (Chatterjee et al., 2015). Diese Ergebnisse bestätigen unsere Daten über die Effekte der SDF-1 Rezeptoren bezüglich der Interaktion von Leukozyten und Thrombozyten. Bezogen auf thrombozytäres SDF-1 gibt es neben der Rekrutierung von pro-inflammatorischen Zellen ebenfalls Hinweise auf

schützende Effekte im Rahmen von Hypoxie. In einem murinen Ischämie-Reperusionsmodell konnte von Thrombozyten stammendes SDF-1 schützende Progenitorzellen mobilisieren (Stellos et al., 2008). Auch die erwähnten, an der Komplexbildung beteiligten Selektine wurden in unserer Studie durch die Gabe von AMD3100 oder CCX771 weitestgehend reduziert auf den PNCs nachgewiesen. In weiteren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass eine Blockade des P-Selektins oder des PSGL-1 zu einer verminderten Aktivierung neutrophiler Granulozyten und zu einer reduzierten PNC-Bildung führt (Etulain et al., 2015, Pircher et al., 2019, Evangelista et al., 1999). Weiter konnte eine Selektin-Inhibition in einem murinen Modell der akuten Lungenschädigung die proinflammatorischen Zytokine bzw. Chemokine TNF α , IL-1 α , IL-6 und CXL2/3 in der BAL reduzieren (Shao und Qin, 2015). Somit unterstützen die erwähnten Arbeiten die protektiven Effekte der SDF-1 Rezeptorantagonisten im Zusammenhang mit einer Reduktion der von uns auf den PNCs nachgewiesenen Selektine. Thrombozyten können sowohl die neutrophilen Granulozyten aktivieren als auch von diesen (bspw. durch freigesetzte DNA-Netze) aktiviert werden und im Anschluss Einfluss auf die Inflammationsreaktion und Hämostase nehmen (Mandel et al., 2022). Es ergaben sich in murinen Sepsismodellen keine einheitlichen Ergebnisse bezüglich der protektiven Eigenschaften einer direkten Inhibition der thrombozytären Aktivierung (Cox, 2023, Seidel et al., 2009, Rabouel et al., 2021). Zudem ist eine direkte Inhibition der Plättchenfunktion mit einem erhöhten Blutungsrisiko vergesellschaftet (Khan et al., 2017). In diesem Kontext könnte eine indirekte Thrombozyteninhibition (wie durch den SDF-1 Rezeptorantagonismus unserer Arbeit) ein Ansatz sein, über eine Reduktion der Interaktion zwischen PMNs und Thrombozyten die verstärkte Neutrophilenaktivierung zu hemmen (Etulain et al., 2015, Sreeramkumar et al., 2014, Clark et al., 2007, Mutua und Gershwin, 2021) und die inflammatorische Reaktion zu modulieren, ohne das Blutungsrisiko derart stark zu beeinflussen.

Der A_{2B} Adenosinrezeptor scheint protektive Effekte im Rahmen verschiedenster Inflammationsprozesse, wie auch der Sepsis, zu vermitteln (Ham und Rees, 2008, Csóka et al., 2010). Vorarbeiten haben eine mögliche Verbindung zwischen dem A_{2B} Adenosinrezeptor und den beiden SDF-1 Rezeptoren CXCR4

und CXCR7 beschrieben (Yang et al., 2008, Richard et al., 2006, Konrad et al., 2017). Um den Einfluss des A_{2B} Adenosinrezeptors auf die pharmakologische Blockade der SDF-1 Rezeptoren zu untersuchen, wurde das Modell der Zymosan-induzierten Sepsis gemeinsam mit dem prophylaktischen SDF-1 Rezeptorantagonismus an A_{2B} Knockout Mäusen durchgeführt. Hierbei hob die genetische Depletion des A_{2B} Adenosinrezeptors die protektiven Effekte der CXCR4- und CXCR7-Antagonisten auf. Yang et al. konnten einen protektiven Effekt des A_{2B} Adenosinrezeptors in Verbindung mit CXCR4 nach induzierter Gefäßschädigung darlegen (Yang et al., 2008). Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen verstärkte der A_{2B} Knockout in unserer Arbeit die Inflamationsreaktion und hob zusätzlich bei gleichzeitiger CXCR4- und CXCR7-Antagonistengabe deren Effekte auf. Die PNC-Bildung, die PMN-Migration und die Zytokinfreisetzung konnten durch die spezifische Blockade der SDF-1 Rezeptoren nicht mehr positiv beeinflusst werden. Diese Ergebnisse sind konsistent mit denen von Konrad et al. zum A_{2B} Adenosinrezeptor und dem SDF-1 Rezeptorantagonismus im Rahmen der akuten pulmonalen Inflammation (Konrad et al., 2017): Die genetische Depletion des A_{2B} Adenosinrezeptors hob die protektiven Effekte der SDF-1 Rezeptorantagonisten in Bezug auf die PMN-Migration und die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine auf. Ob hämatopoetische oder nicht-hämatopoetische Zellen für den ausbleibenden protektiven Effekt des SDF-1 Rezeptorantagonismus in den A_{2B} Knockout Mäusen verantwortlich sind ist umstritten. Einerseits wurden die protektiven Effekte des A_{2B} Adenosinrezeptors nach induzierter Gefäßschädigung und während Lipopolysaccharid-induzierter akuter Lungenentzündung bei Mäusen über hämatopoetische Zellen vermittelt (Yang et al., 2008, Konrad et al., 2017). Andererseits konnten nicht-hämatopoetische Zellen in einem murinen Modell zur polymikrobiellen Sepsis für die schützenden Effekte des A_{2B} Adenosinrezeptors verantwortlich gemacht werden (Csóka et al., 2010). Die Unterschiede polymikrobieller und Endotoxin-assoziiierter Inflammation könnten diese Differenz erklären. Dass der protektive Effekt der SDF-1 Rezeptorantagonisten auch über den A_{2B} Adenosinrezeptor vermittelt wird, konnte in unserer Arbeit durch eine gesteigerte Expression des A_{2B} Adenosinrezeptors nach AMD3100-

oder CCX771-Gabe weiter unterstützt werden. Gleiches zeigte sich bei Konrad et al. während der akuten pulmonalen Inflammation (Konrad et al., 2017). Inflammationsbedingt wurde der A_{2B} Adenosinrezeptor in unserer Arbeit reduziert exprimiert, wohingegen dessen Expression in anderen Arbeiten durch Inflammation verstärkt wurde (Konrad et al., 2017, Ledderose et al., 2016, Bours et al., 2006). ATP und Adenosin wirken in der frühen Phase einer Entzündung durch steigende extrazelluläre Konzentrationen nach Zellschäden vorwiegend proinflammatorisch. Insbesondere Adenosin kann jedoch vor allem in späteren Entzündungsphasen auch immunregulatorisch wirken (Bours et al., 2006). Beispielsweise fördert Adenosin über die Adenosinrezeptoren A₁ und A₃ die Aktivierung neutrophiler Granulozyten und inhibiert deren proinflammatorische Reaktion über A_{2A} und A_{2B} (Barletta et al., 2012). Somit kann Adenosin durch die Aktivierung seiner verschiedenen Rezeptoren und deren Signalkaskaden sowohl pro- als auch antiinflammatorische Effekte vermitteln. Die Expression der Adenosinrezeptoren unterliegt zur Modulation des Immunsystems Schwankungen, welche besonders im fehlregulierten Immunsystem während Sepsis die unterschiedliche Expression erklären können (Bours et al., 2006). Zusätzlich könnten unterschiedliche Messzeitpunkte nach Inflammationsbeginn gemeinsam mit dem abweichenden Inflammationsmodell die unterschiedliche A_{2B} Expression von Konrad et al. erklären.

5.1. Limitationen der Studie und Ausblick zum klinischen Einsatz von CXCR4- und CXCR7-Antagonisten

Die Inflammation wurde in der vorliegenden Arbeit durch die Induktion einer Peritonitis ausgelöst. Weitere Ätiologien sollten zur Untersuchung des SDF-1 Rezeptorantagonismus während akuter Inflammation mit einbezogen werden. Weiterhin wirken immunsuppressive Therapien in den Endotoxin-Modellen der Sepsis (ähnlich dem in dieser Arbeit verwendeten Zymosanmodell) meist protektiv (Fink, 2014), da kein aktiv-schädigendes Pathogen vorhanden ist. Daher führten wir ebenfalls ein polymikrobielles Sepsismodell durch, in dem der protektive Effekt des SDF-1 Rezeptorantagonismus bestätigt werden konnte. Ein Großteil der Sepsispatienten der USA ist älter als 65 Jahre und hohes Alter geht mit erhöhter Sepsis-assoziiierter Mortalität einher (Martin et al., 2006). Für die

Versuche wurden ausschließlich junge, männliche und genetisch annähernd identische Tiere verwendet. Da Alter, Komorbiditäten, Geschlecht und Genetik die Empfänglichkeit gegenüber Infektionen und Sepsis beeinflussen, sollten sie ebenfalls berücksichtigt werden (Gotts und Matthay, 2016, Osuchowski et al., 2014, Fink, 2014). Hierbei spielt beispielsweise die Immunoseneszenz eine wichtige Rolle, welche mit dem Alter einhergehende, funktionelle Einschränkungen sowohl der zellulären als auch der humoralen Abwehr beschreibt (Martín et al., 2017). Genetische Variationen, beispielsweise der Toll-like Rezeptoren, könnten ebenfalls den Verlauf einer Sepsis beeinflussen, bedürfen allerdings weiterer Erforschung (Cecconi et al., 2018, Thompson et al., 2014). Septische Patienten werden des Weiteren mit Antibiotika und anderen supportiven Maßnahmen (wie Flüssigkeitssubstitutionen oder Katecholaminen) behandelt. Da die therapeutische Gabe der SDF-1 Rezeptorantagonisten in unseren Tierversuchen ebenfalls protektive Wirkungen besaß, könnte sie im Modell der fäkal-induzierten Peritonitis und Sepsis mit diesen supportiven Maßnahmen, soweit diese an Mäusen durchgeführt werden können, kombiniert werden.

Weiterhin muss die Übertragungsfähigkeit von Ergebnissen aus dem Tierversuch auf den Menschen bedacht werden. Die septische Inflammationsreaktion unterscheidet sich bei Mäusen von der beim Menschen (Seok et al., 2013), da Mäuse weniger anfällig für systemische Infektionen sind und deutlich höhere Endotoxin-Konzentrationen notwendig sind, um ein septisches Krankheitsbild auszulösen (Fink, 2014). Zudem ist das Organversagen während Sepsis in Mäusen später und weniger stark ausgeprägt (Phillipson und Kubes, 2011). Daher besitzt die weitere Verbesserung und Anpassung der Tiermodelle an die humane Sepsis, bezogen auf Induktion der Krankheit, die Auswahl der Tiere und die weitere supportive Behandlung eine entscheidende Bedeutung für die Möglichkeit die Pathophysiologie der Sepsis besser abzubilden (Efron et al., 2015). Im Hinblick auf eine mögliche klinische Anwendbarkeit der CXCR4- und CXCR7-Antagonisten ergibt sich kein einheitliches Bild. Hierbei muss wie oben beschrieben die Heterogenität der septischen Patienten bedacht werden. In der vorliegenden Arbeit wird die proinflammatorische Reaktion durch die

neutrophilen Granulozyten zwar reduziert, andere pathophysiologische Aspekte der Sepsis wie die bei vielen Patienten vorliegende Immunsuppression (Hotchkiss et al., 2013a) wurden jedoch nicht genauer untersucht. Die Immunsuppression während einer Sepsis geht mit einer Reduktion der Lymphozyten und dendritischen Zellen durch Apoptose und Funktionsstörungen dieser und anderer Immunzellen einher (Venet und Monneret, 2018, Hotchkiss et al., 2013b). Ob ein Patient von einer Immunstimulation oder einer Blockade der Immunantwort (wie der Reduktion der PMN-Migration in unserer Arbeit) profitiert wird in erster Linie von dessen aktueller Immunlage beeinflusst (Hotchkiss et al., 2013a). Daher könnte die Erfassung unterschiedlicher Patientengruppen basierend auf deren Immunfunktion hilfreich sein, um eine Therapieentscheidung zu treffen (Venet und Monneret, 2018). Beispielsweise ist der A_{2A} Adenosinrezeptor auf PMNs nach muriner LPS-Stimulation oder bei septischen Patienten in seiner antiinflammatorischen Funktion eingeschränkt, da trotz verstärkter Expression seine Adenosin-Bindungsfähigkeit reduziert ist (Kreth et al., 2009). Bezogen auf eine mögliche therapeutische Anwendung der SDF-1 Rezeptorantagonisten und deren Verknüpfung mit dem A_{2B} Signalweg könnte eine Prüfung der Adenosinrezeptorenexpression und -funktionalität vor der Verabreichung von SDF-1 Rezeptorantagonisten von klinischer Relevanz sein.

6. Zusammenfassung

Für die Dysregulation des Immunsystems während einer Sepsis gibt es bisher keine kausale Therapie. In der Sepsis spielen neutrophile Granulozyten (PMNs) eine pathophysiologische Schlüsselrolle. Das Chemokin Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) beeinflusst die PMN-Migration in die Organe und ist mit dem Adenosinrezeptor A_{2B} verbunden. Der Adenosinrezeptor A_{2B} besitzt wichtige antiinflammatorische Eigenschaften und moduliert verschiedene Inflammationsprozesse.

Diese Arbeit befasst sich mit der Rolle der SDF-1 Rezeptoren CXCR4 und CXCR7 und deren Verbindung zum A_{2B} Adenosinrezeptor im Hinblick auf die PMN-Organmigration, die Bildung von Plättchen-Neutrophilen-Komplexen (PNCs) und die Freisetzung inflammatorischer Mediatoren in der Peritonitis-assoziierten Sepsis. In einem murinen in vivo Transmigrationsversuch wurde eine prophylaktische Behandlung mit CXCR4- (AMD3100) und CXCR7-Antagonisten (CCX771) durchgeführt und anschließend eine Sepsis durch intraperitoneale Injektion von Zymosan oder Fäkalienlösung induziert. Anschließend wurde die PMN-Organmigration, die PNC-Bildung im Blut und den Organen sowie die Konzentrationen inflammatorischer Zytokine im Plasma bestimmt. Um den Einfluss des A_{2B} Adenosinrezeptors abzubilden, wurde das prophylaktische Zymosanmodell zudem an A_{2B} Knockout Mäusen durchgeführt. Ebenfalls wurden die Effekte einer therapeutischen Behandlung im Zymosanmodell untersucht.

Inflammationsbedingt konnte eine gesteigerte SDF-1, CXCR4- und CXCR7-Expression in Peritoneum, Lunge und Leber (mit Ausnahme von SDF-1 in der Leber) beobachtet werden. Die prophylaktische CXCR4- und CXCR7-Blockade reduzierte in beiden Sepsismodellen die PMN-Migration in die peritoneale Lavage (PL), die Lunge und die Leber. Des Weiteren wurde eine reduzierte PNC-Bildung sowie verringerte Freisetzung von TNF α , IL-6, CXCL1 und CXCL2/3 detektiert. Die genetische Depletion des Adenosinrezeptors A_{2B} hob die Effekte der beiden Antagonisten auf. Der therapeutische CXCR4- und CXCR7-

Antagonismus führte ebenfalls zur reduzierten PMN-Migration in die PL sowie einer eingeschränkten Freisetzung von TNF α und CXCL2/3.

Die Ergebnisse unserer Arbeit deuten auf die protektiven Effekte einer spezifischen CXCR4- und CXCR7-Inhibition während einer Zymosan- und polymikrobiell-bedingten Peritonitis hin. Hierbei könnte die pharmakologische Blockade der SDF-1 Rezeptoren einen therapeutischen Ansatz in der Sepsis bedeuten, welcher aber im heterogenen Bild der Sepsis durch klinische Studien untermauert werden muss.

7. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Sequential (Sepsis-related) Organ Failure Assessment Score (SOFA-Score).** Ein Anstieg von mindestens zwei Punkten im SOFA-Score spricht für eine septische Organdysfunktion. MAP: Mean Arterial Pressure / mittlerer arterieller Druck. Das Verhältnis des arteriellen Sauerstoffpartialdrucks (P_{aO_2}) zur inspiratorischen Sauerstoffkonzentration (F_iO_2) wird als Horowitz-Quotient bezeichnet. (Vincent et al., 1996)..... 8
- Abbildung 2: Organdysfunktionen bei Sepsis: Zahlreiche Organe und Organsysteme sind während Sepsis in ihrer Funktion gestört.** Eine Infektion führt zu einer Erhöhung der proinflammatorischen Mediatoren im Blut. Diese beeinflussen die Funktionen des Endothels und verschiedener Zellorganellen und führen zu einer Reduktion der Organfunktionen und einer Dysregulation des Kreislaufs. Durch die entstandenen Schäden (DAMPs) und weitere Mechanismen (wie bspw. die gestörte Barrierefunktion des Darmepithels) wird die Inflamationsreaktion weiter angetrieben und verstärkt sich selbst. Die im SOFA-Score (siehe oben) erscheinenden Organsysteme bzw. Parameter wurden fett bzw. kursiv hervorgehoben. PAMP: Pathogen-Associated Molecular Pattern, DAMP: Damage-Associated Molecular Pattern, ROS: Reaktive Sauerstoffspezies, NO: Stickstoffmonoxid, ARDS: Acute Respiratory Distress Syndrom. Der Blitz symbolisiert Dysregulation. Eigene Darstellung nach den angegebenen Quellen (Gotts und Matthay, 2016, Abraham und Singer, 2007, Cecconi et al., 2018, Singer, 2014)..... 18
- Abbildung 3: Plättchen-Neutrophilen-Komplexe (PNCs) und die daran beteiligten Selektine.** Thrombozyten binden und aktivieren neutrophile Granulozyten. Hierdurch werden proinflammatorische Granula aus den PMNs freigesetzt und die endotheliale Permeabilität erhöht. Darüber hinaus induzieren aktivierte Thrombozyten die NETosis (Freisetzung extrazellulärer DNA-Netze) aus PMNs und die Migration der PMNs ins Gewebe. An den dargestellten Vorgängen sind weitere Rezeptoren beteiligt, die aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt werden. Es ist eine eigene Darstellung in Bezug auf die angegebenen Quellen. In der Legende sind die beteiligten Zellen, die Rezeptoren, die NETs und die Neutrophilen-Granula dargestellt (Semple et al., 2011, Vardon-Bounes et al., 2019, McEver, 2015, Sreeramkumar et al., 2014, Etulain et al., 2015)..... 22

Abbildung 4: SDF-1, CXCR4 und CXCR7 und ihre Rolle in der Neutrophilen-Migration. Nach eigener Darstellung abgebildet sind SDF-1 (gelb) und seine Rezeptoren CXCR4 (rot) und CXCR7 (grün) unter physiologischen Bedingungen im Knochenmark (A) und während Inflammation (B) . (A) SDF-1 (aus den Knochenmarks-Stromazellen) hält gemeinsam mit CXCR4 (auf den PMNs) in Abwesenheit einer Inflammation als Retentionsfaktor die PMNs im Knochenmark und hindert sie an der Migration ins Blut. (B) Durch die inflammatorische Reduktion der SDF-1 Expression der Stromazellen im Knochenmark werden die neutrophilen Granulozyten ins Blut freigesetzt. Während Sepsis ist durch die generalisierte Inflammation die SDF-1 Expression der Organe erhöht, die PMNs migrieren aus dem Blut in das Gewebe und vermitteln dort Organschäden (Summers et al., 2010, Liu et al., 2015, Xu et al., 2007, Phillipson und Kubes, 2011, Grommes und Soehnlein, 2011, Clark et al., 2007).....	24
Abbildung 5: Strukturformel Zymosan A	36
Abbildung 6: Prophylaktische und therapeutische Behandlung mit den Antagonisten AMD3100 und CCX771 in der Zymosan- und fäkal-induzierten Peritonitis und Sepsis.	37
Abbildung 7: Auswertung mit FlowJo, Forward und Side Scatter. Die Gates fassen die Leukozytenpopulationen im Forward und Side Scatter. In (A) ist die peritoneale Lavage, in (B) die Lunge und in (C) die Leber abgebildet.	41
Abbildung 8: Auswertung der Leukozytengates am Beispiel der peritonealen Lavage. Links sind die Gates der CD45 ⁻ - und CD45 ⁺ -Populationen abgebildet, in der rechten Abbildung die Ly6G ⁺ -Population der PMNs innerhalb der CD45 ⁺ -Zellen.....	42
Abbildung 9: Auswertung der PNC-Quantifizierung in den Blutproben. Links ist die Auswahl der PMNs innerhalb CD45 ⁺ -Population abgebildet. Diese wurde anschließend in die CD42b ⁺ -Zellen unterteilt, um die PNCs zu quantifizieren (im rechten Teil der Abbildung dargestellt).....	42
Abbildung 10: Verstärkte Genexpression von SDF-1, CXCR4 und CXCR7 während der Zymosan-induzierten Peritonitis und Sepsis in Peritoneum, Lunge und Leber beim Wildtyp. Diese Abbildung vergleicht die Kontrollgruppe ohne intraperitoneale Injektion von Zymosan mit der stimulierten Gruppe vier Stunden nach Zymosanjektion. Angegeben sind die Mittelwerte der normalisierten Expression mit den Standardabweichungen (n=8-14), *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001 und ****p < 0,0001. (Ngamsri et al., 2020)	52

- Abbildung 11: Gesteigerte Genexpression von SDF-1 und dessen Rezeptoren während der fäkal-induzierten Peritonitis (FIP) und Sepsis in den Organen der Wildtyp-Mäuse.** Es wird die Kontrollgruppe ohne Fäkalieninjektion mit den Tieren vier Stunden nach Injektion der polymikrobiellen Fäkalienlösung verglichen. Angegeben werden die Mittelwerte der normalisierten Expression mit den Standardabweichungen (n=6-12), *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001 und ****p < 0,0001. (Ngamsri et al., 2020)..... 54
- Abbildung 12: Durchflusszytometrisch erfasste PMN-Migration beim Wildtyp in Blut, Peritoneallavage (PL), Lunge und Leber.** Die Organmigration der neutrophilen Granulozyten der Tiere ohne Zymosaninjektion wird hier mit der PMN-Migration der mittels Zymosan stimulierten Kontrolltiere (vier Stunden nach i.p. Injektion) und der PMN-Migration der prophylaktisch mit den Antagonisten behandelten Gruppen (ebenfalls vier Stunden nach Zymosangabe) verglichen. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte ± der Standardabweichung (n=4-8), *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001 und ****p < 0,0001. (Ngamsri et al., 2020) 57
- Abbildung 13: Immunhistochemische Anfärbung der PMNs (braun) beim Wildtyp in Peritoneum (A), Lunge (B) und Leber (C).** Dargestellt ist die unstimulierte Kontrolle ohne Zymosan, die stimulierte Kontrolle vier Stunden nach Zymosangabe und die prophylaktisch mit den Antagonisten behandelten Gruppen vier Stunden nach Zymosangabe. Die PMNs wurden mit Pfeilen markiert. Zur Anschaulichkeit wurden die histologischen Abbildungen der PMNs hier vergrößert dargestellt. 100x Vergrößerung, n=3 (Ngamsri et al., 2020)..... 59
- Abbildung 14: Auszählung der PMNs in Peritoneum, Lunge und Leber in der Zymosan-induzierten Peritonitis und Sepsis beim Wildtyp.** Die PMNs wurden in repräsentativen Ausschnitten ausgezählt. Verglichen wird eine unstimulierte mit einer stimulierten Kontrolle und die Änderung der PMN-Zahlen nach Antagonistengabe im Vergleich zu den stimulierten Kontrolltieren. Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung (n=3), *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001 und ****p < 0,0001..... 60

Abbildung 15: Ergebnisse der Durchflusszytometrie in Bezug auf die PMN-Migration (A) im Blut, der PL, der Lunge und der Leber. Immunhistochemische Anfärbung (C-D) der PMNs der A_{2B}-KO-Tiere während Zymosan-induzierter Peritonitis und Sepsis. (A) Durchflusszytometrie: Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung (n=4-14), *p < 0,05; **p < 0,01; *p < 0,001 und ****p < 0,0001. Immunhistochemische Anfärbung der PMNs in Peritoneum (B), Lunge (C) und Leber (D). Die PMNs sind braun und wurden mit Pfeilen markiert, 100x Vergrößerung, n=3. Sowohl in der Durchflusszytometrie als auch in den histologischen Abbildungen werden die unstimulierten Tiere mit den stimulierten Tieren und mit den prophylaktisch mit den SDF-1 Rezeptorantagonisten behandelten Gruppen (jeweils vier Stunden nach Zymosangabe) verglichen (Ngamsri et al., 2020)..... 62**

Abbildung 16: Ausgezählte PMNs in Peritoneum, Lunge und Leber in der Zymosan-induzierten Peritonitis und Sepsis bei den A_{2B}-KO-Tieren. Es zeigt sich keine Reduktion der PMN-Zahlen durch den SDF-1 Antagonismus in repräsentativen Ausschnitten. Verglichen wird die unstimulierte mit der stimulierten Kontrolle und die prophylaktisch mit den Antagonisten behandelten Gruppen (je vier Stunden nach Zymosangabe). Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung (n=3), *p < 0,05; **p < 0,01; *p < 0,001 und ****p < 0,0001..... 63**

Abbildung 17: Expression des A_{2B} Adenosinrezeptors im Peritoneum beim Wildtyp während Zymosan-induzierter Peritonitis. Durch die Inflammation sinkt die Expression des Rezeptors im Peritoneum und steigt bei zusätzlicher SDF-1 Antagonistengabe wieder an. Zu sehen sind die unstimulierte Kontrolle ohne Zymosan, die stimuliert vier Stunden nach der Zymosangabe und die prophylaktisch mit den Antagonisten behandelten Gruppen ebenfalls vier Stunden nach Zymosangabe. Mittelwerte ± Standardabweichung (n=7-8), **p < 0,01 und *p < 0,001. (Ngamsri et al., 2020)..... 64**

- Abbildung 18: Migration (A) und immunhistochemische Anfärbung (C-D) der PMNs des Wildtyps während polymikrobieller bzw. fäkal-induzierter Peritonitis und Sepsis (FIP).** (A) Durchflusszytometrie: Abgebildet ist hier die unstimulierte Kontrolle im Vergleich zur fäkal-stimulierten Kontrolle (vier Stunden nach Injektion der Fäkalienlösung). Zusätzlich sind die prophylaktisch mit den Antagonisten behandelten Gruppen zu sehen, ebenfalls vier Stunden nach Injektion der Fäkalienlösung. Dargestellt sind hier die Mittelwerte \pm der Standardabweichung (n=6-12), *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001 und ****p < 0,0001. Immunhistochemische Anfärbung der PMNs in Peritoneum (B), Lunge (C) und Leber (D). Die PMNs sind braun und wurden durch Pfeile markiert, 100x Vergrößerung, n=3. (Ngamsri et al., 2020)..... 66
- Abbildung 19: Auszählung der PMNs in Peritoneum, Lunge und Leber in der fäkal-induzierten Peritonitis und Sepsis beim Wildtyp.** In dieser Abbildung sind die ausgezählten neutrophilen Granulozyten dargestellt. Es bestätigen sich die Ergebnisse der Durchflusszytometrie in einem Vergleich der unstimulierten Kontrolle mit der fäkal-stimulierten Kontrolle und den prophylaktisch mit den Antagonisten behandelten Gruppen (je vier Stunden nach Inflammationsbeginn). Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardabweichung (n=3), *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001 und ****p < 0,0001. 67
- Abbildung 20: PNC-Bildung im Blut und mediane Fluoreszenzintensität (MFI) von P-Selektin, L-Selektin und PSGL-1 auf den PNCs beim Wildtyp während Zymosan-induzierter Peritonitis und Sepsis.** Es werden die unstimulierten Tiere mit denen der alleinigen Zymosangabe (stimulierte Kontrollen) und mit den zusätzlich prophylaktisch mit den SDF-1 Rezeptorantagonisten behandelten Tieren verglichen. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte mit der Standardabweichung (n=4-14), *p < 0,05; **p < 0,01 und ****p < 0,0001. (Ngamsri et al., 2021) 69
- Abbildung 21: Immunhistochemische Anfärbung der PNCs in Peritoneum (A), Lunge (B) und Leber (C) während Zymosan-induzierter Peritonitis und Sepsis beim Wildtyp.** Durch den Antagonismus stellt sich in den histologischen Bildern das Epithel des Peritoneums intakter, die Alveolarsepten verschmälert und die PNC-Bildung (durch Pfeile markiert) reduziert dar. In dieser Färbung erscheinen die PMNs bläulich, die Thrombozyten braun und die PNCs blau / schwarz. Diese Abbildung wurde zur Veranschaulichung vergrößert dargestellt. Es werden die unbehandelten Mäuse mit den stimulierten Mäusen (vier Stunden nach Zymosangabe) und die prophylaktisch mit den Antagonisten behandelten Tiere (ebenfalls vier Stunden nach Zymosangabe) abgebildet. 100x Vergrößerung, n=4. (Ngamsri et al., 2021)..... 72

Abbildung 22: Auszählung der PNCs in Peritoneum, Lunge und Leber in der Zymosan-induzierten Peritonitis und Sepsis beim Wildtyp. Es bestätigen sich die Ergebnisse der Durchflusszytometrie in der Auszählung der PNCs in repräsentativen Ausschnitten. Es wird die stimulierte mit der nicht-stimulierten Kontrolle verglichen sowie die beiden prophylaktisch mit den Antagonisten behandelten Gruppen. Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardabweichung (n=4), *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001 und ****p < 0,0001. (Ngamsri et al., 2021) 72

Abbildung 23: Bildung von PNCs im Blut und in den Organen in den A_{2B} Knockout Tieren. In (A) ist die durchflusszytometrisch erfasste PNC-Bildung im Blut und die mediane Fluoreszenzintensität (MFI) von P-Selektin, L-Selektin und PSGL-1 auf den PNCs in den A_{2B}-KO-Tieren während Zymosan-induzierter Peritonitis und Sepsis abgebildet. Im Vergleich der unstimulierten Kontrolle, der stimulierten Kontrolle und den prophylaktisch mit den Antagonisten behandelten Gruppen zeigt sich in den Knockout Tieren keine Reduktion der PNC-Bildung oder der Selektine durch den SDF-1 Rezeptorantagonismus. Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardabweichung (n=4-12), *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001 und ****p < 0,0001. (B-D) bildet die immunhistochemische Anfärbung der PNCs in Peritoneum (B), Lunge (C) und Leber (D) ab. Die PNCs stellen sich blau / schwarz dar und wurden durch Pfeile gekennzeichnet, 100x Vergrößerung, n=4. (Ngamsri et al., 2021) 74

Abbildung 24: Ausgezählte PNCs in den Organen während der Zymosan-induzierten Peritonitis und Sepsis in den A_{2B}-KO-Tieren. Es wurden repräsentative Ausschnitte ausgewählt und die PNCs in diesen ausgezählt. Verglichen wird die nicht-behandelte Kontrolle mit der mit Zymosan stimulierten Kontrolle und die prophylaktisch mit den Antagonisten behandelten Gruppen je vier Stunden nach Zymosangabe. Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardabweichung (n=4), *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001 und ****p < 0,0001. (Ngamsri et al., 2021) 76

- Abbildung 25: PNC-Bildung im Blut und in den Organen während fäkal-induzierter Peritonitis und Sepsis im Wildtyp (FIP).** (A) zeigt die durchflusszytometrisch erfasste PNC-Bildung im Blut und die mediane Fluoreszenzintensität (MFI) der Selektine auf den Wildtyp-PNCs in der polymikrobiellen Inflammation. Es werden die unbehandelten Mäuse mit den alleinig mit Fäkalienlösung stimulierten Tieren und die prophylaktisch mit den Antagonisten behandelten Gruppen verglichen (jeweils vier Stunden nach Injektion der Fäkalienlösung). Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardabweichung (n=5-17), *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001 und ****p < 0,0001. In (B-D) ist die immunhistochemische Anfärbung der PNCs im Peritoneum (B), der Lunge (C) und der Leber (D) dargestellt. Die PNCs stellen sich blau bzw. schwarz dar und wurden zusätzlich mit Pfeilen markiert, 100x Vergrößerung, n=4. (Ngamsri et al., 2021)..... 78
- Abbildung 26: Quantifizierung der PNCs in den Organen während der polymikrobiellen Peritonitis und Sepsis im Wildtyp (FIP).** Die PNCs wurden in repräsentativen Ausschnitten ausgezählt. Verglichen wird die unstimulierte mit der stimulierten Kontrolle und die mit den Antagonisten prophylaktisch behandelten Gruppen (alle vier Stunden nach Injektion der Fäkalienlösung). Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardabweichung (n=4), *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001 und ****p < 0,0001. (Ngamsri et al., 2021)..... 79
- Abbildung 27: Proinflammatorische Mediatoren bzw. Chemokine im Plasma während Zymosan-induzierter Peritonitis und Sepsis bei den Wildtyp Tieren.** In der Abbildung sind die Zytokine TNF α , IL-6, CXCL1 und CXCL2/3 beim Wildtyp dargestellt. Nach einer Steigerung im Rahmen der Inflammation kommt es zu einer Reduktion der Plasmakonzentrationen durch den SDF-1 Rezeptorantagonismus. Es werden die unstimulierten Kontrollen, die stimulierten Kontrollen vier Stunden nach Zymosaninjektion und die prophylaktisch mit den SDF-1 Rezeptorantagonisten behandelten Gruppen vier Stunden nach Zymosaninjektion verglichen. Angegeben sind Mittelwerte und die Standardabweichung (n=6-10), *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001 und ****p < 0,0001. (Ngamsri et al., 2020)..... 80

- Abbildung 28: Zytokine im Plasma bei den A_{2B} Knockout Tieren während Zymosan-induzierter Peritonitis und Sepsis und während polymikrobieller Peritonitis und Sepsis beim Wildtyp (FIP).** Es werden die Zytokine TNF α und CXCL2/3 im Blutplasma der unbehandelten und der stimulierten Tiere (je vier Stunden nach Zymosan- oder Fäkalieninjektion) und die zusätzlich prophylaktisch mit den CXCR4- oder CXCR7-Antagonisten behandelten Gruppen verglichen (ebenfalls vier Stunden nach Inflammationsbeginn). Der Antagonismus der SDF-1 Rezeptoren zeigt keine Auswirkungen in den Knockout Tieren, jedoch im Wildtyp im Rahmen der fäkalen Inflammation. Angegeben sind die Mittelwerte und die Standardabweichung (n=7-16), *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001 und ****p < 0,0001. (Ngamsri et al., 2021)..... 83
- Abbildung 29: Durchflusszytometrisch erfasste PMN-Migration beim Wildtyp während Zymosan-induzierter Peritonitis und Sepsis und therapeutischem SDF-1 Rezeptorantagonismus.** In den ersten beiden Säulen ist jeweils die PMN-Organmigration der unbehandelten und der alleinig mit Zymosan behandelten Kontrollen abgebildet. Diese Gruppen werden mit den therapeutisch mit den Antagonisten behandelten Gruppen verglichen (Zeitpunkt des Antagonismus: Eine Stunde nach Zymosanjektion, Zeitpunkt der Operation: Vier Stunden nach Zymosanjektion). Durch die therapeutische Antagonisierung zeigt sich eine signifikante Reduktion der neutrophilen Granulozyten in der Peritoneallavage. Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardabweichung (n=6-12), *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001 und ****p < 0,0001..... 85
- Abbildung 30: Zytokine im Plasma während Zymosan-induzierter Peritonitis und Sepsis und therapeutischem SDF-1 Rezeptorantagonismus beim Wildtyp.** TNF α und CXCL2/3 sind hier in der unstimulierten Kontrolle, der mit Zymosan stimulierten Kontrolle und in der therapeutisch mit den CXCR4- und CXCR7-Antagonisten behandelten Gruppen dargestellt und wurden beide durch den therapeutischen Antagonismus reduziert im Plasma nachgewiesen (je vier Stunden nach Zymosanjektion). Der therapeutische Antagonismus erfolgte eine Stunde nach Zymosanjektion. Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardabweichung (n=7-16), *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001 und ****p < 0,0001..... 86

8. Literaturverzeichnis

- ABRAHAM, E. & SINGER, M. 2007. Mechanisms of sepsis-induced organ dysfunction. *Crit Care Med*, 35, 2408-16.
- AHERNE, C. M., SAEEDI, B., COLLINS, C. B., MASTERSON, J. C., MCNAMEE, E. N., PERRENOUD, L., RAPP, C. R., CURTIS, V. F., BAYLESS, A., FLETCHER, A., GLOVER, L. E., EVANS, C. M., JEDLICKA, P., FURUTA, G. T., DE ZOETEN, E. F., COLGAN, S. P. & ELTZSCHIG, H. K. 2015. Epithelial-specific A2B adenosine receptor signaling protects the colonic epithelial barrier during acute colitis. *Mucosal Immunol*, 8, 1324-38.
- ANAYA, D. A. & NATHENS, A. B. 2003. Risk factors for severe sepsis in secondary peritonitis. *Surg Infect (Larchmt)*, 4, 355-62.
- ANGUS, D. C., LINDE-ZWIRBLE, W. T., LIDICKER, J., CLERMONT, G., CARCILLO, J. & PINSKY, M. R. 2001. Epidemiology of severe sepsis in the United States: Analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Critical Care Medicine*, 29.
- BADR, H. S., EL-GENDY, F. M. & HELWA, M. A. 2018. Serum stromal-derived-factor-1 (CXCL12) and its alpha chemokine receptor (CXCR4) as biomarkers in neonatal sepsis. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 31, 2209-2215.
- BALAMURUGAN, K. 2016. HIF-1 at the crossroads of hypoxia, inflammation, and cancer. *Int J Cancer*, 138, 1058-66.
- BARBER, R. C., ARAGAKI, C. C., RIVERA-CHAVEZ, F. A., PURDUE, G. F., HUNT, J. L. & HORTON, J. W. 2004. TLR4 and TNF-alpha polymorphisms are associated with an increased risk for severe sepsis following burn injury. *J Med Genet*, 41, 808-13.
- BARLETTA, K. E., LEY, K. & MEHRAD, B. 2012. Regulation of neutrophil function by adenosine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 32, 856-64.
- BOLDAJIPOUR, B., MAHABALESHWAR, H., KARDASH, E., REICHMAN-FRIED, M., BLASER, H., MININA, S., WILSON, D., XU, Q. & RAZ, E. 2008. Control of chemokine-guided cell migration by ligand sequestration. *Cell*, 132, 463-73.
- BONE, R. C., BALK, R. A., CERRA, F. B., DELLINGER, R. P., FEIN, A. M., KNAUS, W. A., SCHEIN, R. M. H. & SIBBALD, W. J. 1992. Definitions for Sepsis and Organ Failure and Guidelines for the Use of Innovative Therapies in Sepsis. *Chest*, 101, 1644-1655.
- BOS, L. D. J. & WARE, L. B. 2022. Acute respiratory distress syndrome: causes, pathophysiology, and phenotypes. *Lancet*, 400, 1145-1156.
- BOURS, M. J., SWENNEN, E. L., DI VIRGILIO, F., CRONSTEIN, B. N. & DAGNELIE, P. C. 2006. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol Ther*, 112, 358-404.
- BOYD, J. H., RUSSELL, J. A. & FJELL, C. D. 2014. The meta-genome of sepsis: host genetics, pathogens and the acute immune response. *J Innate Immun*, 6, 272-83.
- CECCONI, M., EVANS, L., LEVY, M. & RHODES, A. 2018. Sepsis and septic shock. *Lancet*, 392, 75-87.

- CERADINI, D. J., KULKARNI, A. R., CALLAGHAN, M. J., TEPPER, O. M., BASTIDAS, N., KLEINMAN, M. E., CAPLA, J. M., GALIANO, R. D., LEVINE, J. P. & GURTNER, G. C. 2004. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med*, 10, 858-64.
- CHANDRASEKARAN, B., SAMARNEH, S., JABER, A. M. Y., KASSAB, G. & AGRAWAL, N. 2019. Therapeutic Potentials of A2B Adenosine Receptor Ligands: Current Status and Perspectives. *Curr Pharm Des*, 25, 2741-2771.
- CHANG, H. C., HUANG, P. H., SYU, F. S., HSIEH, C. H., CHANG, S. L., LU, J. & CHEN, H. C. 2018. Critical involvement of atypical chemokine receptor CXCR7 in allergic airway inflammation. *Immunology*, 154, 274-284.
- CHATTERJEE, M., VON UNGERN-STERNBERG, S. N., SEIZER, P., SCHLEGEL, F., BUTTCHER, M., SINDHU, N. A., MULLER, S., MACK, A. & GAWAZ, M. 2015. Platelet-derived CXCL12 regulates monocyte function, survival, differentiation into macrophages and foam cells through differential involvement of CXCR4-CXCR7. *Cell Death Dis*, 6, e1989.
- CHENG, Y., MA, X. L., WEI, Y. Q. & WEI, X. W. 2019. Potential roles and targeted therapy of the CXCLs/CXCR2 axis in cancer and inflammatory diseases. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 1871, 289-312.
- CHONG, B. F. & MOHAN, C. 2009. Targeting the CXCR4/CXCL12 axis in systemic lupus erythematosus. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 13, 1147-1153.
- CHURPEK, M. M., ZADRAVECZ, F. J., WINSLOW, C., HOWELL, M. D. & EDELSON, D. P. 2015. Incidence and Prognostic Value of the Systemic Inflammatory Response Syndrome and Organ Dysfunctions in Ward Patients. *Am J Respir Crit Care Med*, 192, 958-64.
- CLARK, S. R., MA, A. C., TAVENER, S. A., MCDONALD, B., GOODARZI, Z., KELLY, M. M., PATEL, K. D., CHAKRABARTI, S., MCAVOY, E., SINCLAIR, G. D., KEYS, E. M., ALLEN-VERCOE, E., DEVINNEY, R., DOIG, C. J., GREEN, F. H. Y. & KUBES, P. 2007. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nature Medicine*, 13, 463-469.
- COSTELLO, C. M., MCCULLAGH, B., HOWELL, K., SANDS, M., BELPERIO, J. A., KEANE, M. P., GAINE, S. & MCLOUGHLIN, P. 2012. A role for the CXCL12 receptor, CXCR7, in the pathogenesis of human pulmonary vascular disease. *Eur Respir J*, 39, 1415-24.
- COX, D. 2023. Sepsis - it is all about the platelets. *Front Immunol*, 14, 1210219.
- CSÓKA, B., NÉMETH, Z. H., ROSENBERGER, P., ELTZSCHIG, H. K., SPOLARICS, Z., PACHER, P., SELMECZY, Z., KOSCSÓ, B., HIMER, L., VIZI, E. S., BLACKBURN, M. R., DEITCH, E. A. & HASKÓ, G. 2010. A2B adenosine receptors protect against sepsis-induced mortality by dampening excessive inflammation. *J Immunol*, 185, 542-50.
- DAI, S., YUAN, F., MU, J., LI, C., CHEN, N., GUO, S., KINGERY, J., PRABHU, S. D., BOLLI, R. & ROKOSH, G. 2010. Chronic AMD3100 antagonism of SDF-1 α -CXCR4 exacerbates cardiac dysfunction and remodeling after myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*, 49, 587-97.

- DE KLERCK, B., GEBOES, L., HATSE, S., KELCHTERMANS, H., MEYVIS, Y., VERMEIRE, K., BRIDGER, G., BILLIAU, A., SCHOLS, D. & MATTHYS, P. 2005. Pro-inflammatory properties of stromal cell-derived factor-1 (CXCL12) in collagen-induced arthritis. *Arthritis Res Ther*, 7, R1208-20.
- DELANO, M. J., KELLY-SCUMPIA, K. M., THAYER, T. C., WINFIELD, R. D., SCUMPIA, P. O., CUENCA, A. G., HARRINGTON, P. B., O'MALLEY, K. A., WARNER, E., GABRILOVICH, S., MATHEWS, C. E., LAFACE, D., HEYWORTH, P. G., RAMPHAL, R., STRIETER, R. M., MOLDAWER, L. L. & EFRON, P. A. 2011. Neutrophil Mobilization from the Bone Marrow during Polymicrobial Sepsis Is Dependent on CXCL12 Signaling. *The Journal of Immunology*, 187, 911-918.
- DEUTSCHMAN, C. S. & TRACEY, K. J. 2014. Sepsis: current dogma and new perspectives. *Immunity*, 40, 463-75.
- ECKLE, T., FAIGLE, M., GRENZ, A., LAUCHER, S., THOMPSON, L. F. & ELTZSCHIG, H. K. 2008. A2B adenosine receptor dampens hypoxia-induced vascular leak. *Blood*, 111, 2024-35.
- ECKLE, T., KRAHN, T., GRENZ, A., KÖHLER, D., MITTELBRONN, M., LEDENT, C., JACOBSON, M. A., OSSWALD, H., THOMPSON, L. F., UNERTL, K. & ELTZSCHIG, H. K. 2007. Cardioprotection by ecto-5'-nucleotidase (CD73) and A2B adenosine receptors. *Circulation*, 115, 1581-90.
- EFRON, P. A., MOHR, A. M., MOORE, F. A. & MOLDAWER, L. L. 2015. The future of murine sepsis and trauma research models. *J Leukoc Biol*, 98, 945-52.
- ELTZSCHIG, H. K., BRATTON, D. L. & COLGAN, S. P. 2014. Targeting hypoxia signalling for the treatment of ischaemic and inflammatory diseases. *Nat Rev Drug Discov*, 13, 852-69.
- ENGELMANN, B. & MASSBERG, S. 2013. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nat Rev Immunol*, 13, 34-45.
- ESPER, A. M., MOSS, M., LEWIS, C. A., NISBET, R., MANNINO, D. M. & MARTIN, G. S. 2006. The role of infection and comorbidity: Factors that influence disparities in sepsis. *Critical care medicine*, 34, 2576-2582.
- ETULAIN, J., MARTINOD, K., WONG, S. L., CIFUNI, S. M., SCHATTLNER, M. & WAGNER, D. D. 2015. P-selectin promotes neutrophil extracellular trap formation in mice. *Blood*, 126, 242-6.
- EVANGELISTA, V., MANARINI, S., SIDERI, R., ROTONDO, S., MARTELLI, N., PICCOLI, A., TOTANI, L., PICCARDONI, P., VESTWEBER, D., DE GAETANO, G. & CERLETTI, C. 1999. Platelet/polymorphonuclear leukocyte interaction: P-selectin triggers protein-tyrosine phosphorylation-dependent CD11b/CD18 adhesion: role of PSGL-1 as a signaling molecule. *Blood*, 93, 876-85.
- FERREIRA, F. L., BOTA, D. P., BROSS, A., MELOT, C. & VINCENT, J. L. 2001. Serial evaluation of the SOFA score to predict outcome in critically ill patients. *Jama*, 286, 1754-8.
- FINK, M. P. 2014. Animal models of sepsis. *Virulence*, 5, 143-53.
- FRANCHINI, S., MARCIANÒ, T., SORLINI, C., CAMPOCHIARO, C., TRESOLDI, M., SABBADINI, M. G. & DAGNA, L. 2015. Serum CXCL12 levels on

- hospital admission predict mortality in patients with severe sepsis/septic shock. *Am J Emerg Med*, 33, 1802-4.
- FURZE, R. C. & RANKIN, S. M. 2008. Neutrophil mobilization and clearance in the bone marrow. *Immunology*, 125, 281-288.
- GARCIA, F., MENDONÇA, R., MIGUEL, L. I., DOMINICAL, V. M., SAAD, S. T. O., COSTA, F. F. & CONRAN, N. 2020. CXCR4(hi) effector neutrophils in sickle cell anemia: potential role for elevated circulating serotonin (5-HT) in CXCR4(hi) neutrophil polarization. *Sci Rep*, 10, 14262.
- GOMEZ, H., INCE, C., DE BACKER, D., PICKKERS, P., PAYEN, D., HOTCHKISS, J. & KELLUM, J. A. 2014. A unified theory of sepsis-induced acute kidney injury: inflammation, microcirculatory dysfunction, bioenergetics, and the tubular cell adaptation to injury. *Shock*, 41, 3-11.
- GONZALO, J. A., LLOYD, C. M., PELED, A., DELANEY, T., COYLE, A. J. & GUTIERREZ-RAMOS, J. C. 2000. Critical involvement of the chemotactic axis CXCR4/stromal cell-derived factor-1 alpha in the inflammatory component of allergic airway disease. *J Immunol*, 165, 499-508.
- GOTTS, J. E. & MATTHAY, M. A. 2016. Sepsis: pathophysiology and clinical management. *Bmj*, 353, i1585.
- GRENZ, A., OSSWALD, H., ECKLE, T., YANG, D., ZHANG, H., TRAN, Z. V., KLINGEL, K., RAVID, K. & ELTZSCHIG, H. K. 2008. The reno-vascular A2B adenosine receptor protects the kidney from ischemia. *PLoS Med*, 5, e137.
- GROMMES, J. & SOEHNLEIN, O. 2011. Contribution of neutrophils to acute lung injury. *Mol Med*, 17, 293-307.
- HAM, J. & REES, D. A. 2008. The adenosine a2b receptor: its role in inflammation. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 8, 244-54.
- HAO, H., HU, S., CHEN, H., BU, D., ZHU, L., XU, C., CHU, F., HUO, X., TANG, Y., SUN, X., DING, B. S., LIU, D. P., HU, S. & WANG, M. 2017. Loss of Endothelial CXCR7 Impairs Vascular Homeostasis and Cardiac Remodeling After Myocardial Infarction: Implications for Cardiovascular Drug Discovery. *Circulation*, 135, 1253-1264.
- HOTCHKISS, R. S., MOLDAWER, L. L., OPAL, S. M., REINHART, K., TURNBULL, I. R. & VINCENT, J. L. 2016. Sepsis and septic shock. *Nat Rev Dis Primers*, 2, 16045.
- HOTCHKISS, R. S., MONNERET, G. & PAYEN, D. 2013a. Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *Lancet Infect Dis*, 13, 260-8.
- HOTCHKISS, R. S., MONNERET, G. & PAYEN, D. 2013b. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol*, 13, 862-74.
- HSU, W. T., JUI, H. Y., HUANG, Y. H., SU, M. Y., WU, Y. W., TSENG, W. Y., HSU, M. C., CHIANG, B. L., WU, K. K. & LEE, C. M. 2015. CXCR4 Antagonist TG-0054 Mobilizes Mesenchymal Stem Cells, Attenuates Inflammation, and Preserves Cardiac Systolic Function in a Porcine Model of Myocardial Infarction. *Cell Transplant*, 24, 1313-28.
- HUYNH, C., DINGEMANSE, J., MEYER ZU SCHWABEDISSEN, H. E. & SIDHARTA, P. N. 2020. Relevance of the CXCR4/CXCR7-CXCL12 axis

- and its effect in pathophysiological conditions. *Pharmacol Res*, 161, 105092.
- KAUKONEN, K. M., BAILEY, M., PILCHER, D., COOPER, D. J. & BELLOMO, R. 2015. Systemic inflammatory response syndrome criteria in defining severe sepsis. *N Engl J Med*, 372, 1629-38.
- KAUKONEN, K. M., BAILEY, M., SUZUKI, S., PILCHER, D. & BELLOMO, R. 2014. Mortality related to severe sepsis and septic shock among critically ill patients in Australia and New Zealand, 2000-2012. *Jama*, 311, 1308-16.
- KHAN, N. I., SIDDIQUI, F. M., GOLDSTEIN, J. N., COX, M., XIAN, Y., MATSOJAKA, R. A., HEIDENREICH, P. A., PETERSON, E. D., BHATT, D. L., FONAROW, G. C., SCHWAMM, L. H. & SMITH, E. E. 2017. Association Between Previous Use of Antiplatelet Therapy and Intracerebral Hemorrhage Outcomes. *Stroke*, 48, 1810-1817.
- KOLACHALA, V. L., VIJAY-KUMAR, M., DALMASSO, G., YANG, D., LINDEN, J., WANG, L., GEWIRTZ, A., RAVID, K., MERLIN, D. & SITARAMAN, S. V. 2008. A2B Adenosine Receptor Gene Deletion Attenuates Murine Colitis. *Gastroenterology*, 135, 861-870.
- KOLACZKOWSKA, E. & KUBES, P. 2013. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*, 13, 159-75.
- KOLLET, O., SHIVTIEL, S., CHEN, Y. Q., SURIAWINATA, J., THUNG, S. N., DABEVA, M. D., KAHN, J., SPIEGEL, A., DAR, A., SAMIRA, S., GOICHBERG, P., KALINKOVICH, A., ARENZANA-SEISDEDOS, F., NAGLER, A., HARDAN, I., REVEL, M., SHAFRITZ, D. A. & LAPIDOT, T. 2003. HGF, SDF-1, and MMP-9 are involved in stress-induced human CD34+ stem cell recruitment to the liver. *J Clin Invest*, 112, 160-9.
- KONRAD, F. M., MEICHSSNER, N., BURY, A., NGAMSRI, K. C. & REUTERSCHAN, J. 2017. Inhibition of SDF-1 receptors CXCR4 and CXCR7 attenuates acute pulmonary inflammation via the adenosine A2B-receptor on blood cells. *Cell Death Dis*, 8, e2832.
- KORNERUP, K. N., SALMON, G. P., PITCHFORD, S. C., LIU, W. L. & PAGE, C. P. 2010. Circulating platelet-neutrophil complexes are important for subsequent neutrophil activation and migration. *J Appl Physiol (1985)*, 109, 758-67.
- KRETH, S., KAUFMANN, I., LEDDEROSE, C., LUCHTING, B. & THIEL, M. 2009. Reduced ligand affinity leads to an impaired function of the adenosine A2A receptor of human granulocytes in sepsis. *J Cell Mol Med*, 13, 985-94.
- KUMAR, G., KUMAR, N., TANEJA, A., KALEEKAL, T., TARIMA, S., MCGINLEY, E., JIMENEZ, E., MOHAN, A., KHAN, R. A., WHITTLE, J., JACOBS, E. & NANCHAL, R. 2011. Nationwide trends of severe sepsis in the 21st century (2000-2007). *Chest*, 140, 1223-1231.
- LEDDEROSE, C., BAO, Y., KONDO, Y., FAKHARI, M., SLUBOWSKI, C., ZHANG, J. & JUNGER, W. G. 2016. Purinergic Signaling and the Immune Response in Sepsis: A Review. *Clin Ther*, 38, 1054-65.
- LEVI, M. 2001. Pathogenesis and treatment of disseminated intravascular coagulation in the septic patient. *J Crit Care*, 16, 167-77.
- LEVOYE, A., BALABANIAN, K., BALEUX, F., BACHELERIE, F. & LAGANE, B. 2009. CXCR7 heterodimerizes with CXCR4 and regulates CXCL12-mediated G protein signaling. *Blood*, 113, 6085-93.

- LEVY, M. M., EVANS, L. E. & RHODES, A. 2018. The Surviving Sepsis Campaign Bundle: 2018 Update. *Critical Care Medicine*, 46.
- LI, L., CHEN, K., XIANG, Y., YOSHIMURA, T., SU, S., ZHU, J., BIAN, X. W. & WANG, J. M. 2016. New development in studies of formyl-peptide receptors: critical roles in host defense. *J Leukoc Biol*, 99, 425-35.
- LIANG, L., MOORE, B. & SONI, A. 2020. National Inpatient Hospital Costs: The Most Expensive Conditions by Payer, 2017: Statistical Brief #261. *Healthcare Cost and Utilization Project (HCUP) Statistical Briefs*. Rockville (MD): Agency for Healthcare Research and Quality (US).
- LIEHN, E. A., TUCHSCHEERER, N., KANZLER, I., DRECHSLER, M., FRAEMOHS, L., SCHUH, A., KOENEN, R. R., ZANDER, S., SOEHNLEIN, O., HRISTOV, M., GRIGORESCU, G., URS, A. O., LEABU, M., BUCUR, I., MERX, M. W., ZERNECKE, A., EHLING, J., GREMSE, F., LAMMERS, T., KIESSLING, F., BERNHAGEN, J., SCHOBER, A. & WEBER, C. 2011. Double-edged role of the CXCL12/CXCR4 axis in experimental myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, 58, 2415-23.
- LIU, H., XUE, W., GE, G., LUO, X., LI, Y., XIANG, H., DING, X., TIAN, P. & TIAN, X. 2010. Hypoxic preconditioning advances CXCR4 and CXCR7 expression by activating HIF-1 α in MSCs. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 401, 509-515.
- LIU, Q., LI, Z., GAO, J.-L., WAN, W., GANESAN, S., MCDERMOTT, D. H. & MURPHY, P. M. 2015. CXCR4 antagonist AMD3100 redistributes leukocytes from primary immune organs to secondary immune organs, lung, and blood in mice. *European Journal of Immunology*, 45, 1855-1867.
- LOH, S. A., CHANG, E. I., GALVEZ, M. G., THANGARAJAH, H., EL-FTESI, S., VIAL, I. N., LIN, D. A. & GURTNER, G. C. 2009. SDF-1 alpha expression during wound healing in the aged is HIF dependent. *Plast Reconstr Surg*, 123, 65s-75s.
- LOPEZ, N., KOBAYASHI, L. & COIMBRA, R. 2011. A Comprehensive review of abdominal infections. *World J Emerg Surg*, 6, 7.
- MANDEL, J., CASARI, M., STEPANYAN, M., MARTYANOV, A. & DEPPERMAN, C. 2022. Beyond Hemostasis: Platelet Innate Immune Interactions and Thromboinflammation. *Int J Mol Sci*, 23.
- MAO, L., HUANG, M., CHEN, S. C., LI, Y. N., XIA, Y. P., HE, Q. W., WANG, M. D., HUANG, Y., ZHENG, L. & HU, B. 2014. Endogenous endothelial progenitor cells participate in neovascularization via CXCR4/SDF-1 axis and improve outcome after stroke. *CNS Neurosci Ther*, 20, 460-8.
- MARTIN, G. S., MANNINO, D. M., EATON, S. & MOSS, M. 2003. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med*, 348, 1546-54.
- MARTIN, G. S., MANNINO, D. M. & MOSS, M. 2006. The effect of age on the development and outcome of adult sepsis. *Crit Care Med*, 34, 15-21.
- MARTÍN, S., PÉREZ, A. & ALDECOA, C. 2017. Sepsis and Immunosenescence in the Elderly Patient: A Review. *Front Med (Lausanne)*, 4, 20.
- MATTHYS, P., HATSE, S., VERMEIRE, K., WUYTS, A., BRIDGER, G., HENSON, G. W., DE CLERCQ, E., BILLIAU, A. & SCHOLS, D. 2001. AMD3100, a potent and specific antagonist of the stromal cell-derived factor-1 chemokine receptor CXCR4, inhibits autoimmune joint

- inflammation in IFN-gamma receptor-deficient mice. *J Immunol*, 167, 4686-92.
- MAYR, F. B., YENDE, S. & ANGUS, D. C. 2014. Epidemiology of severe sepsis. *Virulence*, 5, 4-11.
- MCEVER, R. P. 2015. Selectins: initiators of leucocyte adhesion and signalling at the vascular wall. *Cardiovasc Res*, 107, 331-9.
- MIKAMI, S., NAKASE, H., YAMAMOTO, S., TAKEDA, Y., YOSHINO, T., KASAHARA, K., UENO, S., UZA, N., OISHI, S., FUJII, N., NAGASAWA, T. & CHIBA, T. 2008. Blockade of CXCL12/CXCR4 axis ameliorates murine experimental colitis. *J Pharmacol Exp Ther*, 327, 383-92.
- MORIYAMA, K. & NISHIDA, O. 2021. Targeting Cytokines, Pathogen-Associated Molecular Patterns, and Damage-Associated Molecular Patterns in Sepsis via Blood Purification. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 8882.
- MOUSAVI, A. 2020. CXCL12/CXCR4 signal transduction in diseases and its molecular approaches in targeted-therapy. *Immunology Letters*, 217, 91-115.
- MUNFORD, R. S. & PUGIN, J. 2001. Normal Responses to Injury Prevent Systemic Inflammation and Can Be Immunosuppressive. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 163, 316-321.
- MUTUA, V. & GERSHWIN, L. J. 2021. A Review of Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in Disease: Potential Anti-NETs Therapeutics. *Clin Rev Allergy Immunol*, 61, 194-211.
- NASA, P., JUNEJA, D., SINGH, O., DANG, R. & ARORA, V. 2012. Severe sepsis and its impact on outcome in elderly and very elderly patients admitted in intensive care unit. *J Intensive Care Med*, 27, 179-83.
- NGAMSRI, K.-C., JANS, C., PUTRI, R. A., SCHINDLER, K., GAMPER-TSIGARAS, J., EGGSTEIN, C., KÖHLER, D. & KONRAD, F. M. 2020. Inhibition of CXCR4 and CXCR7 Is Protective in Acute Peritoneal Inflammation. *Frontiers in Immunology*, 11.
- NGAMSRI, K.-C., MÜLLER, A., BÖSMÜLLER, H., GAMPER-TSIGARAS, J., REUTERSCHAN, J. & KONRAD, F. M. 2017. The Pivotal Role of CXCR7 in Stabilization of the Pulmonary Epithelial Barrier in Acute Pulmonary Inflammation. *The Journal of Immunology*, 198, 2403-2413.
- NGAMSRI, K. C., PUTRI, R. A., JANS, C., SCHINDLER, K., FUHR, A., ZHANG, Y., GAMPER-TSIGARAS, J., EHNERT, S. & KONRAD, F. M. 2021. CXCR4 and CXCR7 Inhibition Ameliorates the Formation of Platelet-Neutrophil Complexes and Neutrophil Extracellular Traps through Adora2b Signaling. *Int J Mol Sci*, 22.
- OHTA, A. & SITKOVSKY, M. 2001. Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. *Nature*, 414, 916-20.
- OSUCHOWSKI, M. F., REMICK, D. G., LEDERER, J. A., LANG, C. H., AASEN, A. O., AIBIKI, M., AZEVEDO, L. C., BAHRAMI, S., BOROS, M., COONEY, R., CUZZOCREA, S., JIANG, Y., JUNGER, W. G., HIRASAWA, H., HOTCHKISS, R. S., LI, X. A., RADERMACHER, P., REDL, H., SALOMAO, R., SOEBANDRIO, A., THIEMERMANN, C., VINCENT, J. L.,

- WARD, P., YAO, Y. M., YU, H. P., ZINGARELLI, B. & CHAUDRY, I. H. 2014. Abandon the mouse research ship? Not just yet! *Shock*, 41, 463-75.
- PETIT, I., JIN, D. & RAFII, S. 2007. The SDF-1-CXCR4 signaling pathway: a molecular hub modulating neo-angiogenesis. *Trends Immunol*, 28, 299-307.
- PETTY, J. M., SUEBLINVONG, V., LENOX, C. C., JONES, C. C., COSGROVE, G. P., COOL, C. D., RAI, P. R., BROWN, K. K., WEISS, D. J., POYNTER, M. E. & SURATT, B. T. 2007. Pulmonary stromal-derived factor-1 expression and effect on neutrophil recruitment during acute lung injury. *J Immunol*, 178, 8148-57.
- PHILLIPSON, M. & KUBES, P. 2011. The neutrophil in vascular inflammation. *Nat Med*, 17, 1381-90.
- PIERACCI, F. M. & BARIE, P. S. 2007. Management of severe sepsis of abdominal origin. *Scand J Surg*, 96, 184-96.
- PIRCHER, J., ENGELMANN, B., MASSBERG, S. & SCHULZ, C. 2019. Platelet-Neutrophil Crosstalk in Atherothrombosis. *Thromb Haemost*, 119, 1274-1282.
- RABOUEL, Y., MAGNENAT, S., DELABRANCHE, X., GACHET, C. & HECHLER, B. 2021. Platelet P2Y (12) Receptor Deletion or Pharmacological Inhibition does not Protect Mice from Sepsis or Septic Shock. *TH Open*, 5, e343-e352.
- RAMONELL, K. M., ZHANG, W., HADLEY, A., CHEN, C. W., FAY, K. T., LYONS, J. D., KLINGENSMITH, N. J., MCCONNELL, K. W., COOPERSMITH, C. M. & FORD, M. L. 2017. CXCR4 blockade decreases CD4+ T cell exhaustion and improves survival in a murine model of polymicrobial sepsis. *PLoS One*, 12, e0188882.
- REDDY, R. C. & STANDIFORD, T. J. 2010. Effects of sepsis on neutrophil chemotaxis. *Curr Opin Hematol*, 17, 18-24.
- RHEINLÄNDER, A., SCHRAVEN, B. & BOMMHARDT, U. 2018. CD45 in human physiology and clinical medicine. *Immunol Lett*, 196, 22-32.
- RICHARD, C. L., TAN, E. Y. & BLAY, J. 2006. Adenosine upregulates CXCR4 and enhances the proliferative and migratory responses of human carcinoma cells to CXCL12/SDF-1alpha. *Int J Cancer*, 119, 2044-53.
- ROSS, J. T., MATTHAY, M. A. & HARRIS, H. W. 2018. Secondary peritonitis: principles of diagnosis and intervention. *Bmj*, 361, k1407.
- RUDIGER, A. & SINGER, M. 2007. Mechanisms of sepsis-induced cardiac dysfunction. *Crit Care Med*, 35, 1599-608.
- RUSSELL, J. A., RUSH, B. & BOYD, J. 2018. Pathophysiology of Septic Shock. *Critical Care Clinics*, 34, 43-61.
- SCHRODER, K. & TSCHOPP, J. 2010. The inflammasomes. *Cell*, 140, 821-32.
- SEEMANN, S. & LUPP, A. 2016. Administration of AMD3100 in endotoxemia is associated with pro-inflammatory, pro-oxidative, and pro-apoptotic effects in vivo. *J Biomed Sci*, 23, 68.
- SEIDEL, M., WINNING, J., CLAUS, R. A., BAUER, M. & LÖSCHE, W. 2009. Beneficial effect of clopidogrel in a mouse model of polymicrobial sepsis. *J Thromb Haemost*, 7, 1030-2.
- SEMENZA, G. L. 2014. Oxygen sensing, hypoxia-inducible factors, and disease pathophysiology. *Annu Rev Pathol*, 9, 47-71.

- SEMPLE, J. W., ITALIANO, J. E. & FREEDMAN, J. 2011. Platelets and the immune continuum. *Nature Reviews Immunology*, 11, 264-274.
- SEOK, J., WARREN, H. S., CUENCA, A. G., MINDRINOS, M. N., BAKER, H. V., XU, W., RICHARDS, D. R., MCDONALD-SMITH, G. P., GAO, H., HENNESSY, L., FINNERTY, C. C., LÓPEZ, C. M., HONARI, S., MOORE, E. E., MINEI, J. P., CUSCHIERI, J., BANKEY, P. E., JOHNSON, J. L., SPERRY, J., NATHENS, A. B., BILLIAR, T. R., WEST, M. A., JESCHKE, M. G., KLEIN, M. B., GAMELLI, R. L., GIBRAN, N. S., BROWNSTEIN, B. H., MILLER-GRAZIANO, C., CALVANO, S. E., MASON, P. H., COBB, J. P., RAHME, L. G., LOWRY, S. F., MAIER, R. V., MOLDAWER, L. L., HERNDON, D. N., DAVIS, R. W., XIAO, W. & TOMPKINS, R. G. 2013. Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 3507-12.
- SEPNET CRITICAL CARE TRIALS, G. 2016. Incidence of severe sepsis and septic shock in German intensive care units: the prospective, multicentre INSEP study. *Intensive Care Medicine*, 42, 1980-1989.
- SHAO, H. Z. & QIN, B. Y. 2015. rPSGL-1-Ig, a recombinant PSGL-1-Ig fusion protein, ameliorates LPS-induced acute lung injury in mice by inhibiting neutrophil migration. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 61, 1-6.
- SINGER, M. 2014. The role of mitochondrial dysfunction in sepsis-induced multi-organ failure. *Virulence*, 5, 66-72.
- SINGER, M., DEUTSCHMAN, C. S., SEYMOUR, C. & ET AL. 2016. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). *JAMA*, 315, 801-810.
- SKIRECKI, T., KAWIAK, J., MACHAJ, E., POJDA, Z., WASILEWSKA, D., CZUBAK, J. & HOSER, G. 2015. Early severe impairment of hematopoietic stem and progenitor cells from the bone marrow caused by CLP sepsis and endotoxemia in a humanized mice model. *Stem Cell Res Ther*, 6, 142.
- SPALDING, D. R. & WILLIAMSON, R. C. 2008. Peritonitis. *Br J Hosp Med (Lond)*, 69, M12-5.
- SREERAMKUMAR, V., ADROVER, J. M., BALLESTEROS, I., CUARTERO, M. I., ROSSAINT, J., BILBAO, I., NÁCHER, M., PITAVAL, C., RADOVANOVIC, I., FUKUI, Y., MCEVER, R. P., FILIPPI, M. D., LIZASOAIN, I., RUIZ-CABELLO, J., ZARBOCK, A., MORO, M. A. & HIDALGO, A. 2014. Neutrophils scan for activated platelets to initiate inflammation. *Science*, 346, 1234-8.
- STELLOS, K., LANGER, H., DAUB, K., SCHOENBERGER, T., GAUSS, A., GEISLER, T., BIGALKE, B., MUELLER, I., SCHUMM, M., SCHAEFER, I., SEIZER, P., KRAEMER, B. F., SIEGEL-AXEL, D., MAY, A. E., LINDEMANN, S. & GAWAZ, M. 2008. Platelet-derived stromal cell-derived factor-1 regulates adhesion and promotes differentiation of human CD34+ cells to endothelial progenitor cells. *Circulation*, 117, 206-15.
- SUMMERS, C., RANKIN, S. M., CONDLIFFE, A. M., SINGH, N., PETERS, A. M. & CHILVERS, E. R. 2010. Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol*, 31, 318-24.
- SUTHERLAND, A. M., WALLEY, K. R. & RUSSELL, J. A. 2005. Polymorphisms in CD14, mannose-binding lectin, and Toll-like receptor-2 are associated

- with increased prevalence of infection in critically ill adults. *Crit Care Med*, 33, 638-44.
- SZABÓ, C. & MÓDIS, K. 2010. Pathophysiological roles of peroxynitrite in circulatory shock. *Shock*, 34 Suppl 1, 4-14.
- TAKASU, O., GAUT, J. P., WATANABE, E., TO, K., FAGLEY, R. E., SATO, B., JARMAN, S., EFIMOV, I. R., JANKS, D. L., SRIVASTAVA, A., BHAYANI, S. B., DREWRY, A., SWANSON, P. E. & HOTCHKISS, R. S. 2013. Mechanisms of cardiac and renal dysfunction in patients dying of sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*, 187, 509-17.
- TAKEUCHI, O. & AKIRA, S. 2010. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell*, 140, 805-820.
- TEICHER, B. A. & FRICKER, S. P. 2010. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 Pathway in Cancer. *Clinical Cancer Research*, 16, 2927-2931.
- THOMPSON, C. M., HOLDEN, T. D., RONA, G., LAXMANAN, B., BLACK, R. A., O'KEEFE, G. E. & WURFEL, M. M. 2014. Toll-like receptor 1 polymorphisms and associated outcomes in sepsis after traumatic injury: a candidate gene association study. *Ann Surg*, 259, 179-85.
- TSOU, L. K., HUANG, Y. H., SONG, J. S., KE, Y. Y., HUANG, J. K. & SHIA, K. S. 2018. Harnessing CXCR4 antagonists in stem cell mobilization, HIV infection, ischemic diseases, and oncology. *Med Res Rev*, 38, 1188-1234.
- TUNC, T., CEKMEZ, F., CETINKAYA, M., KALAYCI, T., FIDANCI, K., SALDIR, M., BABACAN, O., SARI, E., ERDEM, G., CAYCI, T., KUL, M. & KAVUNCUOGLU, S. 2015. Diagnostic value of elevated CXCR4 and CXCL12 in neonatal sepsis. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 28, 356-61.
- UHLE, F., LICHTENSTERN, C., BRENNER, T. & WEIGAND, M. A. 2015. [Pathophysiology of sepsis]. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther*, 50, 114-22.
- VAN DER HOEVEN, D., WAN, T. C., GIZEWSKI, E. T., KRECKLER, L. M., MAAS, J. E., VAN ORMAN, J., RAVID, K. & AUCHAMPACH, J. A. 2011. A role for the low-affinity A2B adenosine receptor in regulating superoxide generation by murine neutrophils. *J Pharmacol Exp Ther*, 338, 1004-12.
- VARDON-BOUNES, F., RUIZ, S., GRATACAP, M. P., GARCIA, C., PAYRASTRE, B. & MINVILLE, V. 2019. Platelets Are Critical Key Players in Sepsis. *Int J Mol Sci*, 20.
- VENET, F. & MONNERET, G. 2018. Advances in the understanding and treatment of sepsis-induced immunosuppression. *Nat Rev Nephrol*, 14, 121-137.
- VINCENT, J.-L., LEFRANT, J.-Y., KOTFIS, K., NANCHAL, R., MARTIN-LOECHES, I., WITTEBOLE, X., SAKKA, S. G., PICKKERS, P., MORENO, R., SAKR, Y., ICON, INVESTIGATORS, S. & INVESTIGATORS, S. 2018. Comparison of European ICU patients in 2012 (ICON) versus 2002 (SOAP). *Intensive care medicine*, 44, 337-344.
- VINCENT, J.-L., OPAL, S. M., MARSHALL, J. C. & TRACEY, K. J. 2013. Sepsis definitions: time for change. *Lancet (London, England)*, 381, 774-775.
- VINCENT, J.-L., RELLO, J., MARSHALL, J., SILVA, E., ANZUETO, A., MARTIN, C. D., MORENO, R., LIPMAN, J., GOMERSALL, C., SAKR, Y., REINHART, K. & EPIC II GROUP OF INVESTIGATORS, F. T. 2009.

- International Study of the Prevalence and Outcomes of Infection in Intensive Care Units. *JAMA*, 302, 2323-2329.
- VINCENT, J. L., MORENO, R., TAKALA, J., WILLATTS, S., DE MENDONÇA, A., BRUINING, H., REINHART, C. K., SUTER, P. M. & THIJS, L. G. 1996. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med*, 22, 707-10.
- VINCENT, J. L., SAKR, Y., SPRUNG, C. L., RANIERI, V. M., REINHART, K., GERLACH, H., MORENO, R., CARLET, J., LE GALL, J. R. & PAYEN, D. 2006. Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Crit Care Med*, 34, 344-53.
- VOLMAN, T. J. H., HENDRIKS, T. & GORIS, R. J. A. 2005. ZYMOSAN-INDUCED GENERALIZED INFLAMMATION: EXPERIMENTAL STUDIES INTO MECHANISMS LEADING TO MULTIPLE ORGAN DYSFUNCTION SYNDROME. *Shock*, 23, 291-297.
- WACHARASINT, P., NAKADA, T.-A., BOYD, J. H., RUSSELL, J. A. & WALLEY, K. R. 2012. AA genotype of IL-8 -251A/T is associated with low PaO₂/FiO₂ in critically ill patients and with increased IL-8 expression. *Respirology*, 17, 1253-1260.
- WALLEY, K. R. 2018. Sepsis-induced myocardial dysfunction. *Curr Opin Crit Care*, 24, 292-299.
- WANG, A., FAIRHURST, A. M., TUS, K., SUBRAMANIAN, S., LIU, Y., LIN, F., IGARASHI, P., ZHOU, X. J., BATTEUX, F., WONG, D., WAKELAND, E. K. & MOHAN, C. 2009. CXCR4/CXCL12 hyperexpression plays a pivotal role in the pathogenesis of lupus. *J Immunol*, 182, 4448-58.
- WANG, C., CHEN, W. & SHEN, J. 2018. CXCR7 Targeting and Its Major Disease Relevance. *Frontiers in Pharmacology*, 9.
- WITTE, A., ROHLFING, A. K., DANNENMANN, B., DICENTA, V., NASRI, M., KOLB, K., SUDMANN, J., CASTOR, T., RATH, D., BORST, O., SKOKOWA, J. & GAWAZ, M. 2021. The chemokine CXCL14 mediates platelet function and migration via direct interaction with CXCR4. *Cardiovasc Res*, 117, 903-917.
- WU, K. J., YU, S. J., SHIA, K. S., WU, C. H., SONG, J. S., KUAN, H. H., YEH, K. C., CHEN, C. T., BAE, E. & WANG, Y. 2017. A Novel CXCR4 Antagonist CX549 Induces Neuroprotection in Stroke Brain. *Cell Transplant*, 26, 571-583.
- XU, J., MORA, A., SHIM, H., STECENKO, A., BRIGHAM, K. L. & ROJAS, M. 2007. Role of the SDF-1/CXCR4 axis in the pathogenesis of lung injury and fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 37, 291-9.
- YANG, D., KOUPENOVA, M., MCCRANN, D. J., KOPEIKINA, K. J., KAGAN, H. M., SCHREIBER, B. M. & RAVID, K. 2008. The A2b adenosine receptor protects against vascular injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105, 792.
- YANG, J., FURIE, B. C. & FURIE, B. 1999. The biology of P-selectin glycoprotein ligand-1: its role as a selectin counterreceptor in leukocyte-endothelial and leukocyte-platelet interaction. *Thromb Haemost*, 81, 1-7.

- YAXIN, W., SHANGLONG, Y., HUAQING, S., HONG, L., SHIYING, Y., XIANGDONG, C., RUIDONG, L., XIAOYING, W., LINA, G. & YAN, W. 2014. Resolvin D1 attenuates lipopolysaccharide induced acute lung injury through CXCL-12/CXCR4 pathway. *J Surg Res*, 188, 213-21.
- ZHONG, H., BELARDINELLI, L., MAA, T., FEOKTISTOV, I., BIAGGIONI, I. & ZENG, D. 2004. A(2B) adenosine receptors increase cytokine release by bronchial smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 30, 118-25.
- ZOU, Y. R., KOTTMANN, A. H., KURODA, M., TANIUCHI, I. & LITTMAN, D. R. 1998. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature*, 393, 595-9.

9. Erklärung zum Eigenanteil

Diese Arbeit wurde in der Universitätsklinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin in Tübingen unter der Betreuung von Frau Prof. Dr. med. Franziska Konrad durchgeführt. Die Konzeption der Experimente erfolgte durch Frau Prof. Dr. med. Franziska Konrad und Herrn Dr. med. Kristian Ngamsri. Beide korrigierten das Manuskript.

Die Durchführung der Versuche und deren statistische Auswertung erfolgte durch mich nach Anleitung und unter Betreuung von Herrn Dr. med. Kristian Ngamsri.

Ich versichere, das Manuskript selbst verfasst zu haben und nur die angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Visp, den 31.05.2024

10. Veröffentlichung

Teile dieser Dissertationsarbeit wurden in den folgenden Publikationen veröffentlicht:

NGAMSRI, K.-C., JANS, C., PUTRI, R. A., SCHINDLER, K., GAMPER-TSIGARAS, J., EGGSTEIN, C., KÖHLER, D. & KONRAD, F. M. 2020. Inhibition of CXCR4 and CXCR7 Is Protective in Acute Peritoneal Inflammation. *Frontiers in Immunology*, 11.

NGAMSRI, K. C., PUTRI, R. A., JANS, C., SCHINDLER, K., FUHR, A., ZHANG, Y., GAMPER-TSIGARAS, J., EHNERT, S. & KONRAD, F. M. 2021. CXCR4 and CXCR7 Inhibition Ameliorates the Formation of Platelet-Neutrophil Complexes and Neutrophil Extracellular Traps through Adora2b Signaling. *Int J Mol Sci*, 22.

Die in den genannten Publikationen bereits veröffentlichten Daten wurden entsprechend gekennzeichnet.

11. Danksagung

Für die Bereitstellung der Thematik meiner Dissertation und die gute Betreuung möchte ich mich herzlich bei Franziska Konrad und Kristian Ngamsri bedanken. Sie standen mir bei Fragen zu meiner Arbeit jederzeit zur Verfügung und unterstützten so maßgeblich das Gelingen dieser Arbeit. Ebenso bedanke ich mich herzlich bei Jutta Gamper-Tsigaras, die mir oftmals bei Fragen im Labor zur Seite stand. Ebenfalls möchte ich mich bei meiner Freundin Kathrin und meiner Familie für das Korrekturlesen und ihre Unterstützung bedanken.