

Expression vasokonstriktorischer Rezeptoren während experimenteller Endotoxämie

Expression of vasoconstrictive receptors during experimental endotoxaemia

M. Bucher

Klinik für Anästhesiologie, Klinikum der Universität Regensburg (Direktor: Prof. Dr. K. Taeger)

Zusammenfassung: Die verminderte vasokonstriktorische Wirksamkeit von Norepinephrin, Angiotensin II und Vasopressin lenkte unser Interesse auf die Regulation der Rezeptoren für Vasokonstriktoren unter den Bedingungen einer experimentellen Endotoxämie in vivo und in vitro.

Zur Induktion einer Endotoxämie wurde männlichen Sprague-Dawley-Ratten Lipopolysaccharid (10 mg/kg) i.v. injiziert und der systolische Blutdruck stündlich gemessen. Die Tiere wurden 6, 12 oder 24 Stunden nach der Injektion zur Organentnahme getötet. In den Organen wurde die Genexpression von vasokonstriktorisches Rezeptoren wie Angiotensin II Typ 1 - (AT₁) - Rezeptoren, Vasopressin-V_{1A}-Rezeptoren und α_1 -adrenergen Rezeptoren mittels spezifischen RNase-Protection-Assay bestimmt. Die Gewebekonzentration der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF- α und von Katecholaminen wurde mittels ELISA bzw. HPLC gemessen. Die Plasma-Renin-Aktivität, die Plasma-Angiotensin II- und Plasma-Aldosteron-Konzentration wurden mittels RIA bestimmt. Zusätzlich wurden Blutdruck-Dosis-Wirkungsversuche mit Angiotensin II und einem selektiven V₁-Rezeptor-Agonisten nach Induktion einer experimentellen Endotoxämie im Vergleich zu Vehikel-injizierten Ratten durchgeführt. Renale Mesangialzellen und aortale glatte Gefäßmuskulzellen (Zelllinie A7r5) der Ratte wurden mit proinflammatorischen Zytokinen und NO-Donatoren inkubiert und die Gen- und Proteinexpression vasokonstriktorisches Rezeptoren mittels RNase-Protection-Assay bzw. anhand von Radioligand-Bindungsstudien bestimmt.

Während Endotoxämie kam es zu einer arteriellen Hypotension und Tachykardie mit verminderter Blutdruckwirksamkeit von Angiotensin II und einem selektiven V₁-Rezeptor-Agonisten. Plasma-Renin-Aktivität und Plasma-Angiotensin II-Konzentration waren deutlich erhöht, während die Plasma-Aldosteron-Konzentration unverändert blieb. Gleichzeitig fanden wir eine systemisch verminderte Expression von AT₁-, V_{1A}- und α_1 -Rezeptoren während experimenteller Endotoxämie. In vitro fanden wir eine Verminderung der Expression vasokonstriktorisches Rezeptoren durch TNF- α , IL-1 β und IFN- γ und teilweise auch durch NO.

Unsere Daten belegen eine systemisch verminderte Expression vasokonstriktorisches Rezeptoren während experimenteller Endotoxämie, welche möglicherweise durch proinflammatorische Zytokine und auch NO vermittelt werden könnte. Wir gehen davon aus, dass diese Herabregulation vasokonstriktorisches Rezeptoren für die vaskuläre Hyporeaktivität gegenüber Vasokonstriktoren während Sepsis mitverantwortlich ist und möglicherweise eine wichtige Rolle in der Pathogenese des septischen Kreislaufversagens

spielt. Aufgrund welcher Mechanismen die verschiedenen Rezeptoren im Einzelnen unter septischen Bedingungen herunterreguliert werden und ob und wie diese verminderte Expression der vasokonstriktorisches Rezeptoren in der Zellkultur oder am intakten Organismus verhindert werden kann, bedarf weiterer Untersuchungen.

Summary: The diminished vasoconstrictive activity of norepinephrine, angiotensin II or vasopressin directed our interest towards the regulation of the receptors for vasoconstrictors during the conditions of experimental endotoxaemia in vivo and in vitro.

Male Sprague-Dawley rats were injected with lipopolysaccharide (10 mg/kg) i.v. to induce endotoxaemia and systolic blood pressure was measured each hour. The animals were sacrificed after 6, 12 or 24 hours and organs were removed. Gene expression of vasoconstrictive receptors such as angiotensin II type 1-(AT₁)-receptors, vasopressin V_{1A}-receptors and α_1 -adrenergic receptors were determined with specific RNase-protection-assay. Tissue-concentrations of the proinflammatory cytokines IL-1 β and TNF- α and of catecholamines were measured using ELISA or HPLC, respectively. Plasma-renin-activity, plasma-angiotensin II- und plasma-alldosterone-concentrations were determined with RIA. In addition, blood-pressure-dose-response studies with angiotensin II and a selective V₁-receptor-agonist were carried out after induction of experimental endotoxaemia compared to vehicle-injected rats. Rat renal mesangial cells and aortal vascular smooth muscle cells (cell line A7r5) were incubated with proinflammatory cytokines and NO-donators and gene and protein expression of vasoconstrictive receptors were determined using RNase-protection-assay and radioligand-binding studies, respectively.

Endotoxaemia was associated with arterial hypotension and tachycardia with diminished blood-pressure response to angiotensin II and a selective V₁-receptor-agonist. Plasma-renin-activity and plasma-angiotensin II-concentration were markedly elevated whereas plasma-alldosterone-concentrations were unchanged. Concomitantly, we found a systemic downregulation of AT₁-, V_{1A}- and α_1 -receptors during experimental endotoxaemia. In vitro, we found downregulation of vasoconstrictive receptors by TNF- α , IL-1 β and IFN- γ and, to some extent, by NO as well.

Our data demonstrate a systemic downregulation of vasoconstrictive receptors during experimental endotoxaemia, which may possibly be mediated by proinflammatory cytokines and to some extent by NO. We assume that the downregulation of vasoconstrictive receptors accounts for the vascular hyporeactivity to vasoconstrictors during sepsis and

possibly plays a central role in the pathogenesis of septic vascular failure. In order to identify the mechanisms causing downregulation of vasoconstrictive receptors during septic conditions, and to find out whether and how the downregulation can be prevented, further investigations are required.

Einleitung

Die Inzidenz von Sepsis und septischem Schock ist in den letzten 50 Jahren gestiegen. In den USA erkrankten im Jahr 1995 751.000 Menschen an einer schweren Sepsis, und die Kosten der Behandlung beliefen sich auf mehr als 16 Milliarden US-Dollar [1]. Trotz bemerkenswerter intensivmedizinischer Fortschritte zählen Sepsis und septisches Kreislaufversagen zu den häufigsten Todesursachen auf Intensivstationen und sind die Haupttodesursache auf nicht-kardiologischen Intensivstationen [1 - 3]. Auffallend ist der sprunghafte Anstieg der Mortalität von 20% bei einer schweren Sepsis auf nahezu 50% beim septischen Kreislaufversagen [2,3]. Gleichzeitig kommt es auch zu einem dramatischen Anstieg der Inzidenz von akutem Lungenversagen oder akutem Nierenversagen beim Eintreten eines Schockgeschehens [2].

Kennzeichnend für die Pathophysiologie des septischen Schocks ist eine systemische Vasodilatation mit arterieller Hypotension, die zur Minderperfusion der Organe und konsekutiv oft zum Multiorganversagen führt [4,5]. Hierbei korreliert das Ausmaß der arteriellen Hypotension mit dem Ausmaß des Multiorganversagens und dieses wiederum mit der Mortalitätsrate [6]. Das therapeutische Ziel mit höchster Priorität ist daher die Erhöhung des Perfusionsdruckes. Das etablierte therapeutische Regime besteht in einer aggressiven, adäquaten Volumensubstitution in Kombination mit der Verabreichung von Katecholaminen [3]. Die vasokonstriktorische Wirksamkeit von Katecholaminen ist jedoch während Sepsis deutlich eingeschränkt [7 - 9]. Darüber hinaus ist auch die Blutdruckantwort gegenüber Angiotensin II und Vasopressin während Sepsis reduziert [8, 10, 11]. Der Mechanismus dieser vaskulären Hyporeaktivität auf Vasokonstriktoren, auch Vasoplegie genannt, ist derzeit nicht schlüssig aufgeklärt.

Aufgrund der enormen und weit verbreiteten Induktion der Stickstoffmonoxid-(NO)-Synthasen-Isoform II (NOS II) mit entsprechender Bildung großer Mengen von NO in nahezu allen Organen wurde dieses vasodilatorische Molekül für das septische Kreislaufversagen verantwortlich gemacht [4, 5]. Diese Hypothese wird durch Befunde unterstützt, die eine Prophylaxe des septischen Kreislaufversagens durch selektive NOS II- [12 - 15] und unselektive NOS-Hemmung [16-19] belegen. Die unselektive NOS-Hemmung war jedoch mit schwerwiegenden Nebenwirkungen verbunden wie Nierenfunktionsstörungen [20], höheren Konzentrationen von Bakterien und Zytokinen in Plasma und Gewebe [21], und beschleunigtem und ausgeprägterem Blutdruckabfall [19]. Zudem führte sie zu keiner Verbesserung [16, 22] oder gar einer Verschlechterung [21] des Überlebens während experimenteller Sepsis, möglicherweise wegen der nachteiligen Effekte einer Hemmung der NO-Produktion auf die

Schlüsselwörter: Zytokine – Stickstoffmonoxid – Blutdruck, Katecholamine – Vasopressin – Angiotensin

Keywords: Cytokines – Nitric Oxide – Blood Pressure – Catecholamines – Vasopressin – Angiotensin.

Mikrozirkulation. Eine kürzlich begonnene multizentrische Studie mit einem unselektiven NOS-Inhibitor bei septischen Patienten wurde durch das Safety-Committee wegen Nebenwirkungen gestoppt. Weitere Studien mit NOS-Inhibitoren zeigten nur eine leichte Besserung der arteriellen Hypotension und vaskulären Hyporeaktivität [23 - 26]. Dies weist darauf hin, dass andere oder zusätzliche Mechanismen in die Pathogenese des septischen Kreislaufversagens involviert sind.

Neben einer erhöhten Aktivität vasodilatierender Systeme wäre auch eine eingeschränkte vasokonstriktorische Aktivität während Sepsis denkbar. Angiotensin II zählt zu den stärksten endogenen Vasokonstriktoren und vermittelt seine vasopressorische Wirkung über Angiotensin II Typ 1 – (AT_1) – Rezeptoren, wobei an der Ratte zwei Rezeptor-Subtypen, AT_{1A} und AT_{1B} , identifiziert wurden [27]. Norepinephrin vermittelt Vasokonstriktion über α_1 -adrenerge Rezeptoren, wovon mehrere Subtypen (α_{1A} , α_{1B} , α_{1D}) charakterisiert wurden [28]. Funktionelle Untersuchungen an Ratten deuten darauf hin, dass die α_{1A} - und α_{1D} -Adrenozeptor-Subtypen die größeren Gefäße regulieren, während α_{1B} -Adrenozeptoren den Tonus der kleinen Widerstandsgefäße regulieren [28]. Vasopressin wirkt über den Vasopressin-Rezeptor-subtyp V_{1A} blutdrucksteigernd [29]. Eine systemisch verminderte Expression dieser vasokonstriktorischen Rezeptoren könnte die vaskuläre Hyporeaktivität gegenüber den entsprechenden Agonisten erklären und so das septische Kreislaufversagen mit bedingen. Wir haben deshalb die Regulation der Rezeptoren, welche die biologische Wirkung von Angiotensin II, Norepinephrin und Vasopressin vermitteln, unter den Bedingungen einer experimentellen Endotoxämie in vivo und in vitro untersucht.

Methodik

Experimentelle Endotoxämie

Nach Genehmigung der Tierschutzkommission wurde männlichen Sprague-Dawley Ratten ($n = 6$) Vehikel (NaCl 0.9%, 2 ml) oder LPS (Escherichia coli, Sigma, 10 mg/kg) i.v. verabreicht. Nach 6, 12 und 24 Stunden wurden die Tiere zur Organentnahme dekapitiert. Die entnommenen Organe sowie das gewonnene Plasma wurden schockgefroren und bei -80°C gelagert [30 - 32].

Nicht-invasive Blutdruckmessung

Der systolische Blutdruck wurde in stündlichen Intervallen anhand der Tail-Cuff-Methode bestimmt (TSE Blood Pressure Monitor Typ 9000) [33].

Blutdruck-Dosis-Wirkungsversuche

Ratten ($n = 6$) wurden mit Vehikel bzw. LPS injiziert und nach 6 bzw. 12 Stunden mit Sevofluran narkotisiert und beat-

met. Der arterielle Mitteldruck wurde über eine Kanüle in der linken A. carotis gemessen (Sirecust 9000, Siemens). Bolusdosen von Angiotensin II (Sigma, 0.0125 bis 0.5 µg/kg) bzw. Phe², Ile³, Orn⁸-Vasopressin (Bachem, 10 bis 300 pmol/kg), einem selektiven V₁-Rezeptor-Agonisten, wurden i.v. verabreicht, und die Änderung des arteriellen Blutdrucks wurde gemessen. Um die Änderung des arteriellen Blutdrucks zu imitieren, wurde Vehikel-injizierten Tieren zusätzlich der NO-Donor Nitroprussidnatrium (SNP, nipruss®, Schwarz Pharma, ~10 µg/kg/min) akut i.v. verabreicht und die Blutdruckänderung nach Injektion von Angiotensin II aufgezeichnet [30, 31].

Zellkultur

Für die Experimente wurden aortale glatte Gefäßmuskulzellen (Zelllinie A7r5, ATCC) und renale Mesangialzellen der Ratte (Primärkultur und Zelllinie, Passage 18 - 23, vom Institut für Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt am Main (Direktor: Prof. Dr. J. Pfeilschifter)) verwendet.

Um den Einfluss von Zytokinen und von NO auf die Rezeptorexpression zu untersuchen, wurden die Zellen für 8 bis 12 Stunden mit

1. Medium (Kontrolle),
2. Interleukin-1β (IL-1β, 50 ng/ml, Sigma),
3. Tumor-Nekrose-Faktor-α (TNF-α, 10-100 ng/ml, R&D Systems),
4. Interferon-γ (IFN-γ, 500 U/ml, (GIBCO BRL),
5. einem Gemisch aus diesen Zytokinen,
6. einem Gemisch aus diesen Zytokinen mit dem NOS-Inhibitor N^o-Nitro-L-Arginin-Methyl-Ester (L-NAME, 1 - 5 mmol/l, Sigma) oder
7. dem NO-Donator SNAP (500 µmol/l, Sigma) inkubiert [30 - 32].

RNA-Analytik

Gesamt-RNA wurde aus Zellen bzw. tiefgefrorenen Organen nach Standardprotokollen gewonnen und bei -80°C gelagert. Zur Bestimmung der relativen Mengen an V_{1A}, α_{1A}, α_{1B}, und α_{1D}-mRNA mittels RNase-Protection-Assay wurden die entsprechenden radioaktiv markierten Antisense-RNA-Proben wie folgt hergestellt. Mittels RT-PCR wurde jeweils ein V_{1A}, α_{1A}, α_{1B}, und α_{1D}-cDNA-Fragment amplifiziert. Die Primer wurden so gewählt, dass die amplifizierten Fragmente der Rezeptorsubtypen möglichst wenig Homologie mit den anderen Subtypen aufwiesen. Die so gewonnenen cDNA-Fragmente wurden in den pCR®-TOPOII-Vektor (V_{1A}-Rezeptor; Invitrogen) bzw. pSP73-Vektor (α₁-Rezeptoren; Promega) kloniert und die Vektoren linearisiert. Die Identität der Konstrukte wurde durch Sequenzierung (Fa. SequiServe) überprüft. Die Gensonden des Referenzgens β-actin sowie für NOS II und AT-Rezeptoren wurden vom Lehrstuhl für Physiologie der Universität Regensburg (Direktor: Prof. Dr. A. Kurtz) zur Verfügung gestellt. Nach in vitro Transkription mit SP6-RNA-Polymerase, bei der eines der zugegebenen Nukleotide ³²P enthält, erhält man die entsprechenden radioaktiv markierten Antisense-RNA-Fragmente zur Durchführung des RNase-Protection-Assay. Dieser wurde wie beschrieben durchgeführt [30 - 32]. Isolierte Gesamt-RNA wurde mit den radioaktiv markierten Antisense-RNA-Fragmenten hybridisiert und einem RNase- und Protease-Verdau unterzogen. Nach

Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanolgefällung wurden die geschützten RNA-Fragmente elektrophoretisch im Acrylamidgel aufgetrennt. Die Quantifizierung der spezifischen Banden erfolgte mit einem Phosphorimager. Dabei wurde das Signal für NOS II-, AT_{1A}-, AT_{1B}-, V_{1A}-, α_{1A}-, α_{1B}-, und α_{1D}-mRNA auf das Signal für das Referenzgen β-actin derselben RNA-Präparation bezogen.

Radioligand-Bindungsstudien

Zur Bestimmung der AT₁-Rezeptordichte in der Leber wurden hepatische Plasmamembranen aus der Gesamtleber isoliert. 100 µg Gesamtprotein davon wurden bei 37°C für 20 Minuten mit 50 oder 500 pmol/l ¹²⁵I-Angiotensin II (2000 Ci/mmol, Amersham) in Inkubationspuffer mit oder ohne unmarkiertem Angiotensin II (1 µmol/l zur Bestimmung der unspezifischen Bindung) inkubiert. Danach wurden 4 ml eiskalter Inkubationspuffer zugegeben und der Ansatz über Glasfaserfilter (GF/B, Whatman) abgesaugt. Die Filter wurden dreimal mit eiskaltem Inkubationspuffer gewaschen, und die Filter-gebundene Radioaktivität wurde mittels eines γ-Zählers gemessen und auf das eingesetzte Gesamtprotein bezogen.

Zur Bestimmung der AT₁-, V_{1A}- bzw. α₁-Rezeptordichte auf intakten Zellen wurden diese in 24-Well-Zellkulturplatten kultiviert, wie oben beschrieben inkubiert, dreimal mit eiskalter PBS gewaschen und für 15 Minuten bei 37°C mit 10 oder 100 pmol/l ¹²⁵I-Angiotensin II in Inkubationspuffer mit oder ohne unmarkiertem Angiotensin II (1 µmol/l zur Bestimmung der unspezifischen Bindung) inkubiert. Dann wurden die Zellen erneut dreimal mit eiskalter PBS gewaschen und mit 1 N NaOH lysiert. Die Radioaktivität wurde mittels eines γ-Zählers gemessen. Alle Bindungsdaten wurden auf den totalen zellulären Proteingehalt bezogen. Analog wurden die Bindungsstudien für V₁-Rezeptoren mit 100 pmol/l oder 1 nmol/l ¹²⁵I-Vasopressin (2000 Ci/mmol, Amersham) mit oder ohne unmarkiertem Vasopressin (10 µmol/l zur Bestimmung der unspezifischen Bindung) durchgeführt. Für α₁-Rezeptoren wurde 0.5 nmol/l ³H-Prazosin (80 Ci/mmol, Amersham) mit verschiedenen Konzentrationen unmarkiertem Prazosin (0, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 100 und 1000 nmol/l zur Bestimmung der unspezifischen Bindung) eingesetzt und die Radioaktivität mittels eines β-Zählers (LSC) gezählt. Die Rezeptor-Affinität (Dissoziationskonstante K_D) und die maximale Bindungskapazität (B_{max}) für ³H-Prazosin wurden anhand einer Scatchard-Analyse ermittelt [30 - 32].

ELISA, RIA und HPLC

Die Konzentrationen von IL-1β und TNF-α wurden mittels ELISA (R&D Systems), die Konzentrationen von Katecholaminen mittels HPLC und die Plasma-Renin-Aktivität, die Plasma-Angiotensin II- und Plasma-Aldosteron-Konzentration mittels RIA bestimmt.

Statistik

ANOVA mit Mehrfachvergleichen und *t*-Test mit Bonferroni-Anpassung wurden für die Vergleiche zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen durchgeführt. Ein Wert von *p* < 0.05 wurde als signifikant betrachtet.

Tabelle 1: Herzfrequenz (HF) und systolischer Blutdruck (BP_{sys}) nach LPS.

	0 h	3 h	12 h	24 h
HF (min ⁻¹)	362 ± 12	435 ± 18*	505 ± 16*	414 ± 13*
BP _{sys} (mmHg)	126 ± 6	87 ± 4*	69 ± 5*	105 ± 8*

Mittelwert ± SE, n = 6, *p < 0.05 vs. 0 h, modifiziert nach (33).

Ergebnisse

Die hämodynamischen Veränderungen nach LPS-Injektion sind in Tabelle 1 aufgelistet. Blutdruck und Herzfrequenz blieben in der Kontrollgruppe stabil. Die Injektion von LPS führte zu einem Abfall des arteriellen Blutdruckes und einem Anstieg der Herzfrequenz 3, 12 und 24 Stunden nach Gabe.

Konzentration von Zytokinen im Gewebe

Injektion von LPS bewirkte eine Erhöhung der Konzentrationen von IL-1 β und TNF- α in Leber und Lunge, während es in der Niere nur zu einer mäßigen Induktion kam (Abb. 1).

Konzentration von Katecholaminen im Gewebe

In Niere und Leber war die Norepinephrin-Konzentration nach LPS-Injektion unverändert (Tab. 2). In der Lunge war die Norepinephrin-Konzentration nach LPS-Injektion vermindert. Epinephrin und Dopamin waren in Lunge und Leber an der Grenze der Nachweisbarkeit. In der Niere kam es zu einer Erhöhung von Epinephrin von < 1.5 ng/g auf 5 - 10 ng/g nach LPS-Injektion, während die Dopamin-Konzentrationen unverändert waren.

Aktivität des systemischen Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems

Die Plasma-Renin-Aktivität stieg 12 Stunden nach LPS-Injektion auf den 13fachen Wert an und war nach 24 Stunden noch 4,5fach erhöht. Die Plasma-Angiotensin-II-Konzentration war nach Induktion der experimentellen Endotoxämie parallel zur Plasma-Renin-Aktivität erhöht. Im Gegensatz dazu war die Plasma-Aldosteron-Konzentration unverändert im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 2).

Blutdruck-Dosis-Wirkung von Angiotensin II

Der MAP anästhesierter Ratten lag bei ca. 112 mmHg. Bolus-Injektionen von Angiotensin II (0.0125 bis 0.5 μ g/kg) führten zu einer Dosis-abhängigen Blutdruckerhöhung um

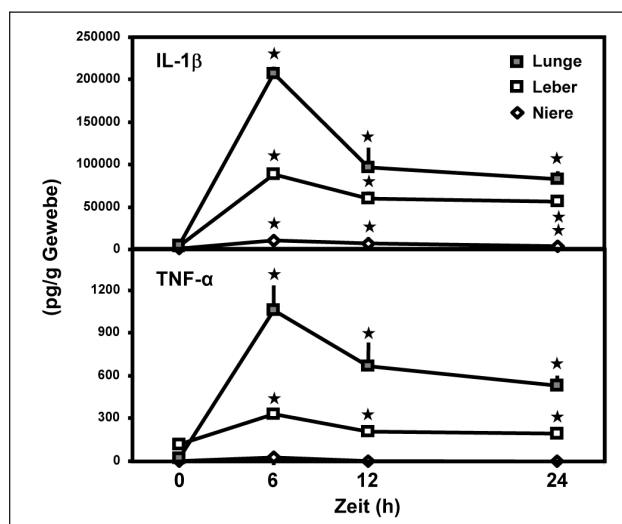


Abbildung 1: Gewebe-Konzentrationen von IL-1 β und TNF- α nach Injektion von LPS (10 mg/kg). Die Werte wurden auf das Gewebegewicht bezogen. Mittelwert ± SE, n = 6, *p < 0.05 vs. Kontrolle; modifiziert nach (32).

57 mmHg nach Injektion von 0.5 μ g/kg Angiotensin II. 12 Stunden nach Injektion von LPS lag der MAP bei ca. 60 mmHg, wobei Vehikel-injizierte Ratten normotensiv blieben. Die Blutdruckantwort auf Angiotensin II war bei LPS-injizierten Ratten deutlich vermindert im Vergleich zu Kontrolltieren. Injektion von 0.5 μ g/kg Angiotensin II führte bei endotoxämischen Ratten nur zu einer Erhöhung des MAP um ca. 14 mmHg im Vergleich zu einer Blutdrucksteigerung um 57 mmHg bei nicht-endotoxämischen Ratten. Wir initiierten die LPS-induzierte arterielle Hypotension durch eine akute Infusion des NO-Donors SNP bei nicht-endotoxämischen anästhesierten Ratten und senkten den MAP auf vergleichbare Werte wie nach LPS-Injektion. Die Blutdruckwirkung von Angiotensin II war bei diesen Tieren uneingeschränkt im Vergleich zu Vehikel-injizierten Ratten erhalten (Abb. 3).

Tabelle 2: Konzentration von Katecholaminen nach LPS.

ng/g Feuchtgewicht	NE	Niere E	DA	NE	Leber ¹⁾ E	Lunge ^{1,2)} NE
0 h	177 ± 20	< 1.5 ²⁾	5.0 ± 0.6	61 ± 13	< 1.5 ²⁾	59 ± 7.1
6 h	187 ± 23	10.3 ± 1.8	7.9 ± 1.7	51 ± 12	2.7 ± 0.43	29 ± 3.8*
12 h	214 ± 31	5.0 ± 1.0	7.0 ± 1.3	63 ± 10	2.1 ± 0.70	28 ± 2.3*
24 h	225 ± 12	4.7 ± 1.1	4.5 ± 1.3	75 ± 11	1.6 ± 0.51	35 ± 2.7*

NE, Norepinephrin; E, Epinephrin; DA, Dopamin; Mittelwert ± SE, n = 6, *p < 0.05 vs. 0 h; ¹⁾ Dopamin-Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze von 2 ng/g;

²⁾ Epinephrin-Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze von 1.5 ng/g; modifiziert nach (32).

Genexpression von AT₁-Rezeptoren und NOS II in vivo

Nach LPS-Injektion war die Genexpression beider AT₁-Rezeptor-Subtypen in der Nebenniere über 24 Stunden vermindert. Gleichzeitig kam es zu einer Steigerung der NOS-II-Genexpression (Abb. 4). Die durch LPS verminderte AT₁-Rezeptor-Genexpression in der Leber konnte auf Proteinebene durch eine verminderte Bindung von ¹²⁵I-Angiotensin II bestätigt werden (Abb. 5). NOS II-mRNA war in der Leber basal unter der Nachweisgrenze und 12 und 24 Stunden nach LPS-Injektion induziert. In Lunge und Herz war AT_{1A}-mRNA 6 Stunden nach Injektion auf 36 bzw. 24% der Kontrolle vermindert und AT_{1B}-mRNA auf 33 bzw. 16% der Kontrolle reduziert. Nach 24 Stunden waren in Lunge und Herz wieder Kontrollwerte erreicht. LPS-Injektion führte nach 12 Stunden zu einer Stimulation der NOS II-Genexpression in Lunge und Herz und es wurden erneut Kontrollwerte 24 Stunden nach LPS-Injektion erreicht.

Expression von AT₁-Rezeptoren in vitro

Nach einer 12-stündigen Inkubation von primären Mesangialzellen mit einer Kombination aus den Zytokinen (IL-1β 50 ng/ml, TNF-α 100 ng/ml, und IFN-γ 500 U/ml) war die Expression von AT₁-Rezeptor-mRNA in Mesangialzellen auf unter 1% des Kontrollwertes und die ¹²⁵I-Angiotensin II-Bindung auf 10% des Kontrollwertes vermindert (Abb. 6). Inkubation der Zellen mit dem NO-Donor SNAP (500 μmol/l) verminderte ebenfalls die AT₁-Rezeptor-Expression. Die Hemmung der endogenen NO-Bildung durch L-NAME (5 mmol/l) schwächte die Zytokin-induzierte Verminderung der AT₁-Rezeptor-Expression ab.

Genexpression von α₁-Rezeptoren in vivo

In Herz, Aorta und Lunge waren alle drei α₁-Rezeptor-Subtypen nach der Injektion von LPS vermindert exprimiert. Auch in Niere, Nebenniere und Leber waren die unter normalen Bedingungen stark exprimierten Rezeptor-Subtypen, wie α_{1A} und α_{1B} in der Niere, α_{1B} und α_{1D} in der Nebenniere und α_{1B} in der Leber, während Endotoxämie vermindert exprimiert (Abb. 7).

Expression von α₁-Rezeptoren in vitro

Inkubation von Mesangialzellen (Passage 18 - 23) mit IL-1β (50 ng/ml) und/oder TNF-α (10 ng/ml) für 10 Stunden verminderte die α_{1B}-Rezeptor-Genexpression. Die B_{max}-Werte der ³H-Prazosin-Bindung an Mesangialzellen waren nach Inkubation mit den Zytokinen ebenfalls vermindert, während die Rezeptor-Affinität (K_D) der ³H-Prazosin-Bindung nicht beeinflusst war. Die Hemmung der NO-Synthese durch Koinkubation der Zellen mit den Zytokinen (IL-1β + TNF-α) und L-NAME (5 mmol/l) führte zu keiner Änderung der Zytokin-induzierten Verminderung der α_{1B}-Rezeptor-mRNA oder der ³H-Prazosin-Bindung. Inkubation von Mesangialzellen mit dem NO-Donor SNAP (500 μmol/l) beeinflusste die α_{1B}-Rezeptor-Expression nicht (Abb. 8 und Tab. 3).

Genexpression von V_{1A}-Rezeptoren in vivo

In der Leber führte LPS-Injektion zu einer starken und lang anhaltenden Verminderung der V_{1A}-Genexpression (Abb. 9). In Lunge, Niere und Herz war V_{1A}-mRNA 6 Stunden nach Induktion einer experimentellen Endotoxämie auf 31%,

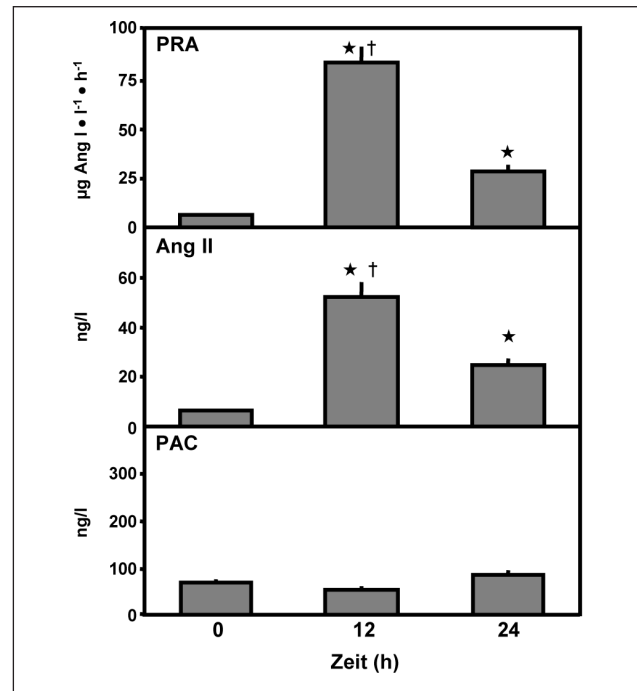


Abbildung 2: Renin-Aktivität (PRA), Angiotensin-II-Konzentration (Ang II) und Aldosteron-Konzentration (PAC) im Plasma nach Injektion von LPS (10 mg/kg). Mittelwert ± SE, n = 6, *p < 0.05 vs. 0 h, *p < 0.05 vs. 24 h; modifiziert nach (30).

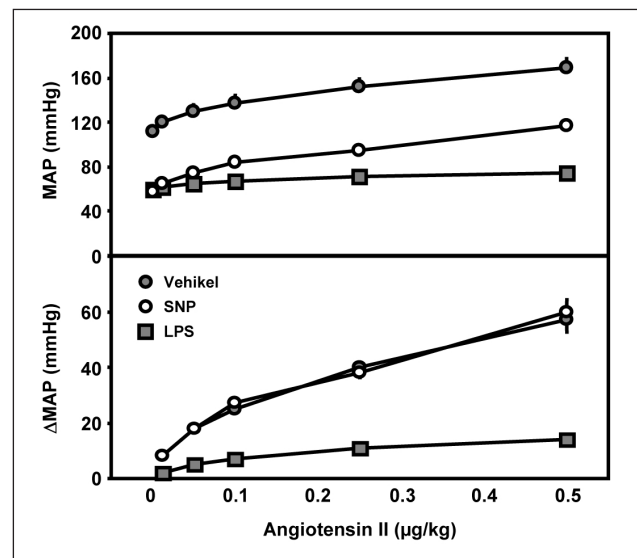


Abbildung 3: Blutdruck-Dosis-Wirkung von Angiotensin II nach Injektion von LPS (10 mg/kg), Vehikel oder während SNP-Infusion. Die Absolutwerte des MAP und die Änderung des MAP (ΔMAP) derselben Experimente sind als Mittelwert ± SE von 6 Tieren pro Gruppe 12 Stunden nach Injektion LPS oder Vehikel angegeben. *p < 0.05 vs. Vehikel oder SNP; modifiziert nach (30).

75% und 84% des Kontrollwertes vermindert. In Lunge und Herz war die V_{1A}-Rezeptor-Genexpression auch nach 12 und 24 Stunden vermindert, während in der Niere bereits wieder Ausgangswerte erreicht worden waren.

Expression von V_{1A}-Rezeptoren in vitro

Inkubation von aortalen glatten Gefäßmuskulzellen der Ratte (Zelllinie A7r5) mit IL-1β (50 ng/ml), TNF-α (100

ng/ml) oder IFN- γ (500 U/ml) für 8 Stunden führte zu einer Verminderung der V_{1A} -mRNA. Parallel kam es zu einer Reduktion der spezifischen 125 J-Vasopressin-Bindung an den Zellen. Eine Hemmung der NO-Synthese durch Koinkubation der Zytokine mit L-NAME (1 mmol/l) beeinflusste die zytokininduzierte Verminderung der V_{1A} -Expression nicht. Entsprechend kam es nach Inkubation der Zellen mit dem NO-Donor SNAP (500 μ mol/l) zu keiner Änderung der V_{1A} -Expression (Abb. 10).

Blutdruck-Dosis-Wirkung von Phe², Ile³, Orn⁸-Vasopressin
Bolus-Injektionen des selektiven V_1 -Rezeptoragonisten Phe², Ile³, Orn⁸-Vasopressin (10 bis 300 pmol/kg) resultierten in einem Dosis-abhängigen Anstieg des MAP um 70 mmHg nach Injektion von 300 pmol/kg Phe², Ile³, Orn⁸-Vasopressin (Abb. 11). 6 Stunden nach LPS-Injektion war die Blutdruckwirkung von Phe², Ile³, Orn⁸-Vasopressin mit einem MAP-Anstieg von 47 mmHg nach Injektion von 300 pmol/kg Phe², Ile³, Orn⁸-Vasopressin deutlich reduziert.

Diskussion

Mehrere In-vivo- und In-vitro-Studien zeigen eine verminderte Blutdruckwirksamkeit von Vasopressin und Angiotensin II während experimenteller Sepsis [8, 10, 11, 34]. Die eingeschränkte Blutdruckwirksamkeit von Norepinephrin während Sepsis und septischen Schocks ist klinisch evident und in Tierversuchen belegt [7 - 9, 34, 35]. Trotz der pathophysiologischen Signifikanz hinsichtlich des Kreislaufversagens während Sepsis sind die Faktoren unbekannt, die für die vaskuläre Hyporeaktivität von Vasokonstriktoren wie Angiotensin II, Vasopressin und Norepinephrin verantwortlich sind. Ziel unserer Studien war es, mögliche Ursachen der verminderten biologischen Wirksamkeit dieser Vasokonstriktoren während Sepsis aufzudecken.

In unserem Tiermodell der experimentellen Endotoxämie kam es in Übereinstimmung mit der Literatur [5] zu einer erhöhten Bildung und Freisetzung von Zytokinen, einer starken Stimulation der NOS-II-Expression in verschiedenen Organen und zu einem Kreislaufversagen mit arterieller Hypotension und Tachykardie [30, 32, 33].

Übereinstimmend mit Befunden aus der Literatur [8, 36 - 38] war in unserem Tiermodell das systemische Renin-Angiotensin-System aktiviert [30]. Gleichzeitig lag eine arterielle Hypotension mit verminderter Blutdruckwirksamkeit von Angiotensin II vor. Die Plasma-Aldosteron-Konzentration war trotz erhöhter Konzentrationen von Angiotensin II unverändert. Angesichts der starken NOS-II-Induktion während Sepsis schien es plausibel, dass die abgeschwächte Blutdruckwirksamkeit von Angiotensin II während Sepsis durch die massive Überproduktion von NO bedingt sein könnte. Diese Hypothese erscheint jedoch wenig wahrscheinlich, da die Imitierung der LPS-induzierten arteriellen Hypotension durch akute Infusion des NO-Donors SNP bei nicht-endotoxämischen Ratten mit keiner Einschränkung der vaskulären Reaktivität gegenüber Angiotensin II verbunden war. Dies deutet darauf hin, dass die vaskuläre Hyporeaktivität gegenüber Angiotensin II während Sepsis nicht in erster Linie auf eine NO-vermittelte Vasodilatation

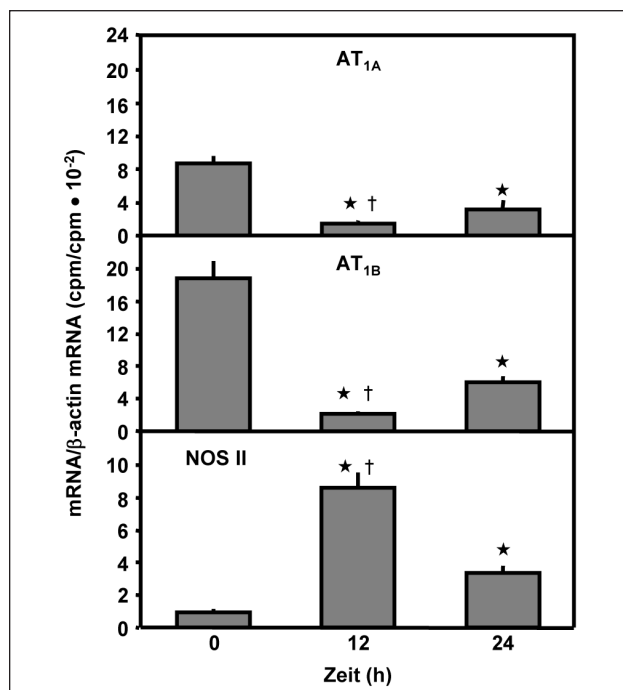


Abbildung 4: AT_{1A}-Rezeptor-, AT_{1B}-Rezeptor- und NOS II-mRNA in der Nebenniere nach Injektion von LPS (10 mg/kg) bezogen auf das Signal des Referenzgens β -actin derselben RNA-Präparation. Mittelwert \pm SE, n = 6, *p < 0.05 vs. 0 h, *p < 0.05 vs. 24 h; modifiziert nach [30].

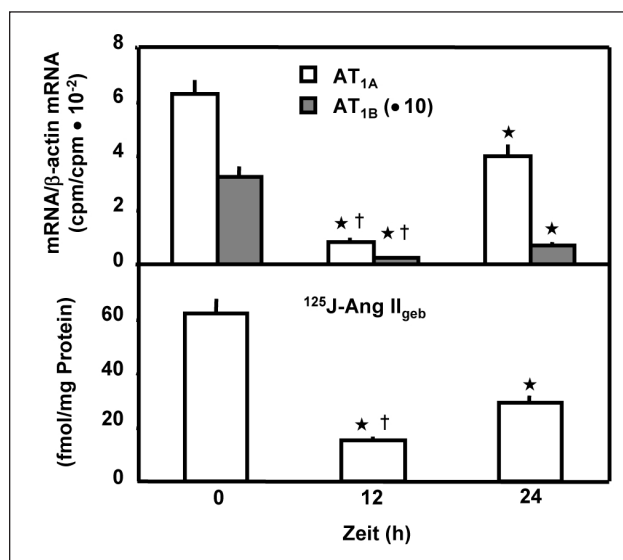


Abbildung 5: AT₁-Rezeptor-mRNA und 125 J-Angiotensin II-Bindung in der Leber nach Injektion von LPS (10 mg/kg). Die mRNA-Daten wurden auf das Signal des Referenzgens β -actin derselben RNA-Präparation bezogen. Die Bindungsdaten wurden mit 500 pmol/l 125 J-Angiotensin II erhoben und auf das Gesamt-Protein bezogen. Mittelwert \pm SE, n = 6, *p < 0.05 vs. 0 h, *p < 0.05 vs. 24 h; modifiziert nach [30].

zurückzuführen ist. Wir fanden eine während Sepsis systemisch verminderte AT₁-Rezeptor-Expression, welche für die abgeschwächte Wirkung von Angiotensin II auf den Blutdruck und die Aldosteronsekretion verantwortlich sein könnte [30]. Dieses Ergebnis erklärt möglicherweise Befunde, die indirekt auf eine Involvierung von Angiotensin-II-Rezeptoren in die Pathogenese des septischen Kreislaufversagens hinweisen. So konnte an Ratten gezeigt werden,

Führungskompetenz Anästhesie

Zertifiziert durch Berufsverband Deutscher Anästhesisten (BDA)
Deutsche Gesellschaft für Anästhesiologie und Intensivmedizin (DGAI) und Managementzentrum St. Gallen

In den letzten Jahren sind die Anforderungen an Führungskräfte in Krankenhäusern kontinuierlich gestiegen. Ärzte mit Führungsaufgaben sehen sich mit steigenden Erwartungen sowie neuen Systemen und Konzepten für die Personalarbeit konfrontiert. Um den aktuellen und zukünftigen Anforderungen und Erwartungen gerecht zu werden, brauchen Führungskräfte bestmögliche Kompetenzen.

Mit dieser Veranstaltung für Anästhesisten bieten Berufsverband Deutscher Anästhesisten und Deutsche Gesellschaft für Anästhesiologie und Intensivmedizin in Zusammenarbeit mit dem Management Zentrum St. Gallen eine fokussierte, qualitativ hochwertige und praxisbezogene Fortbildung für Führungskräfte und -nachwuchs in der Anästhesie an.

Modul 1:	22 – 23.10.2004	Wirksames Management
Modul 2:	14. – 15.01.2005	Führen von Mitarbeitern
Modul 3:	04. – 05.03.2005	Management von Veränderungen
Modul 4:	22. – 23.04.2005	Management von Konflikten.

Zielgruppe: Diese Managementseminare richten sich besonders an Ärzte/innen in leitenden Positionen, die neue Managementmethoden im Anästhesiebereich umsetzen wollen, sowie an Fachkräfte bzw. Führungsnachwuchs mit zukünftigen Managementaufgaben in Gesundheitseinrichtungen.

Teilnehmerzahl: max. 16 Personen

Anmeldungen ab sofort unter www.bda.de oder siehe Anschrift unten

Veranstaltungsort: Nürnberg (alle 4 Module)

Kosten: 2.760,- € pro Teilnehmer (inkl. Mittagessen, Tagungsgetränken, Teilnahmeunterlagen)
2.980,- € für Nicht-Mitglieder BDA / DGAI

Fortbildung zum OP-Manager / zur OP-Managerin

Zertifiziert durch Berufsverband Deutscher Anästhesisten (BDA)
Deutsche Gesellschaft für Anästhesiologie und Intensivmedizin (DGAI) und Managementzentrum St. Gallen

Krankenhäuser und medizinische Abteilungen stehen in Zukunft unter steigendem Qualitäts- und Kostendruck. Insbesondere in den personal- und kostenintensiven Bereichen werden demnächst Ressourcen und Kernprozesse einer kritischen Analyse unterzogen und professionelle Managementstrukturen und -strategien zunehmend von den Akteuren eingefordert.

Erfahrungen zeigen dabei, dass die verbesserte Nutzung der Ressource OP einen der entscheidenden Standortvorteile für Krankenhäuser in der Zukunft darstellen wird. Professionelles OP-Management ist daher erforderlich, um diesen Bereich zu planen, zu entwickeln, zu steuern und letztlich profitabel zu gestalten.

Der Berufsverband Deutscher Anästhesisten und die Deutsche Gesellschaft für Anästhesiologie und Intensivmedizin werden Sie in Zusammenarbeit mit dem Managementzentrum St. Gallen in fünf Ausbildungsmodulen auf diese Aufgabe vorbereiten.

Modul 1:	08. – 09.12.2004	Zieldefinitionen, OP-Statut
Modul 2:	10. – 11.12.2004	Prozessorientierung im OP-Management
Modul 3:	30. – 31.03.2005	Controlling / Reporting im OP-Management, Ambulantes Operieren
Modul 4:	01. – 02.04.2005	Methoden zur Steuerung / Kennzahlssysteme
Modul 5:	03. – 04.06.2005	Team und Konflikt.

In kleinen Gruppen werden Sie diese Themen aktiv erarbeiten und Ihre individuellen Erfahrungen im Plenum spiegeln können. Unterstützt werden Sie dabei von einem professionellen Managementcoach und einem erfahrenen Praktiker aus dem Krankenhaus.

Zielgruppe: Diese Fortbildung richtet sich an Ärzte/innen, die aktiv das OP-Management vor Ort betreiben, diese Aufgabe übernehmen oder aufgrund ihrer Position die Belange des OP-Managements in Zukunft mitgestalten werden.

Teilnehmerzahl: max. 18 Personen

Anmeldungen ab sofort unter www.bda.de oder siehe Anschrift unten

Veranstaltungsort: Nürnberg (alle 5 Module)

Kosten: 3.450,- € pro Teilnehmer (inkl. Mittagessen, Tagungsgetränken, Teilnahmeunterlagen)
3.800,- € für Nicht-Mitglieder BDA / DGAI

Weitere Informationen und Anmeldung:

Referat für Krankenhausmanagement und -ökonomie BDA / DGAI

Dr. A. Schleppers · Sossenheimer Weg 19 · D-65843 Sulzbach · Tel.: 06196 / 580441 · Fax.: 06196 / 580442 · www.bda.de

dass die initiale Vasodilatation nach LPS-Infusion durch Angiotensin II aufgehoben werden konnte, während der vasopressorische Effekt von Angiotensin II ab 2 Stunden nach Beginn der LPS-Infusion vermindert war [39].

Während experimenteller Endotoxämie kam es auch zu einer systemischen Verminderung der α_1 -Rezeptor-Genexpression [32]. Diese Ergebnisse werden von früheren Daten einer verminderten α_1 -Rezeptor-Expression in der Aorta und der Leber der Ratte während schwerer Sepsis sowie in der Leber der Ratte 18 Stunden nach Induktion einer Sepsis durch zökale Ligation und Punction (CLP) gestützt [40 - 42]. Die erhöhte hepatische α_1 -Rezeptor-Expression 9 Stunden nach CLP-Behandlung in dieser Studie widerspricht unseren Daten nicht, da der Beginn einer Sepsis im CLP-Modell im Vergleich zur i.v.-Injektion von LPS verzögert auftritt. An der humanen Leber wurde eine erhöhte ^3H -Prazosin-Bindung während einer milden Sepsis und eine verminderte ^3H -Prazosin-Bindung während einer schweren Sepsis berichtet [43]. Auch dieser Befund steht unseren Daten nicht entgegen, da in unserem Tiermodell angesichts einer Mortalität von 44% von einer schweren experimentellen Endotoxämie auszugehen ist.

Analog zu den Befunden für $\text{AT}_{1\text{A}}$ - und α_1 -Rezeptoren zeigte sich in unseren Experimenten eine Verminderung von $\text{V}_{1\text{A}}$ -Rezeptor-mRNA in Leber, Lunge, Niere und Herz während experimenteller Sepsis [31]. Eine verminderte hepatische ^3H -Vasopressin-Bindung in der Ratte nach Endotoxin-Infusion wurde bereits beschrieben [42].

Proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β , TNF- α und IFN- γ sowie NO werden während Sepsis in großen Mengen gebildet [4, 5] und könnten an der Regulation der Expression vasokonstriktorischer Rezeptoren beteiligt sein. Unsere Befunde an Primärkulturen renaler Mesangialzellen der Ratte zeigen, dass sowohl NO als auch Zytokine die $\text{AT}_{1\text{A}}$ -Rezeptor-Expression vermindern [30]. Diese Befunde sind im Einklang mit Berichten, die eine verminderte $\text{AT}_{1\text{A}}$ -Rezeptor-Expression in glatten Gefäßmuskelzellen nach Inkubation mit NO-Donoren belegen [44, 45]. Ebenso wurde beschrieben, dass IL-1 β , TNF- α und IFN- γ die Angiotensin-II-Bindung bei glatten Gefäßmuskelzellen in einer NO-abhängigen Weise vermindern [46].

An einer Zelllinie renaler Mesangialzellen konnten wir eine NO-unabhängige Verminderung der $\alpha_{1\text{B}}$ -Rezeptor-Genexpression durch IL-1 β und TNF- α zeigen [32]. An glatten Gefäßmuskelzellen war die Expression von $\text{V}_{1\text{A}}$ -Rezeptoren ebenfalls NO-unabhängig durch IL-1 β , TNF- α und IFN- γ vermindert [31].

In vivo fiel eine Korrelation zwischen der Gewebekonzentration von IL-1 β und TNF- α und dem Ausmaß der Verminderung der α_1 -Rezeptor-Expression in Leber und Lunge einerseits und der Niere andererseits auf. In Leber und Lunge waren die Konzentrationen dieser Zytokine mehr als 10fach höher als in der Niere. Darüber hinaus blieben die Zytokine in Leber und Lunge über den gesamten Untersuchungszeitraum erhöht, während die Zytokin-Konzentrationen in der Niere 24 Stunden nach Induktion der Endotoxämie bereits wieder Kontrollniveau erreicht

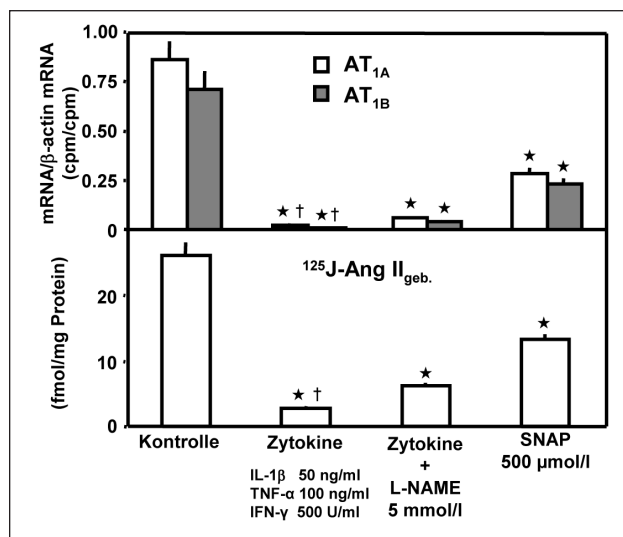


Abbildung 6: $\text{AT}_{1\text{A}}$ -Rezeptor-mRNA und ^{125}J -Angiotensin-II-Bindung in Mesangialzellen nach einer 12-stündigen Inkubation mit einer Kombination von IL-1 β , TNF- α und IFN- γ ohne (Zytokine) und mit L-NAME (Zytokine + L-NAME) oder mit SNAP. Die mRNA-Daten wurden auf das Signal des Referenzgens β -actin derselben RNA-Präparation bezogen. Die Bindungsdaten wurden mit 100 pmol/l ^{125}J -Angiotensin II erhoben und auf das Gesamt-Protein bezogen. Mittelwert \pm SE von 4 Experimenten in Doppelbestimmung. * $p < 0.05$ vs. Kontrolle, † $p < 0.05$ vs. Zytokine+L-NAME; modifiziert nach [30].

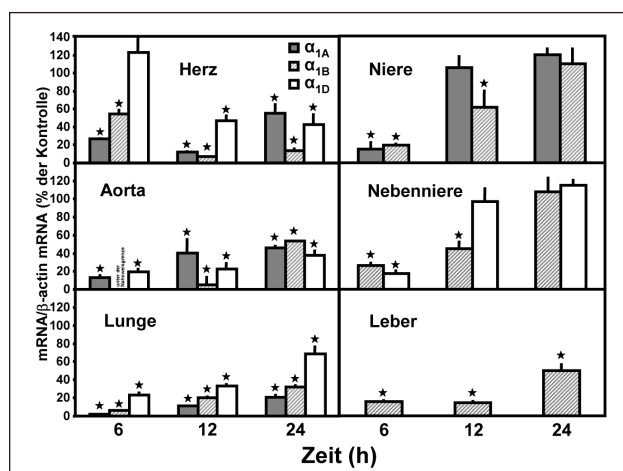


Abbildung 7: α_1 -Rezeptor-mRNA nach Injektion von LPS (10 mg/kg). Die Daten wurden auf das Signal des Referenzgens β -actin derselben RNA-Präparation bezogen und sind als prozentuale Veränderung zur Kontrolle angegeben. Mittelwert \pm SE, $n = 6$, * $p < 0.05$ vs. Kontrolle; modifiziert nach [32].

hatten. Dieser Unterschied liegt möglicherweise an der höheren Makrophagen-Aktivität in Leber und Lunge, wodurch mehr LPS aus dem Kreislauf aufgenommen wurde und höhere Mengen an Zytokinen produziert wurden. Darüber hinaus könnte der relativ höhere Blutfluss in der Niere zu einem schnelleren Auswaschen der Zytokine geführt haben. In Leber und Lunge zeigte sich eine starke und über den gesamten Untersuchungszeitraum anhaltende Verminderung der α_1 -Rezeptor-Expression, während diese in der Niere deutlich geringer ausgeprägt war und sogar wieder Kontrollniveau erreichte. Diese Korrelation unterstreicht die Bedeutung der Gewebe-Zytokine bei der Regulation der α_1 -adrenergen Rezeptor-Expression [32].

Gesucht

Das „**Horst-Stoeckel-Museum für die Geschichte der Anästhesiologie**“ in Bonn sucht für die im Aufbau befindliche Bibliothek folgende Lehrbücher und Monografien der Narkose und Lokalanästhesie, die in den Jahren 1880 bis ca. 1930 in Deutschland erschienen sind:

- 1881 Tauber, E.: Anaesthetica. August Hirschwald, Berlin
- 1887 Viau, G.: Die lokale Anästhesie bei Zahnextraktionen. Hirschwald, Berlin
- 1897 Czempin, A.: Die Technik der Chloroformnarkose für Ärzte und Studierende. Enslin, Berlin
- 1897 Hackenbruch, P.: Oertliche Schmerzlosigkeit bei Operationen. Lehmanns Wiesbaden
- 1898 Müller, J.: Anaesthetika. Ueber die verschiedenen, gebräuchlichen Anästhetika, ihre Wirkungsweise und die Gefahren bei ihrer Anwendung. Mitcher & Röstel, Berlin
- 1898 Hankel, E.: Handbuch der Inhalations-Anaesthetica. Alfred Langkammer, Leipzig
- 1902 Koblanck, G.: Die Chloroform- und Äthernarkose in der Praxis. Bergmann, Wiesbaden
- 1903 Steinbüchel, R. von: Schmerzverminderung und Narkose in der Geburtshilfe mit spezieller Berücksichtigung der kombinierten Scopolamin-Morphium-Anästhesie. Franz Deuticke, Leipzig Wien
- 1905 Martin, M.: Die Anästhesie in der ärztlichen Praxis. Lehmanns, München
- 1907 Bosse, B.: Die Lumbalanästhesie. Urban & Schwarzenberg, Berlin Wien
- 1907 Hirsch, M.: Der Ätherrausch. Franz Deuticke, Leipzig Wien
- 1910 Schlesinger, A.: Die Praxis der lokalen Anästhesie, Urban & Schwarzenberg, Berlin Wien
- 1913 Homeier, F.: Die Anwendungsweise der Lokalanästhesie in der Chirurgie. Hirschwald, Berlin
- 1914 Wein, D.: Die Anästhesie in der Zahnheilkunde. Bergmann, Wiesbaden
- 1926 Antoine; T., Pfab, B.: Die Inhalationsnarkose. Springer, Berlin Wien

Bitte Anfragen an:

Horst-Stoeckel-Museum für die Geschichte der Anästhesiologie, Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Sigmund-Freud-Straße 25, D-53105 Bonn, Tel.: 0228 / 2876876, Fax: 0228 / 2874623, E-Mail: anaesthesia-museum@uni-bonn.de

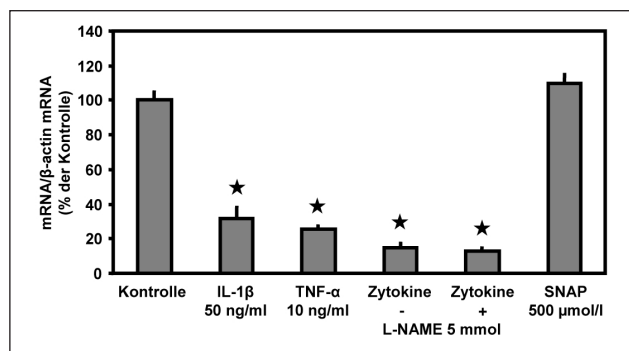


Abbildung 8: α_{1B} -Rezeptor-mRNA in Mesangialzellen nach 10stündiger Inkubation mit IL-1 β , TNF- α , einer Kombination von IL-1 β und TNF- α ohne oder mit L-NAME (Zytokine \pm L-NAME) oder mit dem NO-Donor SNAP. Die Daten wurden auf das Signal des Referenzgens β -actin derselben RNA-Präparation bezogen und sind als prozentuale Veränderung zur Kontrolle angegeben. Mittelwert \pm SE von 4 Experimenten in Doppelbestimmung. * $p < 0.05$ vs. Kontrolle; modifiziert nach [32].

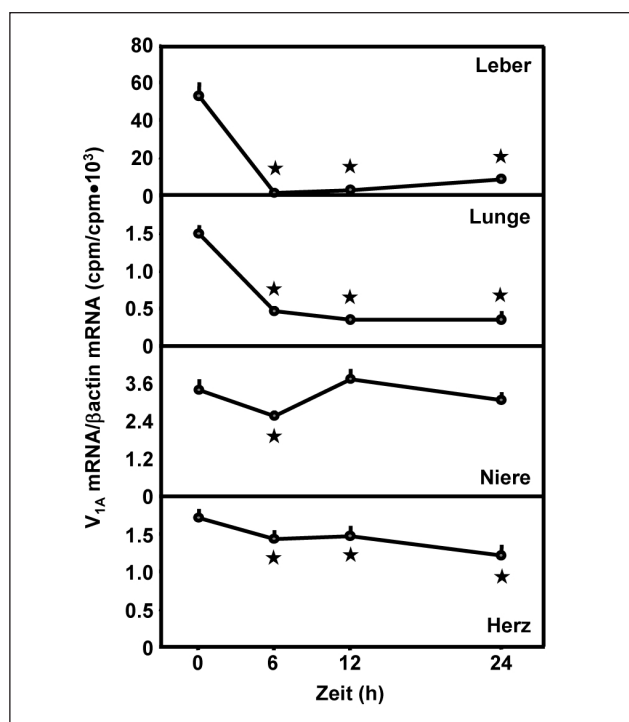


Abbildung 9: V_{1A} -Rezeptor-mRNA nach Injektion von LPS (10 mg/kg) bezogen auf das Signal des Referenzgens β -actin derselben RNA-Präparation. Mittelwert \pm SE, $n = 6$, * $p < 0.05$ vs. Kontrolle; modifiziert nach [31].

In-vivo- und In-vitro Untersuchungen belegen die Fähigkeit von Katecholaminen, eine Verminderung der α_1 -adrenergen Rezeptor-Expression zu bewirken [47 - 49]. Unsere Daten weisen jedoch darauf hin, dass Katecholamine bei der Verminderung der α_1 -Rezeptor-Expression während LPS-induzierter Endotoxämie eine untergeordnete Rolle spielen. Zwischen der Verminderung der Expression α_1 -adrenerger Rezeptoren und der Katecholamin-Konzentration im Gewebe konnten wir keine Korrelation herstellen. In Leber und Lunge, wo wir eine ausgeprägte und lang anhaltende Verminderung von α_1 -adrenergen Rezeptoren fanden, waren die Katecholamin-Konzentrationen nicht erhöht oder waren gar vermindert. In der Niere, wo wir nur eine moderate und transiente Verminderung von α_1 -adrenergen Rezeptoren fanden, waren die Epinephrin-Konzentrationen deutlich und die von Norepinephrin und Dopamin tendenziell erhöht [32].

Die in unseren Blutdruck-Dosis-Wirkungsversuchen beobachtete verminderte Blutdruckwirksamkeit gegenüber einem selektiven V_1 -Rezeptor-Agonisten nach LPS-Injektion ist im Einklang mit Berichten einer verminderten Blutdruckantwort sowie einer verminderten vaskulären Antwort auf Vasopressin während akuter experimenteller Sepsis [8, 10, 11] und verdeutlicht die Relevanz unserer Befunde für die vaskuläre Hyporeaktivität gegenüber Vasopressin während akuter Endotoxämie. Andererseits wurde eine erhöhte Blutdrucksensitivität gegenüber Vasopressin bei Patienten im chronischen vasodilatatorischen septischen Schock beschrieben [50]. In dieser Studie wurde ein blutdrucksteigernder Effekt von Vasopressin bei fünf septischen Patienten beschrieben, wobei der Vergleich mit einer nicht-septischen Kontrollgruppe fehlt. Diese Ergebnisse widersprechen unseren Daten nicht, da wir ebenso einen blutdrucksteigernden Effekt eines V_1 -Rezeptor-selektiven Vasopressin-Analogons während Endotoxämie fanden, welcher jedoch im Vergleich zur nicht-septischen Kontrollgruppe abgeschwächt war [31].

Proinflammatorische Zytokine scheinen eine Schlüsselrolle in der Pathogenese des septischen Kreislaufversagens zu spielen. Einerseits bewirken sie eine vermehrte Produktion von vasodilatierendem NO, das den kardiovaskulären Kollaps während Sepsis vermittelt. Andererseits führen diese Zytokine, teils NO-abhängig, zu einer verminderten Expression vasopressorischer Rezeptoren, was zu einer verminderten vasokonstriktorischen Antwort auf entsprechenden Agonisten führt. Folglich sind diese nicht in der Lage, die

Tabelle 3: B_{max} und K_D -Werte der 3H -Prazosin-Bindung an Mesangialzellen.

3H -Prazosin-Bindung	B_{max} (fmol/mg)	K_D (nmol/l)
Kontrolle	653 \pm 23.6	0.9 \pm 0.2
IL-1 β (50 ng/ml)	374 \pm 28.1*	0.9 \pm 0.1
TNF- α (10 ng/ml)	324 \pm 22.4*	0.8 \pm 0.2
Zytokine (IL-1 β + TNF- α)	279 \pm 19.1*	0.8 \pm 0.1
Zytokine + L-NAME (5 mmol/l)	298 \pm 23.7*	0.9 \pm 0.2
SNAP (500 μ mol/l)	596 \pm 44.3	1.0 \pm 0.3

Mittelwert \pm SE von 4 Experimenten in Doppelbestimmung; * $p < 0.05$ vs. Kontrolle, modifiziert nach [32].

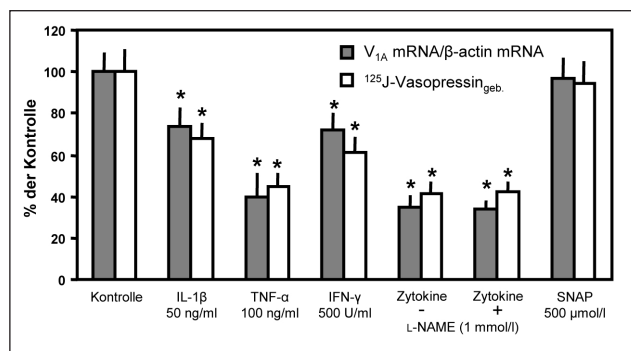


Abbildung 10: V_{1A}-Rezeptor-mRNA und ¹²⁵I-Vasopressin-Bindung in aortalen glatten Gefäßmuskulzellen (Zelllinie A7r5) nach 8stündiger Inkubation mit IL-1β, TNF-α, IFN-γ, einer Kombination dieser Zytokine ohne oder mit L-NAME (Zytokine ± L-NAME) oder mit dem NO-Donor SNAP. Die mRNA-Daten wurden auf das Signal des Referenzgens β-actin derselben RNA-Präparation bezogen. Die Bindungsdaten wurden mit 1 nmol/l ¹²⁵I-Vasopressin erhoben und auf das Gesamt-Protein bezogen. Die Werte sind als prozentuale Veränderung zur Kontrolle angegeben. Mittelwert ± SE von 4 Experimenten in Doppelbestimmung. *p < 0.05 vs. Kontrolle; modifiziert nach [31].

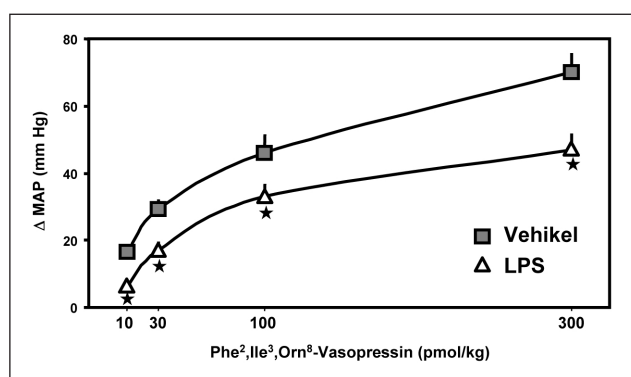


Abbildung 11: Blutdruck-Dosis-Wirkung des selektiven V₁-Rezeptor-Agonisten Phe², Ile³, Orn⁸-Vasopressin nach Injektion von Vehikel oder LPS (10 mg/kg). Die Absolut-Werte des MAP (Insert). Die Änderung des MAP (ΔMAP) ist als Mittelwert ± SE von 6 Tieren pro Gruppe 6 Stunden nach Injektion von Vehikel oder LPS (10 mg/kg) angegeben. *p < 0.05 vs. Vehikel; modifiziert nach [31].

überschießende vasodilatierende Aktivität von NO während akuter Sepsis zu neutralisieren. Wir gehen davon aus, dass die verminderte Expression der Rezeptoren für Vasokonstriktoren für die vaskuläre Hyporeaktivität auf Agonisten mitverantwortlich ist und eine wichtige Rolle in der Pathogenese des septischen Kreislaufversagens spielt. Entlang welcher Signaltransduktionswege die Verminderung der Rezeptor-Expression für Vasokonstriktoren vermittelt wird und ob und auf welche Weise diese verhindert werden kann, bedarf weiterer Untersuchungen. Möglicherweise wird die verminderte Rezeptor-Expression über eine Hemmung der Promotoraktivität dieser Rezeptoren durch Zytokine und/oder NO vermittelt.

Danksagung

Die Arbeit wurde finanziell durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft unterstützt (BU 1360/1-1).

Literatur

- Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States:

analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001;29:1303-1310.

- Rangel-Frausto MS, Pittet D, Costigan M, Hwang T, Davis CS, Wenzel RP. The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). A prospective study. *JAMA* 1995; 273:117-123.
- Wenzel RP. Treating sepsis. *N Engl J Med* 2002;347:966-967.
- Landry DW, Oliver JA. The pathogenesis of vasodilatory shock. *N Engl J Med* 2001;345:588-595.
- Parrillo JE. Pathogenetic mechanisms of septic shock. *N Engl J Med* 1993;328:1471-1477.
- Beal AL, Cerra FB. Multiple organ failure syndrome in the 1990s. Systemic inflammatory response and organ dysfunction. *JAMA* 1994;271:226-233.
- Chernow B, Rainey TG, Lake CR. Endogenous and exogenous catecholamines in critical care medicine. *Crit Care Med* 1982;10: 409-416.
- Schaller MD, Waeber B, Nussberger J, Brunner HR. Angiotensin II, vasopressin, and sympathetic activity in conscious rats with endotoxemia. *Am J Physiol* 1985;249:H1086-H1092.
- Wray GM, Coakley JH. Severe septic shock unresponsive to noradrenaline. *Lancet* 1995;346:1604.
- Hollenberg SM, Tangora JJ, Piotrowski MJ, Easington C, Parrillo JE. Impaired microvascular vasoconstrictive responses to vasopressin in septic rats. *Crit Care Med* 1997;25:869-873.
- Tarpey SB, Bennett T, Randall MD, Gardiner SM. Differential effects of endotoxaemia on pressor and vasoconstrictor actions of angiotensin II and arginine vasopressin in conscious rats. *Br J Pharmacol* 1998;123:1367-1374.
- Booke M, Hinder F, McGuire R, Traber LD, Traber DL. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase: effects on hemodynamics and regional blood flow in healthy and septic sheep. *Crit Care Med* 1999;27:162-167.
- Liaudet L, Feihl F, Rosselet A, Markert M, Hurni JM, Perret C. Beneficial effects of L-canavanine, a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase, during rodent endotoxaemia. *Clin Sci (Lond)* 1996;90:369-377.
- Szabo C, Southan GJ, Thiemermann C. Beneficial effects and improved survival in rodent models of septic shock with S-methylisothiourea sulfate, a potent and selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:12472-12476.
- Teale DM, Atkinson AM. L-canavanine restores blood pressure in a rat model of endotoxic shock. *Eur J Pharmacol* 1994;271:87-92.
- Avontuur JA, Tutein Nolthenius RP, van Bodegom JW, Bruining HA. Prolonged inhibition of nitric oxide synthesis in severe septic shock: a clinical study. *Crit Care Med* 1998;26:660-667.
- Grover R, Zaccardelli D, Colice G, Guntupalli K, Watson D, Vincent JL. An open-label dose escalation study of the nitric oxide synthase inhibitor, N(G)-methyl-L-arginine hydrochloride (546C88), in patients with septic shock. Glaxo Wellcome International Septic Shock Study Group. *Crit Care Med* 1999;27:913-922.
- Kiehl MG, Ostermann H, Meyer J, Kienast J. Nitric oxide synthase inhibition by L-NAME in leukocytopenic patients with severe septic shock. *Intensive Care Med* 1997;23:561-566.
- Nava E, Palmer RM, Moncada S. Inhibition of nitric oxide synthesis in septic shock: how much is beneficial? *Lancet* 1991;338:1555-1557.
- Schwartz D, Mendonca M, Schwartz I, Xia Y, Satriano J, Wilson CB, Blantz RC. Inhibition of constitutive nitric oxide synthase (NOS) by nitric oxide generated by inducible NOS after lipopolysaccharide administration provokes renal dysfunction in rats. *J Clin Invest* 1997;100:439-448.
- Fukatsu K, Saito H, Fukushima R, Inoue T, Lin MT, Inaba T, Muto T. Detrimental effects of a nitric oxide synthase inhibitor (N-omega-nitro-L-arginine-methyl-ester) in a murine sepsis model. *Arch Surg* 1995;130:410-414.
- Evans T, Carpenter A, Silva A, Cohen J. Inhibition of nitric oxide synthase in experimental gram-negative sepsis. *J Infect Dis* 1994;169:343-349.
- Fox GA, Paterson NA, McCormack DG. Effect of inhibition of NO synthase on vascular reactivity in a rat model of hyperdynamic sepsis. *Am J Physiol* 1994;267:H1377-H1382.
- Pedoto A, Tassiopoulos AK, Oler A, McGraw DJ, Hoffmann SP, Camporesi EM, Hakim TS. Treatment of septic shock in rats with nitric oxide synthase inhibitors and inhaled nitric oxide. *Crit Care Med* 1998;26:2021-2028.

25. Scott JA, McCormack DG. Selective in vivo inhibition of inducible nitric oxide synthase in a rat model of sepsis. *J Appl Physiol* 1999;86:1739-1744.
26. Thiernemann C, Wu CC, Szabo C, Perretti M, Vane JR. Role of tumour necrosis factor in the induction of nitric oxide synthase in a rat model of endotoxin shock. *Br J Pharmacol* 1993;110:177-182.
27. de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev* 2000;52:415-472.
28. Guimaraes S, Moura D. Vascular adrenoceptors: an update. *Pharmacol Rev* 2001;53:319-356.
29. Morel A, O'Carroll AM, Brownstein MJ, Lolait SJ. Molecular cloning and expression of a rat V1a arginine vasopressin receptor. *Nature* 1992;356:523-526.
30. Bucher M, Ittner KP, Hobbhahn J, Taeger K, Kurtz A. Downregulation of angiotensin II type 1 receptors during sepsis. *Hypertension* 2001;38:177-182.
31. Bucher M, Hobbhahn J, Taeger K, Kurtz A. Cytokine-mediated downregulation of vasopressin V(1A) receptors during acute endotoxemia in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002;282:R979-R984.
32. Bucher M, Kees F, Taeger K, Kurtz A. Cytokines down-regulate alpha1-adrenergic receptor expression during endotoxemia. *Crit Care Med* 2003;31:566-571.
33. Bucher M, Hobbhahn J, Kurtz A. Nitric oxide-dependent down-regulation of angiotensin II type 2 receptors during experimental sepsis. *Crit Care Med* 2001;29:1750-1755.
34. Fink MP, Homer LD, Fletcher JR. Diminished pressor response to exogenous norepinephrine and angiotensin II in septic, unanesthetized rats: evidence for a prostaglandin-mediated effect. *J Surg Res* 1985;38:335-342.
35. Hollenberg SM, Cunnion RE. Endothelial and vascular smooth muscle function in sepsis. *J Crit Care* 1994;9:262-280.
36. Cumming AD, Driedger AA, McDonald JW, Lindsay RM, Solez K, Linton AL. Vasoactive hormones in the renal response to systemic sepsis. *Am J Kidney Dis* 1988;11:23-32.
37. Hilgenfeldt U, Kienapfel G, Kellermann W, Schott R, Schmidt M. Renin-angiotensin system in sepsis. *Clin Exp Hypertens A* 1987;9:1493-1504.
38. Ohtani R, Ohashi Y, Muranaga K, Itoh N, Okamoto H. Changes in activity of the renin-angiotensin system of the rat by induction of acute inflammation. *Life Sci* 1989;44:237-241.
39. Gardiner SM, Kemp PA, March JE, Bennett T. Temporal differences between the involvement of angiotensin II and endothelin in the cardiovascular responses to endotoxaemia in conscious rats. *Br J Pharmacol* 1996;119:1619-1627.
40. Carcillo JA, Litten RZ, Suba EA, Roth BL. Alterations in rat aortic alpha 1-adrenoceptors and alpha 1-adrenergic stimulated phosphoinositide hydrolysis in intraperitoneal sepsis. *Circ Shock* 1988;26:331-339.
41. Dong LW, Yang J, Tong LJ, Tang C, Liu MS. Transcriptional regulation of alpha1-adrenoceptor gene in the rat liver during different phases of sepsis. *Biochim Biophys Acta* 1999;1453:207-215.
42. Roth BL, Spitzer JA. Altered hepatic vasopressin and alpha 1-adrenergic receptors after chronic endotoxin infusion. *Am J Physiol* 1987;252:E699-E702.
43. Hwang TL, Lau YT, Huang SF, Chen MF, Liu MS. Changes of alpha 1-adrenergic receptors in human liver during intraabdominal sepsis. *Hepatology* 1994;20:638-642.
44. Cahill PA, Redmond EM, Foster C, Sitzmann JV. Nitric oxide regulates angiotensin II receptors in vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* 1995;288:219-229.
45. Ichiki T, Usui M, Kato M, Funakoshi Y, Ito K, Egashira K, Takeshita A. Downregulation of angiotensin II type 1 receptor gene transcription by nitric oxide. *Hypertension* 1998;31:342-348.
46. Sasamura H, Nakazato Y, Hayashida T, Kitamura Y, Hayashi M, Saruta T. Regulation of vascular type 1 angiotensin receptors by cytokines. *Hypertension* 1997;30:35-41.
47. Izzo NJ, Jr., Seidman CE, Collins S, Colucci WS. Alpha 1-adrenergic receptor mRNA level is regulated by norepinephrine in rabbit aortic smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:6268-6271.
48. Snively MD, Mahan LC, O'Connor DT, Insel PA. Selective down-regulation of adrenergic receptor subtypes in tissues from rats with pheochromocytoma. *Endocrinology* 1983;113:354-361.
49. Wikberg JE, Akers M, Caron MG, Hagen PO. Norepinephrine-induced down regulation of alpha 1 adrenergic receptors in cultured rabbit aorta smooth muscle cells. *Life Sci* 1983;33:1409-1417.
50. Landry DW, Levin HR, Gallant EM, Seo S, D'Alessandro D, Oz MC, Oliver JA. Vasopressin pressor hypersensitivity in vasodilatory septic shock. *Crit Care Med* 1997;25:1279-1282.

Korrespondenzadresse:

PD Dr. med. *Michael Bucher*

Klinik für Anästhesiologie

Universität Regensburg

Franz-Josef-Strauss-Allee 11

D-93042 Regensburg

Tel.: 0941 / 944 - 7801

Fax: 0941 / 944 - 7802

E-Mail: michael.bucher@klinik.uni-regensburg.de