

Abstracts der 18. Wissenschaftlichen Arbeitstage der DGAI*

Die Vorträge, deren Abstracts nachfolgend publiziert werden, wurden nach einem vorhergehenden gewichteten Auswahlverfahren auf den Wissenschaftlichen Arbeitstagen der DGAI vom 13. - 14.02.2004 in Würzburg gehalten, anschließend diskutiert und die dazugehörigen Abstracts im Plenum der Arbeitstage hinsichtlich ihrer Publikationswürdigkeit abgestimmt. Sie erfüllen damit die Kriterien einer begutachteten Publikation als Abstract.

Xenon induziert eine pharmakologische Präkonditionierung des Rattenherzens in vivo über eine Induktion der PKC-ε und p38 MAPK

N.C. Weber, O. Toma, J. I. Wolter, D. Obal, W. Schlack und B. Preckel
Klinik für Anästhesiologie, Universitätsklinikum, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Fragestellung

Xenon könnte ein geeignetes Anästhetikum in speziellen klinischen Situationen sein, da es kardioprotektive Eigenschaften besitzt, ohne gleichzeitig hämodynamische Veränderungen zu bewirken. Xenon reduziert den post-ischämischen Reperfusionsschaden in vivo [1]. Zudem konnten wir zeigen, dass Xenon in vivo eine Myokardprotektion im Sinne einer pharmakologischen Präkonditionierung hervorruft, die über eine gesteigerte Phosphorylierung der Proteinkinase C (PKC) vermittelt wird [2]. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die molekularen Mechanismen der Xenon induzierten Präkonditionierung weiter aufzuklären. Wir untersuchten, ob Xenon eine Translokation der PKC-ε induziert und welche Rolle die p38 mitogen aktivierte Proteinkinase (MAPK), ein wichtiges Zielenzym der PKC, in der Signaltransduktion der Xenon-induzierten Präkonditionierung spielt.

Methodik

Nach Genehmigung durch die örtliche Behörde wurde bei männlichen Wistar-Ratten (S-Ketamin-/Chloralose-Anästhesie) zur Messung des arteriellen Blutdrucks eine A. carotis und zur Flüssigkeitssubstitution eine V. jugularis kanüliert. Nach lateraler Thorakotomie wurden 48 Tiere einer 25 Minuten regionalen Myokardischämie, gefolgt von zwei Stunden Reperfusion unterzogen. Am Ende der Reperfusion wurden die Herzen entnommen und nach Triphenyltetrazoliumchlorid-Färbung die Infarktgröße bestimmt. Die Xenon-Präkonditionierung (Xe-PC) wurde durch eine 3 x 5 minütige Inhalation von Xenon 70%, gefolgt von einer 10 minütigen Auswaschphase, induziert (n=14). Die Kontrolltiere (n=14) wurden einer Ischämie und Reperfusion ohne weitere Intervention unterzogen. Eine Gruppe (n=10) wurde vor der Xe-PC mit dem spezifischen p38 MAPK-Inhibitor, SB203580 (1mg/kg⁻¹ i.v.) behandelt. Weitere 24 Herzen (je n=6 pro Gruppe) wurden mit oder ohne Xe-PC (Xe-PC, Kontrolle), mit dem spezifischen PKC Blocker Calphostin C (0.1 mg kg⁻¹) behandelt, vor der infarkt-induzierenden Ischämie entnommen und immunhistochemisch untersucht bzw. einer Gewebefraktionierung unterzogen. Die Cytosol- und Membranfraktionen der jeweiligen Herzen wurden im Western blot auf PKC-ε und p38 MAPK untersucht, wobei α-tubulin als interner Standard diente. Alle Daten sind Mittelwerte ± Standardabweichung.

Statistik

Student's t-test mit Bonferroni-Korrektur für den Mehrfachvergleich.

Ergebnisse

Xe-PC reduzierte die Infarktgröße von 50.9 ± 16.7% in den Kontrollen auf 28.1 ± 10.3%. Diese Myokardprotektion wurde durch den spezifischen p38 MAPK-Inhibitor SB203580 aufgehoben (53.9 ± 20.0%). Xenon induzierte eine Translokation der PKC-ε vom Cytosol zur Membran verglichen mit der Kontrolle (average light intensity [AVI], ***p < 0.001, Abb. 1). Darüber hinaus induzierte Xenon die Phosphorylierung der p38 MAPK (**p < 0.001,

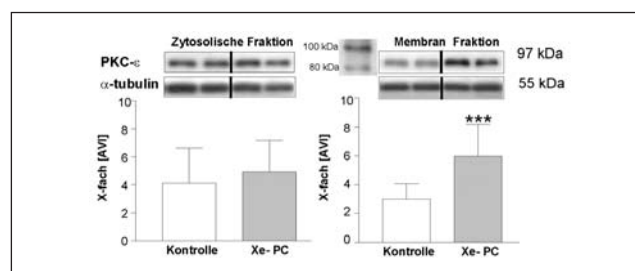


Abbildung 1

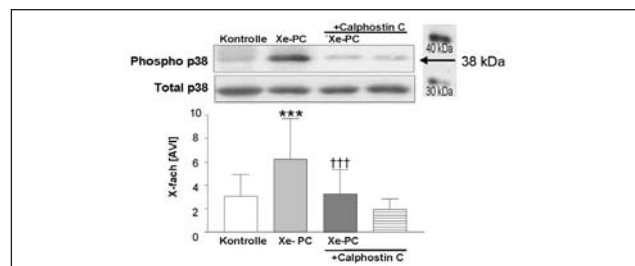


Abbildung 2

Abb. 2). Dieser Effekt konnte durch Blockade der PKC aufgehoben werden (**p < 0.001 vs. Xe-PC, Abb. 2).

Interpretation

Es konnte erstmalig gezeigt werden, dass Xe-PC über eine gesteigerte Translokation der PKC-ε vermittelt wird. Neben der PKC ist ebenfalls die p38 MAPK kausal in die Xenon-induzierte Myokardprotektion involviert.

Literatur

- Preckel B, Mullenheim J, Moloschavij A. et al. Xenon administration during early reperfusion reduces infarct size after regional ischemia in the rabbit heart in vivo. *Anesth Analg* 91 (2000): 1327-32.
- Toma O, Weber N.C., Obal D., Preckel B., Schlack W. Xenon Induces Myocardial Protection by Preconditioning. Involvement of Protein Kinase C (PKC). *Anesthesiology* 2003; (99): A 1540.

Mit Unterstützung der Else-Kröner-Fresenius-Stiftung.

* Rechte vorbehalten.

International validierter präoperativer Risikoindex zur Vorhersage der frühen postoperativen Sterblichkeit bei Patienten mit koronarer Bypassoperation

H. Feierfeil^{1,3}, S. A. Snyder-Ramos^{1,3}, W. A. Browner², P. H. Hsu¹, I. C. Tudor¹, E. Martin³, B. W. Böttiger^{1,3} und D. T. Mangano¹

¹ Ischemia Research and Education Foundation

² California Pacific Medical Center Research Institute, San Francisco

³ Klinik für Anaesthesiologie, Universitätsklinikum Heidelberg

Fragestellung

Ein zunehmend älteres und mit mehr Begleiterkrankungen vorbelastetes koronarchirurgisches Patientengut verlangt eine möglichst präzise präoperative Abschätzung von postoperativer Morbidität und Mortalität. Hierfür stehen u.a. Scoring-Systeme zur Verfügung (1-3). Solche Systeme können hilfreich sein bei der Vorhersage der postoperativen Sterblichkeit, zur Evaluierung der Versorgungsqualität und zur vergleichenden Erforschung der Ergebnisqualität. Ziel der vorliegenden Studie war die Entwicklung eines einfach präoperativ zu erhebenden und soliden Scores, basierend auf einem internationalen Patientenkollektiv.

Methodik

Nach Zustimmung durch die Ethikkommissionen sowie schriftlicher persönlicher Aufklärung und Einwilligung wurden 5.008 koronarchirurgische Patienten aus 70 Zentren in 17 europäischen, amerikanischen und asiatischen Ländern prospektiv in die vorliegende Studie eingeschlossen. Die Krankenhaussterblichkeit diente als zentrales Kriterium. Die zeitlich initial eingeschlossenen zwei Drittel der Patienten (n = 3.379) wurden der Entwicklungskohorte für den zu etablierenden Score zugeordnet, das verbleibende Drittel (n = 1.649) der Validierungskohorte. In der Entwicklungskohorte wurde nach der Assoziation zwischen 150 verschiedenen präoperativen klinischen Variablen und der Sterblichkeit gesucht. Hierzu wurden bei dichotomen Variablen der χ^2 test bzw. der Fischer's Exact Test, bei kontinuierlichen Variablen die logistische Regressionstechnik verwendet. Alle Variablen mit $p \leq 0,1$ wurden in ein multivariantes logistisches Modell aufgenommen. Die Vorhersagekraft wurde als Fläche unter der ROC (Receiver Operating Characteristics)-Kurve gemessen. In der Validierungsphase wurde der zu etablierende Internationale Risikoindex (IR) an dem unabhängigen Patientengut validiert und mit drei anderen etablierten und häufig verwendeten Risikoindizes (1-3) verglichen.

Ergebnisse

Sieben unabhängige Variablen wurden für die Ermittlung des IR als signifikant identifiziert und mit Punkten bewertet: Alter ≥ 60 Jahre (2 Punkte pro 5 Jahresintervall zusätzlich), Serumkreatinin bei Aufnahme $> 1,3$ mg/dl (6 Punkte), Therapie mit Kumarinpräparaten innerhalb einer Woche prä-

operativ (8 Punkte), vorausgegangene Krankenhausaufnahme wegen Herzinsuffizienz (9 Punkte), vorherige koronarchirurgische Operation (11 Punkte), Apoplex in der Anamnese (11 Punkte) sowie präoperative Notwendigkeit einer intraaortalen Ballonpumpe (28 Punkte). Mit diesen Variablen betrug die Vorhersagekraft gemessen als Fläche unter der 1 ROC-Kurve 0,83 (Tab. 1). Im Datensatz der Entwicklungskohorte wurden vier Risikogruppen definiert. Bei der Überprüfung des IR in der Validierungskohorte (Krankenhaussterblichkeit insgesamt 3,5%) zeigte sich eine gute Übereinstimmung ($P < 0,001$) zwischen erwarteter (0-6 Punkte: 1,1%; 7-9 Punkte: 1,8%; 10-19 Punkte: 3,2%; ≥ 20 Punkte: 19,1%) und tatsächlicher (entsprechend der Risikogruppen: 0,6%; 2,6%; 3,4%; 14,5%) Krankenhaussterblichkeit. Die generelle Vorhersagekraft, gemessen als Fläche unter der ROC-Kurve, betrug 0,84 (Tab. 1). Die vergleichende Evaluierung der anderen Risikoscores ist in Tabelle 2 dargestellt.

Interpretation

Es wurde ein international valider Index mit hoher Vorhersagekraft und kleiner Zahl (n = 7) benötigter Variablen zur Vorhersage der frühen postoperativen Sterblichkeit bei Patienten mit koronarer Bypassoperation entwickelt. Wesentlicher Vorteil des IR im Vergleich zu anderen Scores ist seine einfache präoperative Anwendbarkeit unter Benutzung von Variablen aus nicht invasiven Routineuntersuchungen, die bei der Aufnahme der Patienten erhoben werden. Hochrisikopatienten können so sehr einfach identifiziert und ggf. präoperativ optimiert werden. Weiterhin kann der IR als Vergleichsindex für verschiedene Kliniken, in klinischen Studien und zur nationalen und internationalen Qualitätssicherung verwendet werden.

Literatur

- Higgins T.L. et al. JAMA 267(1992)2344-2348.
- Nashef S.A.M. et al. Eur J Cardiothorac Surg 16(1999)9-13.
- Parsonnet V. et al. Circulation 79(1998)3-12.

Dieses Projekt wurde durch die Ischemia Research and Education Foundation (IREF), San Francisco, und durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) gefördert.

Tabelle 1: Patientenkohorten für die Entwicklung und für die Validierung des IR.

Phase	Patienten	χ^2 Test	Fläche unter der ROC Kurve
Entwicklung	3.379	$\chi^2(6) = 4,34, P = 0,63$	0,83
Validierung	1.649	$\chi^2(6) = 11,34, P = 0,08$	0,84

Tabelle 2: Vergleich des IR Indexes mit komplexeren Risikoscores in der Validierungskohorte.

Score	Fläche unter der ROC Kurve	P-Wert	„Odds Ratio“ (95% CI)
IR	0,84	$< 0,0001$	1,1 (1,1-1,1)
EuroSCORE (2)	0,84	$< 0,0001$	1,4 (1,3-1,5)
Cleveland Score (1)	0,59	$< 0,0189$	1,1 (1,0-1,2)
Parsonnet Index (3)	0,78	$< 0,0001$	1,1 (1,1-1,1)

CI = Vertrauensbereich, IR = Internationaler Risikoindex, ROC = Receiver Operating Characteristics.

Mechanismus der Desfluran-induzierten Kardioprotektion: Ist Stickstoffmonoxid ein Mediator und Trigger?

Th. Smul, F. Kehl und N. Roewer

Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie, Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Fragestellung

Volatile Anästhetika induzieren eine Kardioprotektion und reduzieren die Größe eines Myokardinfarktes, ähnlich der sog. ischämischen Präkonditionierung. Bei der ischämischen Präkonditionierung spielt ein Stickstoffmonoxid (NO)-abhängiger Signaltransduktionsweg insbesondere beim zweiten Fenster der Präkonditionierung, das ca. 1 - 2 Tage anhält, eine herausragende Rolle [1]. Ob NO bei der Signaltransduktion der durch volatile Anästhetika induzierten Kardioprotektion beteiligt ist, ist bisher kaum erforscht, erste Hinweise sprechen aber für die Beteiligung von NO als Trigger [2]. Wir testeten daher die Hypothese, dass NO bei der Desfluran-induzierten Kardioprotektion als Mediator beteiligt ist.

Methodik

Alle experimentellen Protokolle waren durch die institutionelle Tierschutzkommission und die zuständige Regierung genehmigt. Mit Pentobarbital (30 mg/kg/h) anästhesierte weiße Neuseeland Kaninchen (N = 40, 2,5 - 3,8 kg) wurden zur Messung hämodynamischer Parameter instrumentiert und Herzfrequenz, mittlerer Aortendruck und Herzzeitvolumen wurden aufgezeichnet. Nach Thorakotomie im 4. ICR und Perikardiotomie wurde ein prominenter Ast der linken Koronararterie (LAD) mit einer Ligatur umschlungen. Nach einer 30-minütigen Äquilibrationsphase wurden alle Tiere einer Ischämie von 30 Minuten durch Verschluss des LAD und einer Reperfusion von 3 Stunden unterzogen. Die Kaninchen wurden randomisiert fünf verschiedenen experimentellen Gruppen zugeteilt und erhielten entweder 0.0 (Kontrolle) oder 1.0 MAC Desfluran über einen Zeitraum von 30 Minuten. Die Gabe von N-Omega-Nitro-L-Arginin (L-NA), einem nicht-selektiven Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS)-Inhibitor (13 mg/kg iv), erfolgte entweder 10 Minuten vor (Triggerphase) oder 10 Minuten nach Desfluran-Applikation (Mediatorphase), und in einer weiteren Gruppe wurde L-NA allein ohne Desfluran verabreicht. Desfluran wurde 30 Minuten vor Koronararterienverschluss abgeflutet. Das Ischämieareal (AAR) wurde mit Patentblau und das Infarktareal (IS) mit Triphenyltetrazolium gravimetrisch ermittelt. Die statistische Analyse wurde mittels ANOVA mit posthoc Duncan-Test durchgeführt. Angegeben sind Mittelwert \pm SEM, *P < 0.05.

Ergebnisse

Die AAR der verschiedenen experimentellen Gruppen waren gleich groß, und es gab keine signifikanten Unterschiede der hämodynamischen Parameter während Baseline, Koronararterienverschluss oder Reperfusion. Die Infarktgröße (IS/AAR) betrug $55 \pm 7\%$ in der Kontroll-Gruppe (N = 9) und $56 \pm 7\%$ bei Tieren (N = 8), die nur L-NA allein bekommen hatten. Des-

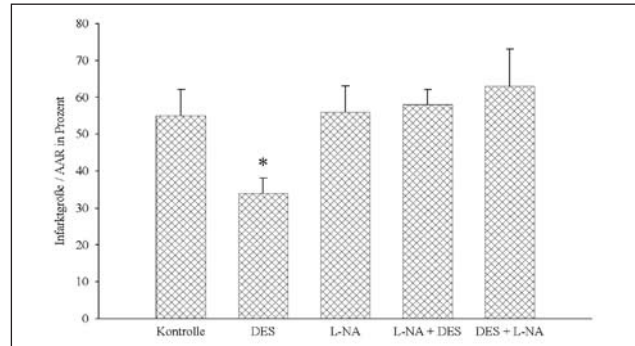


Abbildung 1

fluran reduzierte die Infarktgröße signifikant auf $34 \pm 4\%$ (N = 9). Der infarktgrößenreduzierende Effekt von Desfluran wurde durch L-NA-Gabe sowohl vor ($58 \pm 4\%$, N = 8) als auch nach Desfluran-Applikation ($63 \pm 10\%$, N = 6) blockiert.

Interpretation

Die Ergebnisse zeigen erstmals, dass Desfluran die Größe eines Herzinfarktes signifikant um ca. 40% auch dann reduzieren kann, wenn eine Zeitspanne (Memory-Phase) von 30 Minuten zwischen Beendigung der Applikation von Desfluran und dem Beginn der Koronararterienokklusion liegt. Die Hemmung der NO-Synthase mittels der Gabe von L-NA hat dabei keinen Einfluss auf die Größe des Herzinfarktes. Die Gabe von LNA entweder 10 Minuten vor oder 10 Minuten nach Desfluranapplikation ist in der Lage, die Desfluran-induzierte Kardioprotektion vollständig zu blockieren. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass NO als Mediator Teil der kardioprotektiven Signaltransduktionskette ist. Allerdings ist es nicht möglich anhand der vorliegenden Ergebnisse festzustellen, ob NO nicht auch eine zusätzliche Rolle als Trigger spielt.

Literatur

- Bolli R., Mol J. Cell. Cardiol. 2001; 33:1897-1918.
- Novalija E. et al., Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. 2002; 283: H44-52.

Die Desfluran-induzierte Präkonditionierung wird über eine zeitabhängige Aktivierung der PKC- ϵ und ERK-2 vermittelt

O. Toma, N.C. Weber, J. I. Wolter, D. Obal, B. Preckel und W. Schlack

Klinik für Anästhesiologie, Universitätsklinikum, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Fragestellung

Desfluran hat sowohl experimentell [1] als auch klinisch [2] einen ausgeprägten kardioprotektiven Effekt gegen den Ischämie-Reperfusionsschaden. Eine erhöhte Phosphorylierung der Proteinkinase-C-epsilon (PKC- ϵ) spielt bei der Anästhetika-induzierten Präkonditionierung eine wichtige Rolle [3]. In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir

- zu welchem Zeitpunkt die PKC- ϵ aktiviert ist und
- ob ein mögliches Zielenzym der PKC, die extrazellulär signal-regulierte Kinase (ERK-2-mitogen aktivierte Proteinkinase [MAPK]), ebenfalls involviert ist.

Methodik

Nach Genehmigung durch die örtliche Behörde wurde bei männlichen Wistar-Ratten (S-Ketamin-/Chloralose-Anästhesie) zur Messung des arteri-

ellen Blutdrucks eine A. carotis und zur Flüssigkeitssubstitution eine V. jugularis kanüliert. Die Tiere wurden nach lateraler Thorakotomie einer 25 Minuten dauernden regionalen Myokardischämie, gefolgt von zwei Stunden Reperfusion unterzogen. Am Ende der Reperfusion wurden die Herzen entnommen und nach Triphenyltetrazoliumchlorid-Färbung die Infarktgröße bestimmt (% des Risikogebietes). Es wurden sechs Gruppen (je n = 7) bezüglich der Infarktgröße untersucht: Je zwei Gruppen erhielten entweder Vehikel (0.9% Kochsalzlösung), den selektiven PKC-Blocker Calphostin C (0.1 mg kg⁻¹ i.v.) oder den ERK-Inhibitor PD98059 (1 mg kg⁻¹ i.v.). Unter jeder Versuchsbedingung wurde entweder Desfluran-Präkonditionierung (Des-PC, 3 Gruppen) ausgelöst (30 Minuten vor der Ischämie durch 2 x 5 Minuten Desfluran Gabe (1 MAC), jeweils von einer 10-minütigen Auswaschphase) oder die Gruppen wurden nicht präkonditioniert (3 Gruppen).

Um die Zeitverläufe der PKC-ε und ERK1/2 MAPK zu untersuchen, wurden ohne bzw. nach PKC-Blockade je vier Herzen zu vier verschiedenen Zeitpunkten entnommen: vor jeder Intervention (Ausgangswert), nach der ersten oder zweiten Desfluran-Gabe (Des I, Des II) bzw. nach der letzten Auswaschphase (Wash II). Die Cytosolfraktion wurde im Western blot auf PKC-ε und ERK-2 MAPK untersucht (average light intensity – AVI). Alle Daten sind Mittelwerte ± Standardabweichung. Statistik: Student's t-test mit Bonferroni-Korrektur für den Mehrfachvergleich.

Ergebnisse

Des-PC reduzierte die Infarktgröße von $57.2 \pm 4.7\%$ in Kontrollen auf $35.2 \pm 16.7\%$. Sowohl die Inhibition der PKC mit Calphostin C ($58.8 \pm 13.2\%$) als auch die Inhibition der ERK mit PD98059 ($64.2 \pm 15.4\%$) hoben diesen Effekt auf. Die Phosphorylierung der PKC-ε war erst nach der zweiten Desfluran-Gabe signifikant induziert und nach 10 Minuten Auswaschphase wieder auf Ausgangsniveau gesunken (Abb. 1). PKC-Blockade (Calphostin C) hob diesen Effekt auf (Abb. 1). Die ERK2-MAPK war bereits nach der ersten Desfluran-Gabe maximal phosphoryliert und kehrte ebenfalls nach 10 Minuten Auswaschphase auf Ausgangswerte zurück. Die Blockade der PKC hatte jedoch keinen Einfluss auf die Phosphorylierung der ERK2-MAPK (*p < 0.05 vs. Vehikel Ausgangswert, †p < 0.05 vs. Calphostin C Ausgangswert, Abb. 2).

Interpretation

Neben der PKC-ε ist auch die ERK1/2-MAPK für die Kardioprotektion durch Des-PC (Infarktgrößenreduktion) notwendig.

Literatur

1. Toller W.G, Gross E.R, Kersten J.R, Pagel P.S, Gross G.J, Warltier D.C: Sarcolemmal and mitochondrial adenosine triphosphate-dependent potassium channels: mechanism of desflurane-induced cardioprotection. *Anesthesiology* 2000; 92: 1731-9
2. De Hert S.G, Cromheecke S, ten Broecke P.W, Mertens E, De Blier I.G, Stockman B.A, Rodrigus I.E, Van der Linden P.J: Effects of propofol, desflurane, and sevoflurane on recovery of myocardial function after coronary surgery in elderly high-risk patients. *Anesthesiology* 2003; 99: 314-23

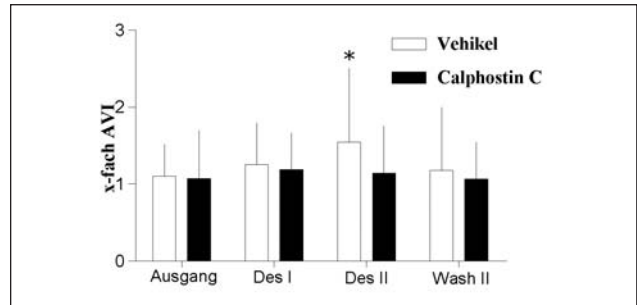


Abbildung 1: Phospho-PKC-ε.

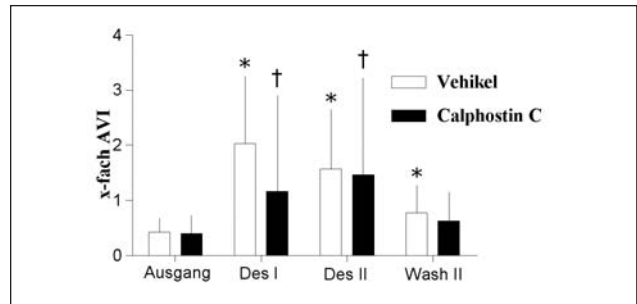


Abbildung 2: Phospho-ERK-2 MAPK.

3. Toma O., Weber N.C., Obal D., Preckel B., and Schlack W. Xenon induces myocardial protection by preconditioning. Involvement of protein kinase C (PKC). *Anesthesiology* 2003; (99): A 1540.

Die Studie wurde unterstützt von der Firma Baxter. Dr. Toma ist Stipendiat des KAAD.

Temperatur-unabhängige Hemmung von L-Typ Ca²⁺-Ionenströmen durch volatile Anästhetika an humanen Vorhofmyokardzellen

R. Hüneke¹, D. Zitzelsberger¹, J. Faßl¹, E. Jüngling², St. Brose³, W. Buhre¹, R. Rossaint¹ und A. Lückhoff²

¹ Klinik für Anästhesiologie,

² Institut für Physiologie,

³ Klinik für Thorax-Herz-Gefäßchirurgie
Universitätsklinikum der RWTH Aachen

Fragestellung

In-vitro-Untersuchungen zum Einfluss von volatilen Anästhetika auf Ionenströme von Herzmuskelzellen werden aus verschiedenen Gründen häufig bei Raumtemperatur durchgeführt. Es ist bekannt, dass die Löslichkeit volatiler Anästhetika von der Temperatur beeinflusst wird [1]. Auch die Stromamplitude und die Kinetik von kardialen Ca²⁺-Ionenströmen zeigt eine Abhängigkeit von der Temperatur [2]. Es stellt sich die Frage, ob Untersuchungen von kardialen Ionenströmen bei Raumtemperatur einen Rückschluss auf Messungen bei physiologischen Temperaturen zulassen. Deshalb wurden die Effekte von Halothan, Sevofluran und Xenon auf kardiale L-Typ Ca²⁺-Ströme bei 36°C untersucht und mit entsprechenden Messungen bei Raumtemperatur verglichen.

Methodik

Nach positivem Votum der Ethikkommission und Einwilligung der Patienten (n = 18) wurden im Rahmen von herzchirurgischen Eingriffen (ACVB-OP) mit Herz-Lungen-Maschine aus Gewebeanteilen des rechten Vorhofes durch nachfolgende enzymatische Behandlung einzelne Myokardzellen isoliert. Die elektrophysiologischen Messungen wurden mit der Ganzzell Patch-clamp-Methode durchgeführt und die L-Typ Ca²⁺-Ionenströme (I_{Ca,L}) bei 21°C und 36°C gemessen. Dabei wurden die konzentrationsabhängigen Änderungen der maximalen Stromamplitude bestimmt. Die Badlösungen wurden mit Halothan, Sevofluran und Xenon begast (21°C oder 36°C) und die resultierenden Konzentrationen in der Lösung mit Hilfe der Gaschromatographie bestimmt. Angegeben sind die

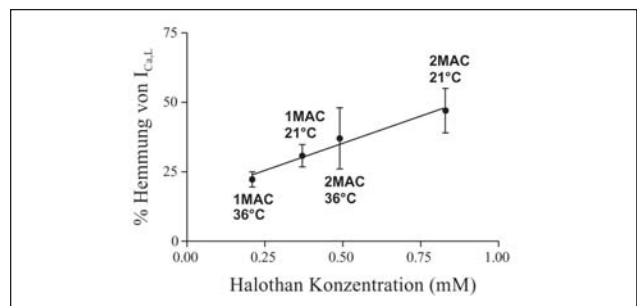


Abbildung 1

Mittelwerte ± Standardabweichung; die statistische Auswertung erfolgte mit dem Student-t-Test.

Ergebnisse

Die Konzentration von Halothan und Sevofluran in der Badlösung zeigt eine lineare Beziehung zur Konzentration in der Gasphase (in Vol %) während der Begasung (1 bis 3 MAC) bei beiden Temperaturen. Die Konzentration von Halothan ist mit 0,52 mM pro Vol % bei 21°C deutlich größer im Vergleich zu 0,29 mM bei 36°C. Für Sevofluran beträgt die

Konzentration in der Badlösung 0,12 mM pro Vol % bei 21°C im Vergleich zu 0,09 mM bei 36°C. Die L-Typ Ca^{2+} -Ionenströme zeigten eine höhere Stromamplitude und eine beschleunigte Inaktivierungskinetik bei 36°C im Vergleich zu Messungen bei Raumtemperatur. Halothan und Sevofluran (1 und 2 MAC) reduzierten die maximale Amplitude von $I_{\text{Ca,L}}$ bei 21°C stärker als bei 36°C. Die prozentuale Hemmung von $I_{\text{Ca,L}}$ weist dabei eine lineare Beziehung zur Konzentration der volatilen Anästhetika in der Badlösung auf. Abbildung 1 verdeutlicht diese Beziehung am Beispiel von Halothan. Xenon (~1 MAC) zeigte keinen Effekt auf $I_{\text{Ca,L}}$ bei 36°C.

Schlussfolgerung

Die Hemmung des L-Typ Ca^{2+} -Ionenstromes an humanen Vorhofmyokardzellen ist abhängig von der Konzentration der volatilen Anästhetika in der verwendeten Badlösung, unabhängig von der Untersuchungstemperatur. Mit der größeren Löslichkeit der volatilen Anästhetika bei 21°C kann die

stärkere Hemmung des L-Typ Ca^{2+} -Ionenstromes bei Raumtemperatur erklärt werden. Die Ergebnisse zeigen, dass bei Untersuchungen von kardialen Ionenströmen bei Raumtemperatur die Konzentration der volatilen Anästhetika in der Badlösung angegeben werden sollten, um die Messungen mit denen bei physiologischen Temperaturen vergleichen zu können.

Literatur

1. Franks N.P., Lieb W.R.: Selective actions of volatile general anaesthetics at molecular and cellular levels. *Br J Anaesth* 1993; 71: 65-76
2. Allen T.J.: Temperature dependence of macroscopic L-type calcium channel currents in single guinea pig ventricular myocytes. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1996; 7(4): 307-21

Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Hu 951/1-1).

Thrombotische Mikroangiopathie bei Patienten mit Multiorgandysfunktion nach kardiopulmonalem Bypass – potentielle Rolle der von-Willebrand-Faktor spaltenden Protease (ADAMTS-13)

F. M. Brunkhorst, C. Bockmeyer, K. Reinhart und R. A. Claus

Klinik für Anaesthesiologie und Intensivtherapie, Friedrich-Schiller-Universität Jena

Fragestellung

Der von-Willebrand-Faktor (vWF) vermittelt die Adhäsion von Thrombozyten an das verletzte Subendothel und zirkuliert im Plasma in Form von Multimeren unterschiedlicher Größe (500 bis 20.000 kDa). Bei den v.a. im Kindesalter auftretenden thrombotischen Mikroangiopathien (TMA) treten supramolekulare Multimere (sm-vWF) auf, die zu einer exzessiven Thrombozytenaggregation und Multiorgandysfunktion (MODS) führen [1]. Die erst kürzlich entdeckte vWF-cleaving-Protease („a disintegrin-like and metalloproteinase with thrombospondin motifs“, ADAMTS-13) bewirkt eine spezifische Proteolyse der sm-vWF-Multimere zwischen den Aminosäuren Y-842/M-843 und reguliert hierdurch deren biologische Funktion [2]. Ein Mangel an ADAMTS-13 resultiert in einer verminderten Proteolyse von sm-vWF und bildet damit die molekulare Basis der TMA.

Während die Mechanismen einer generalisierten Endothelaktivierung mit konsekutiver Thrombingerung und Thrombozytopenie (disseminierte intravasale Gerinnungsstörung) bei MODS weitgehend geklärt sind [3], ist der Stellenwert der TMA bei kritisch kranken Patienten unbekannt. Wir gingen daher der Frage nach, ob ein Abfall der ADAMTS-13-Aktivität und/oder eine Imbalance zwischen vWF und ADAMTS-13-Aktivität (TMA-Ratio) bei Patienten mit MODS nach CPB nachweisbar und prognostisch bedeutsam ist.

Methodik

Plasmaproben von 22 Patienten nach CPB, davon 9 Patienten mit intraoperativer Anlage einer IABP wurden an den postoperativen Tagen 1 - 5 analysiert (n = 101 Proben). Plasmaproben von 17 gesunden Probanden dienten als Kontrollen. Anzahl und Ausmass von Organdysfunktionen wurden mittels dem Sequential Organ Failure Assessment (SOFA)-Score täglich prospektiv quantitativ erfasst. VWF:Ag wurde nach Standardmethode immunologisch bestimmt (Referenzbereich: 70 - 140%, gesunde Probanden: $101,1 \pm 39,6\%$) bezogen auf einen Plasmapool von 45 Blutspendern. Die ADAMTS-13-Aktivität wurde mittels Kollagenbindung in einer modifizierten Methode nach Gerritsen unter Verwendung von rekombinantem vWF als Substrat ermittelt (Referenzbereich: 40 - 160%; 67 - 165% bei gesunden Probanden). Die Assayvalidierung erfolgte unter Verwendung von Plasma von Patienten mit gesicherter TMA (3 - 26% Aktivität) sowie durch Doppelbestimmung in einem anerkannten Referenzlaboratorium. Effekte inhibitorischer Antikörper wurden durch Verdünnungsexperimente ausgeschlossen. Eine TMA-Ratio (vWF:Ag / ADAMTS-13) 2,5 wurde als pathologisch definiert (Referenzwerte: 0,3 - 1,84 bei gesunden Probanden). Die Datenangaben erfolgen als Mittelwert \pm STD, die statistische Signifikanz wurde mittels Wilcoxon-Test und Mann-Whitney-U-Test ermittelt.

Ergebnisse

Die ADAMTS-13-Aktivität war bei thrombozytopenischen Patienten (Thrombozyten $< 100 \times 10^3$ /ml) niedriger als bei Patienten mit keiner oder

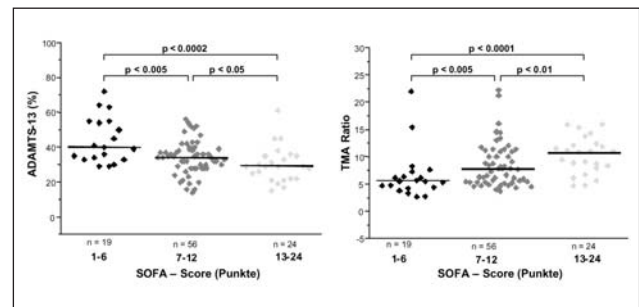


Abbildung 1

mäßiger Thrombozytopenie ($30,9 \pm 11,2\%$ vs $36,5 \pm 11,1\%$, $p < 0,005$) bei signifikant höherer TMA-Ratio ($10,4 \pm 3,4$ vs $7,6 \pm 3,9$, $p < 0,0001$), bzw. höherer vWF:Ag Konzentration bei thrombozytopenischen Patienten ($293,4 \pm 77,0\%$ vs $251,1 \pm 81,4\%$, $p < 0,01$). Eine erniedrigte ADAMTS-13-Aktivität bzw. erhöhte TMA-Ratio war mit der Schwere der Organdysfunktionen gemessen am SOFA-Score assoziiert (Abb.). Eine enge Assoziation mit dem SOFA-Score bestand ebenfalls für die Procalcitonin-Serumkonzentrationen (1. SOFA 1-6: $5,3 \pm 6,7$ ng/ml, 2. SOFA 7-12: $16,5 \pm 29,5$ ng/ml, 3. SOFA 13-24: $28,6 \pm 27,4$ ng/ml; 1 vs 2: $p < 0,005$, 2 vs 3: $p < 0,0005$, 1 vs 3: $p < 0,0001$), jedoch nicht für die CRP-Konzentrationen.

Interpretation

Thrombozytopenische Patienten mit SIRS und MODS nach CPB weisen eine im Vergleich zu Kontrollen deutlich verringerte ADAMTS-13-Aktivität bei exzessiver endothelialer Freisetzung von vWF und daraus resultierendem Auftreten von sm-vWF auf. Wir stellen die Hypothese auf, dass der über sm-vWF vermittelten gesteigerten Thrombozytenaggregation eine potentiell bedeutsame Rolle in der Entstehung und Progression eines MODS bei Patienten nach CPB zukommt.

Literatur

1. Moake J.L. Thrombotic microangiopathies. *N Engl J Med*, 2002; 347:589-600.
2. Levy G.G., Nichols W.C., Lian E.C. et al. Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Nature*, 2001;413:488-494.
3. Vincent J.L., Yagushi A., Pradier O. Platelet function in sepsis. *Crit Care Med*, 2002;30:S313-317.

Kontinuierliche thorakale epidurale Bupivacain 0,5% -Infusion verhindert die mukosale intestinale Mikrozirkulationsstörung bei nekrotisierender Pankreatitis an der Ratte

H. Freise¹, V. Hlouschek², S. Anthonsen¹, M.M.Lerch³, H. Van Aken¹ und A. Sielenkämper¹

¹ Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin, Universitätsklinikum Münster

² Medizinische Klinik und Poliklinik B, Universitätsklinikum Münster

³ Klinik und Poliklinik für Innere Medizin A, Universitätsklinikum Greifswald

Hintergrund

Morbidität und Mortalität der akuten nekrotisierenden Pankreatitis werden von der Ausbildung eines SIRS mit Mehrorgandysfunktion und der Infektion pankreatischer Nekrosen bestimmt [1]. Dem Darm wird hierbei aufgrund einer gestörten Mukosabarriere und konsekutiver bakterieller Translokation eine zentrale Rolle zugesprochen [2]. Insbesondere trägt die mukosale Mikrozirkulationsstörung entscheidend zum Verlust der Integrität der Barrierefunktion bei.

Die thorakale Periduralanästhesie (thPDA) induziert eine regionale Sympathikolyse, die das intestinale Stromgebiet einschließt. An gesunden Ratten wurde dabei eine Zunahme der mukosalen Perfusion trotz Blutdruckabfall nachgewiesen [3]. Ziel dieser Studie war es, den Einfluss einer kontinuierlichen thorakalen Periduralanästhesie mit Bupivacain 0,5% auf die mukosale Mikrozirkulation bei nekrotisierender Pankreatitis an der Ratte zu untersuchen.

Material und Methode

28 männliche Sprague-Dawley-Ratten wurden randomisiert in 4 Gruppen (n = 7) eingeteilt: Scheinoperation (I), untherapierte Pankreatitis (II), Pankreatitis mit sofortiger thPDA (III), Pankreatitis mit um 7 Stunden verzögerter thPDA (IV).

Alle Tiere erhielten zentralvenöse und arterielle Katheter. Peridural-katheter (PE10, OD 0,63 mm) wurden über einen lumbalen Zugang eingeführt und auf Höhe Th 5 - 7 platziert. Eine nekrotisierende Pankreatitis wurde durch retrograde Injektion von 2 ml/kg 5%-igem Tauro-cholat in den Gallengang induziert. Der Volumenersatz erfolgte mit 2 ml/h NaCl 0,9% i.v. Nach Pankreatitisinduktion erhielten die Gruppen I und II 15 µl/h NaCl 0,9 % epidural, während in Gruppe III 15 ml/h Bupivacain 0,5% epidural infundiert wurden. In der Gruppe IV wurde 7 h nach Induktion der Pankreatitis die Bupivacaingabe begonnen.

15 Stunden nach Pankreatitisinduktion wurden die Tiere erneut anästhesiert und maschinell ventiliert. Die Mukosa des distalen Ileums wurde vorsichtig zur Intravitalmikroskopie präpariert und 6 - 10 Villi wurden für 60 Sekunden auf Video aufgezeichnet. Ein geblinder Untersucher maß die Zwischenkapillarfläche aller Kapillaren (ZKF total) sowie die ZKF der kontinuierlich perfundierten Kapillaren (ZKF kont) und berechnete den Blutfluss in den terminalen Arteriolen. Die Serumspiegel von Amylase und

IL-6 wurden bestimmt. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die Daten wurden mittels One-way-ANOVA und Student-Newman-Keuls-Test analysiert. $p < 0,05$ wurde als signifikant bewertet.

Ergebnisse

Alle Tiere überlebten den Zeitraum von 15 h. Die akute Pankreatitis führte zu einer kapillären Mikrozirkulationsstörung, die durch eine erhöhte ZKF total (Abb. 1A), vor allem aber durch eine Zunahme intermittierender Perfusion („Stop and go flow“) gekennzeichnet war (Abb. 1B). Der mukosale Blutfluss war stark vermindert (Abb. 1C). Unter thPDA (III) erreichten die kapilläre Perfusion und der terminal-arteriöle Blutfluss das Niveau der Kontrollgruppe. Auch in Gruppe IV wurde eine deutliche verminderte Mikrozirkulationsstörung dokumentiert (Abb. 1 A-C).

Durch die akute Pankreatitis kam es zu einem Anstieg der Amylase-Aktivität im Serum auf 4500 U/l ($p < 0,001$ vs. I), der durch thPDA nicht beeinflusst wurde. Die IL-6-Spiegel stiegen bei Pankreatitis von 85 ± 20 ng/ml auf 142 ± 24 ng/ml ($p < 0,01$ vs. I). Unter verzögerter Therapie mit thPDA (IV) wurde kein Anstieg von IL-6 (99 ± 24 ng/ml; $p < 0,02$ vs. II) registriert.

Diskussion

Die kontinuierliche thorakale epidurale Infusion von Bupivacain 0,5% verhinderte die Pankreatitis-assoziierte intestinale Mikrozirkulationsstörung. Sowohl der mukosale Blutfluss als auch die kapilläre Perfusion wurden gesteigert. Die thPDA war in diesem Modell auch wirksam, wenn sie bei bereits fortgeschrittenem Krankheitsverlauf eingesetzt wurde. Möglicherweise kann durch thPDA die funktionelle Integrität der Darmbarriere erhalten und somit ein therapeutischer Einfluss auf die systemischen Komplikationen der Pankreatitis erzielt werden.

Literatur

- Steinberg W., Tenner S.: Acute Pancreatitis. N Eng J Med 1994; 330: 1198-1208
- Cicalese L., Sahai A., Sileri P., Rastellini C., Subbotin V., Ford H., Lee K.: Acute pancreatitis and bacterial translocation. Dig Dis Sci 2001; 46: 1127-1132
- Sielenkämper A.W., Eicker K., Van Aken H.: Thoracic epidural anesthesia increases mucosal perfusion in the ileum of rats. Anesthesiology 2000; 93: 844-851.

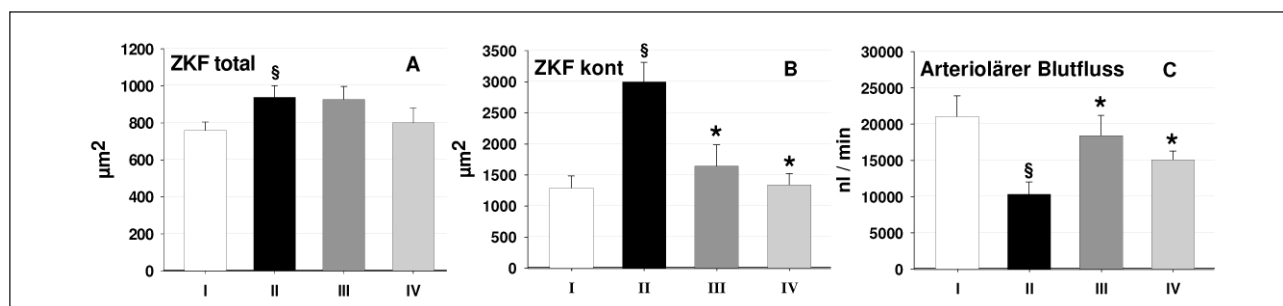


Abbildung 1 A-C: Intravitalmikroskopische Befunde; § $p < 0,05$ vs. I, * $p < 0,05$ vs. II.

Reduktion der systemischen Inflammation nach CPR verbessert die Organfunktion

A. Menzebach, B. Weitkamp, H. Gammel, N. Boese, M. Lox, K. Jurk, H. Van Aken und G. Theilmeier
Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin, Universitätsklinikum Münster

Fragestellung

Nur etwa 10% aller Patienten, die einen Herzstillstand erleiden, verlassen lebend das Krankenhaus. Die zum Herzstillstand führende Grunderkrankung ist nicht immer ursächlich für die Mortalität. So treten häufig Einzel- oder Multiorganversagen als Folge der globalen Hypoxie mit anschließender Reperfusion auf. Durch den hypoxischen Zellschaden kommt es im Rahmen der Gewebereparatur zu einer Rekrutierung neutrophiler Granulozyten (PMN), die eine überschießende Entzündungsreaktion und dadurch einen weiteren Gewebeschaden verursachen. Daher hat das Reperfusionssyndrom nach globaler Hypoxie klinisch große Ähnlichkeit mit dem systemischen inflammatorischen Response Syndrom (SIRS) [1]. Eine Modulation der Entzündung könnte den Reperfusionsschaden reduzieren. Wir haben ein Mausmodell der Cardiopulmonalen Reanimation (CPR) adaptiert, um die Rolle des interzellulären Adhäsionsmoleküls-1 (ICAM-1) für das Post-CPR-Syndrom zu untersuchen [2].

Methodik

Nach Zustimmung der Tierschutzkommission wurden Propofol-anästhesierte Swiss-Mäuse intubiert und mit 2% Isofluran in O₂ ventiliert. Ein venöser und ein arterieller Katheter wurden in A. und V. femoralis eingebracht. EKG und arterieller Blutdruck wurden kontinuierlich gemessen. Über eine transösophageale Sonde wurde elektrisch (10V, 50 Hz) Kammerflimmern induziert, die Beatmung wurde unterbrochen. Nach 5 Minuten Kreislaufstillstand wurden die Tiere reanimiert (Herzdruckmassage, 100% O₂, Epinephrin, Defibrillation). Die Kontrollgruppe (Sham) wurde nur instrumentiert. Die sensorische Leistung der Mäuse wurde durch Balancetests geprüft. Einige Tiere erhielten nach der CPR verblindet 100 µg Kontroll-IgG (IgG) oder anti-ICAM-1 Antikörper intraperitoneal (Klon 3E2, Pharmingen, aICAM). ICAM- und VCAM-Expression in Hirn, Niere und Leber wurde mit Western Blotting semiquantitativ untersucht. Die Aktivierung zirkulierender PMN wurde durch Fluoreszenzmetrisch mittels CD11b-Expression bestimmt. Die PMN-Rekrutierung in Leber und Niere wurde immunhistochemisch quantifiziert. Kreatinin-, Harnstoff- und ALT-Bestimmung erfolgten mit kommerziellen Kits (Sigma). Die Daten wurden nicht parametrisch getestet.

Ergebnisse

Die Induktion von Kammerflimmern verursachte eine ausgeprägte Hypoxie (pO₂ = 29 ± 12, n = 4), Hyperkapnie (pCO₂ = 101 ± 22, n = 4) und Azidose (pH = 6,83 ± 0,08, n = 4), die sich unter den CPR-Maßnahmen normalisierten. Unmittelbar nach CPR waren zirkulierende PMN im Vergleich zu Sham-Tieren signifikant aktiviert (21 ± 7 vs. 32 ± 8 [mean fluorescence], n = 5, p < 0,05). CPR-Tiere zeigten nach 48 Stunden ein deutliches sensorisches Defizit (Abb. 1). 24 Stunden post-CPR waren im Western Blot in Hirn, Leber und Niere ICAM-1 und VCAM-1 deutlich induziert. Das Serum-Kreatinin (0,06 ± 0,03 vs. 0,16 ± 0,02 [mg/dl] n = 11, p < 0,05) und die Serum-ALT-Aktivität (24 ± 3 vs. 53 ± 11 [U/l], n = 7, p < 0,05) stiegen im

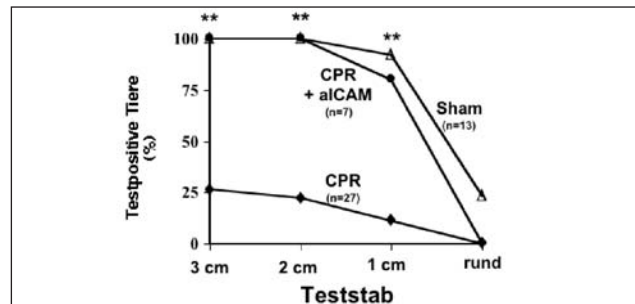


Abbildung 1: Die neurologische Leistung der CPR- ist 48 h nach CPR signifikant schlechter als die der Sham-Gruppe. Mit aICAM behandelte Tiere zeigen am Tag 2 nach CPR eine signifikant bessere sensorische Leistung als unbehandelte CPR-Mäuse. (**-p < 0,01 aICAM CPR, Fisher's Exact-Test).

Vergleich zu Sham nach 48 Stunden signifikant an, die Harnstoff/Kreatinin-Ratio (224 ± 77 vs. 96 ± 10, n = 12, p < 0,05) fiel signifikant ab. In Leber und Niere fanden sich 48 Stunden nach CPR vermehrt PMN im Vergleich zu Sham-Organen, wobei dieser Anstieg in der Niere nicht signifikant war. (Leber: 5 ± 1 vs. 88 ± 23 [PMN/mm²], n = 7, p < 0,05; Niere: 23 ± 7 vs. 39 ± 22 [PMN/mm²], n = 9, p = NS). Der ICAM-blockierende Antikörper (aICAM) reduzierte die PMN-Dichte in der Leber signifikant (32 ± 8 vs. 87 ± 23 [PMN/mm²], aICAM vs. IgG, n = 7/7, p < 0,05) in der Niere jedoch nicht (11 ± 2 vs. 39 ± 22 [PMN/mm²], aICAM vs. IgG, n = 5/9, p = NS). Die ALT-Aktivität war signifikant reduziert (22 ± 2 vs. 53 ± 11 [U/l], aICAM vs. IgG, n = 5/7, p < 0,05), während das Kreatinin nicht sank (0,19 ± 0,07 vs. 0,16 ± 0,02 [mg/dl], aICAM vs. IgG, n = 6/11, p = NS). Die neurologische Leistung der aICAM-behandelten Mäuse war deutlich verbessert (Abb. 1).

Interpretation

Ein 5-minütiger Kreislaufstillstand aktiviert das Endothel von Hirn, Leber und Niere sowie zirkulierende Leukozyten und führt zu einer generalisierten Entzündungsreaktion. Während die Funktionsstörung von Leber und ZNS partiell auf das Reperfusionssyndrom nach globaler Hypoxie zurückzuführen sind, ist die Nierenfunktionsstörung von PMN unabhängig. Eine Unterdrückung des Post-CPR-SIRS kann Organfunktionsstörungen, darunter neurologische Konsequenzen eines Herzstillstandes, verbessern, soweit sie vom Reperfusionsschaden abhängig sind.

Literatur

1. Adrie C. et al. Circulation 2002; 106(5):562-8.
2. Boettiger B.W. et al. Brain Res Mol Brain Res. 1999; 65(2):135-42.

Endothelin-1 hat keinen Einfluss auf die Regulation der hepatischen Mikrozirkulation im Ischämie/Reperfusion-induzierten frühen SIRS

C. Wunder¹, O. Eichelbröner¹, S. Frantz², W. Göttlich³, H. Morawietz³ und N. Roewer¹

¹ Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie, Julius-Maximilians-Universität Würzburg

² Medizinische Klinik, Julius-Maximilians-Universität Würzburg

³ Medizinische Klinik, Universitätsklinikum Carl Gustav Carus, TU Dresden

Fragestellung

Endothelin-1 (End-1) ist ein in der Leber gebildetes vasoregulatorisches Protein. Es bindet an spezifische Endothelin-A (ET-A) und Endothelin-B (ET-B) Rezeptoren und führt in der Mikrozirkulation hauptsächlich zu einer Vasokonstriktion. In der Sepsis [1] verursacht End-1 eine ausgeprägte Störung der Gewebepfusion und nach hämorrhagischem Schock [2] eine Vasokonstriktion der Sinusoide. Im Gegensatz dazu ist in der Frühphase der systemischen Entzündungsreaktion (SIRS - systemic inflammatory response syndrome) die Rolle von Endothelin-1 weitgehend unbekannt. Ziel die-

ser Studie ist es, die hepatische Expression von End-1 und seiner Rezeptoren sowie deren Einfluss auf die Mikrozirkulation und Organfunktion der Leber im frühen SIRS zu evaluieren.

Methodik

Nach behördlicher Genehmigung wurde bei C57BL/6 Mäusen in Isofluranarkose die A. carotis int. zur Blutdruckmessung kanüliert und über die V. jug. ext. 0,4ml/h NaCl 0,9% zur Aufrechterhaltung eines normotensiven Blutdruckes infundiert. (n=7 für alle Gruppen). Einer 60 min.

Ischämie beider Hinterläufe (Tourniquet oberhalb des Trochanter major) folgte eine 3 Std. oder 6 Std. Reperfusionphase. Die mRNA Expression von Endothelin-1 und der Rezeptorsubtypen ET-A und ET-B wurde mittels real time RT-PCR quantifiziert und gegen ribosomale RNA standardisiert. ET-A und ET-B Rezeptoren wurden mit Tezosentan (Ro-61-6612; 10 mg/kgKG i.v.) spezifisch blockiert. Mit der Intravitalvideomikroskopie wurde der Durchmesser sowie die Blutflussgeschwindigkeit in den Sinusoiden und als Marker des mitochondrialen Redoxstatus die NADH Autofluoreszenz erfasst. Propidium Iodide (PI) markierte Hepatozyten dienten als Maß für die Leberzellschädigung. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (ANOVA; $p < 0.05$; mean \pm SEM).

Ergebnisse

1/3 Std. und 1/6 Std. Ischämie/Reperfusion (I/R) führt zu keiner signifikant erhöhten Expression von End-1 mRNA (Abb. 1). Shamtiere (Katheter, Lap.-tomie) exprimieren mehr ET-A und ET-B Rezeptoren mRNA als Kontrolltiere (gesunde Tiere ohne Intervention). Mit I/R behandelte Tiere zeigen jedoch im Vergleich zu Shamtieren keine signifikanten Unterschiede in der End-1, ET-A und ET-B mRNA Expression (Abb. 2). Eine 1/6 Std. I/R führt zu einer Zunahme des Leberzellschadens, einer Reduktion des Blutflusses in den Sinusoiden und einer Verminderung der Geweboxygenierung ($p < 0,05$). Die funktionelle Blockade der ET-A und ET-B Rezeptoren mittels Tezosentan bei I/R behandelten Tieren hatte keinen Einfluss auf die Mikrozirkulation, das Ausmaß des Zellschadens oder den mitochondrialen Redoxstatus im Vergleich zu nur mit I/R behandelten Tieren.

Interpretation

In einem normotensiven SIRS mit Ischämie/Reperfusion induzierten Störungen der Lebermikrozirkulation und der Leberfunktion kommt es weder zu einer vermehrten Expression von Endothelin-1 mRNA noch zu einer vermehrten Bildung von ET-A und ET-B Rezeptoren mRNA. Anders als in

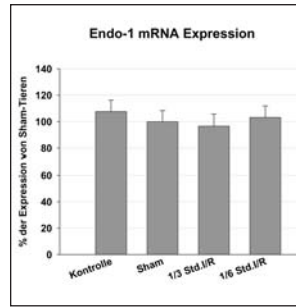


Abbildung 1

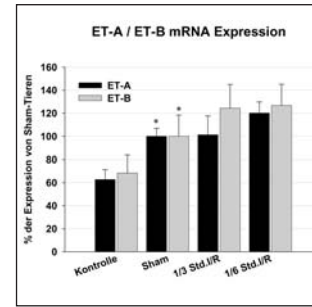


Abbildung 2

der Sepsis und im hämorrhagischen Schock, wo Endo-1 und seine Rezeptoren die Mikrozirkulationsstörungen mit verursachen, spielen Endothelin-1 und seine Rezeptoren im gestörten Gleichgewicht zwischen Vasokonstriktion und Vasodilatation der Lebermikrozirkulation im frühen SIRS keine wesentliche Rolle.

Literatur

1. Baveja R., Kresge N., Ashburn J.H. et al. Potentiated hepatic microcirculatory response to endothelin-1 during polymicrobial sepsis. Shock 2002; 18: 415-22.
2. Rensing H., Bauer I., Zhang J.X. et al. Endothelin-1 and heme oxygenase-1 as modulators of sinusoidal tone in the stress-exposed rat liver. Hepatology 2002; 36: 1453-65.

Regulierung der vaskulären Barrierefunktion während Hypoxie: Bedeutung der CD73 Ecto-5'-Nucleotidase

H. K. Eltzschig^{1,2}, L. F. Thompson⁴, J. C. Ibla^{2,3}, C. J. Van De Wiele⁴, R. Resta⁴, J. Morote-Garcia² und S. P. Colgan²

- ¹ Abteilung für Anaesthesiologie und Intensivmedizin, Universitätsklinikum Tübingen
- ² Center for Experimental Therapeutics and Reperfusion Injury, Department of Anesthesiology, Perioperative and Pain Medicine, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School
- ³ Department of Anesthesiology, Children's Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA
- ⁴ Immunobiology and Cancer Program, Oklahoma Medical Research Foundation, Oklahoma City, USA

Fragestellung

Vieles weist darauf hin, dass eine extrazelluläre Vermehrung von Adenosin entscheidend zur Adaption an Hypoxie beiträgt (1). Extrazelluläres Adenosin entsteht aus der Phosphohydrolyse von Adenin-Nucleotiden, welche beispielsweise von neutrophilen Granulozyten freigesetzt werden (2, 3). Dieser Stoffwechselweg wird kontrolliert durch den terminalen enzymatischen Stoffwechselschritt, die Umwandlung von Adenosin-Monophosphat zu Adenosin, welcher durch die Hypoxie-induzierte Ecto-5'-nucleotidase (CD73) katalysiert wird (4). Aus früheren Arbeiten ist bekannt, dass eine Hypoxie-induzierte vaskuläre Permeabilitätsstörung zumindest teilweise durch eine Anhäufung von extrazellulärem Adenosin kompensiert werden kann (2). Somit stellen wir Mäuse mit einem gezielten Knock-out von cd73 her, um zu zeigen, dass die durch CD73 katalysierte, extrazelluläre Adenosin Bildung einen protektiven Stoffwechselweg darstellt, um einer durch Hypoxie-induzierten vaskulären Barriereerstörung entgegenzuwirken (1).

Methodik

Die cd73-knockout-Mäuse (cd73^{-/-}) wurden durch eine gezielte Zerstörung des 3. Kodierungs-Exon hergestellt. Die Messung der vaskulären Permeabilität erfolgte nach intravenöser Gabe von Evans Blue und einer 4-stündigen Hypoxie-Exposition (8% Sauerstoffkonzentration). Zur Ermittlung der vaskulären Permeabilität wurde nach Entnahme der Organe eine Formamid-Extraktion durchgeführt und die Evans-Blue-Konzentration photometrisch bestimmt (Wellenlänge: 610 nm).

Ergebnisse

Die cd73^{-/-}-Mäuse sind vermehrungsfähig, zeigen normale Gewichtszunahme und scheinen ein intaktes Immunsystem zu besitzen. Die vaskuläre Permeabilität ist in verschiedenen Organen signifikant erhöht (Abb. 1). Darüber hinaus ist die Zunahme der vaskulären Permeabilität nach

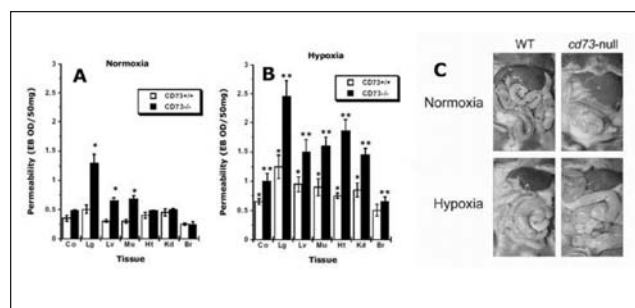


Abbildung 1: Vaskuläre Permeabilität von cd73-knockout-Mäusen in vivo: Kontrolltieren und cd73^{-/-}-Mäusen wurde intravenös Evans Blue verabreicht (0.2 ml, 0.5% in PBS), gefolgt von einer 4-stündigen Exposition bei Raumluft (A) oder Hypoxie (B, 8% O₂, 92% N₂). Anschließend wurden die Tiere getötet, und das Colon (Co), die Lunge (Lg), die Leber (Lv), Muskel (Mu), Herz (Ht), Niere (Kd) und das Gehirn (Br) entnommen. Die Evans-Blue-Konzentration wurde durch eine Formamid-Extraktion (55°C für 2 h) und Messung der Absorption bei 610 nm mit Subtraktion der Kontrollwellenlänge bei 450 nm durchgeführt. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SD der Evans Blue OD/50 mg Organ dargestellt. Jeweils 4 - 6 Tiere wurden pro Ansatz verwendet. C: Bilder des eröffneten Abdomens vor der Organentnahme. Einzelner Stern: Signifikante Unterschiede zwischen cd73^{+/+} und cd73^{-/-}-Tieren ($p < 0.025$). Doppelter Stern: Signifikante Unterschiede zwischen Hypoxie und Normoxie ($p < 0.01$).

Hypoxie-Exposition dramatisch verstärkt. Besonders ausgeprägt sind diese Unterschiede in der Lunge (Abb. 2). Die durch Hypoxie induzierte Störung

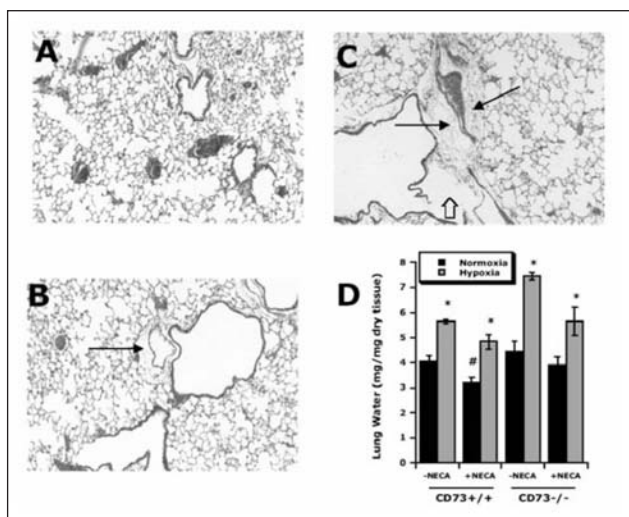


Abbildung 2: Untersuchung der Lungen von cd73-knockout-Mäuse: Kontroll-Tiere (A, B) oder cd73^{-/-}-Mäuse (C) wurden für 4 Stunden unter normoxischen (A) oder hypoxischen (B, C) Bedingungen gehalten. A: repräsentativer Schnitt der Lunge eines normoxischen Kontrolltieres (100-fache Vergrößerung). B: geringrandiges perivaskuläres Ödem nach Hypoxie-Exposition (Pfeil). C: ausgeprägtes perivaskuläres Ödem von hypoxischen cd73^{-/-}-Mäusen. D: Messung des Lungenwasser-Gehaltes von normoxischen (schwarze Balken) und hypoxischen (graue Balken) Mäusen mit und ohne die Gabe des Adenosinrezeptor Agonisten NECA (0,1 mg/mg i.p. und 0,1 mg/kg s.q.). Daten sind als Mittelwert \pm SD mg H₂O/mg trockenes Gewebe ausgedrückt (4 Tiere pro Ansatz). Einzelner Stern (*): Signifikante Unterschiede zwischen Hypoxie und Normoxie ($p < 0,025$). Kreuz (#): Signifikante Unterschiede zwischen NECA-Gabe und Kontrolle ($p < 0,025$).

der Barrierefunktion von cd73^{-/-}-Mäuse kann nahezu vollständig durch die Verabreichung von löslicher 5'-Nucleotidase verhindert werden. Die histologische Untersuchung der Lungen von normoxischen cd73^{-/-}-Mäusen zeigt ein perivaskuläres Lungenödem mit inflammatorischen Infiltraten, das nach Hypoxie-Exposition deutlich verstärkt ist.

Interpretation

Die durchgeführten in vivo Experimente bestätigten die Hypothese, dass die Erzeugung von extrazellulärem Adenosin durch CD73 zur Protektion der vaskulären Barrierefunktion unter hypoxischen Bedingungen beiträgt. Zusammenfassend ist festzustellen, dass CD73 eine kritische Rolle bei der Regulierung der vaskulären Barrierefunktion zukommt, sowohl unter normoxischen als auch unter hypoxischen Bedingungen.

Literatur

- Eltzschig H.K., Thompson L.F., Karhausen J., Cotta R.J., Ibla J.C., Robson S.C., Colgan S.P. Endogenous adenosine produced during hypoxia attenuates neutrophil accumulation: Coordination by extracellular nucleotide metabolism. *Blood*:2004-2006-2066.
- Eltzschig H.K., Ibla J.C., Furuta G.T., Leonard M.O., Jacobson K.A., Enjoji K., Robson S.C. and Colgan S.P. Coordinated Adenine Nucleotide Phosphohydrolysis and Nucleoside Signaling in Posthypoxic Endothelium: Role of Ectonucleotidases and Adenosine A2B Receptors. *J Exp Med* 2003;198:783-796.
- Lennon P.F., Taylor C.T., Stahl G.L., Colgan S.P. Neutrophil-derived 5'-Adenosine Mono-phosphate Promotes Endothelial Barrier Function via CD73-mediated Conversion to Adenosine and Endothelial A2B Receptor Activation. *J. Exp. Med.* 1998;188:1433-1443.
- Synnestvedt K., Furuta G.T., Comerford K.M., Louis N., Karhausen J., Eltzschig H.K., Hansen K.R., Thompson L.F., Colgan S.P. Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia. *J Clin Invest* 2002;110:993-1002.

Externe Negativdruckbeatmung (ENDB) mit dem Kammer-Respirator – erste klinische Anwendungserfahrungen bei 6 intubierten Patienten mit ARDS

K. Raymondos und S. Piepenbrock

Abteilung Anästhesiologie, Medizinische Hochschule Hannover,

Einleitung und Fragestellung

Während intermittierender Positivdruckbeatmung wurde kontinuierlicher externer Negativdruck mit einem Kuirass bei intubierten Patienten durchgeführt [1]. Im Vergleich zu PEEP wurden hämodynamische Vorteile beobachtet [1]. Allerdings verschlechtert der Kuirass die Thoraxcompliance, und eine effektive Beatmung von ARDS-Patienten ist mit Kuirass-Ventilatoren nicht möglich. Mit einem in unserer Klinik konstruierten Tankrespirator untersuchten wir die physiologischen Effekte von ENDB bei intubierten ARDS-Patienten [2]. ENDB war bei äquivalenten Atemzug- und end-expiratorischen Lungenvolumina und sich verbessernder Hämodynamik effizienter als die Positivdruckbeatmung [2]. Allerdings war die Anwendbarkeit und die Praktikabilität des Tankrespirators bei schwerkranken Intensivpatienten eingeschränkt. Daher wurde der Kammer-Respirator entwickelt und in unserer Klinik konstruiert [3]. Im Rahmen einer Pilotstudie sollten erste klinische Erfahrungen mit diesem Respirator gesammelt und seine Effizienz untersucht werden.

Methodik

Der pyramidenförmige Kammer-Respirator besteht aus transparentem Akryl [3]. Flügeltüren an beiden Seiten und eine am Kopfende ermöglichen einen schnellen Zugang zum Patienten. Der Patient wird vollständig im Inneren der Kammer auf einer emulsionsgefüllten Matratze gelagert. Die Druckschwankungen im Inneren der Kammer werden durch eine triggerbare Turbinen-getriebene Pumpe erzeugt (Coppa, Biella, Italien). Über spezielle Schächte werden Beatmungsschläuche, Infusionsleitungen, Überwachungskabel, Drainagen und weitere Verbindungen schnell ohne Diskonnektionen eingeführt. Über die an einem konventionellen Intensivrespirator (Evita 4, Dräger, Lübeck) konnektierten Beatmungsschläuche wurde über den Kammer-Respirator im BIPAPassistent-Modus eine Druckunterstüt-

zung getriggert. Bei Öffnung des Kammer-Respirators erfolgte – nach vorheriger Anpassung der Beatmungsdrukke – erneut die konventionelle Positivdruckbeatmung im BIPAP-Modus. Bei beiden Beatmungsformen wurden Atemzugvolumina von 6 - 8 ml/kg appliziert. Intraindividuell wurden die über die ENDB-Intervalle gemittelten Parameter mit den Werten während der Positivdruckbeatmung verglichen. Hierfür wurde der Wilcoxon-Rank-Test verwendet.

Ergebnisse

Der Kammer-Respirator war bei 6 ARDS-Patienten 51 mal über eine Zeit von insgesamt 356 Stunden im klinischen Einsatz. Er wurde bei den einzelnen Patienten in 1 bis 18 Intervallen insgesamt 7 bis 133 Stunden lang angewendet. Die Intervallzeiten reichten im Median von 3,8 bis 7 Stunden. Im intraindividuellen Vergleich war die Dauer der ENDB verglichen mit der konventionellen Positivdruckbeatmung nicht signifikant unterschiedlich. Während der ENDB reichten die medianen Kammerdrücke inspiratorisch von -28 bis -35 cmH₂O und expiratorisch von -14 bis -19 cmH₂O. Die unter ENDB zusätzlich verwendeten medianen Beatmungsdrukke reichten inspiratorisch von 10 bis 21 cmH₂O und expiratorisch von 0 bis 14 cmH₂O. Diese Werte lagen deutlich und bei 5 Patienten signifikant unter den während der Positivdruckbeatmung applizierten Drücken (Medianwerte; Plateaudrücke von 30 bis 41 cmH₂O und PEEP von 16 bis 23 cmH₂O). Außer bei der ersten Patientin, bei der eine ausgeprägte Fibrose vorlag, verbesserten sich bei den übrigen fünf Patienten bei allen 43 Applikationen des Kammer-Respirators die über das Intervall gemittelten PaO₂/FiO₂-Werte im Vergleich zum jeweils vorhergehenden Intervall unter Positivdruckbeatmung. Die medianen PaO₂/FiO₂-Werte stiegen um 39 bis 95 mmHg, und diese Verbesserung war bei vier Patienten signifikant. Nach Abschluß der Negativdruckbeatmung war der erste PaO₂/FiO₂-Wert unter konventioneller Positivdruck-

beatmung in 42 von 51 Fällen niedriger im Vergleich zum Vorwert unter Kammer-Respirator-Applikation. Bei den über die Intervalle gemittelten PaCO₂- und pH-Werten fanden sich keine signifikanten Unterschiede.

Interpretationen

Mit dem Kammer-Respirator wurde ein Gerät konstruiert, mit dem erstmalig bei intubierten ARDS-Patienten ENDB im Rahmen der intensivmedizinischen Routineversorgung praktikabel und effizient durchgeführt werden konnte. Diese ersten klinischen Anwendungsbeobachtungen stellen die Grundlagen für systematische, prospektive Untersuchungen der ENDB mit dem Kammer-Respirator bei intubierten und auch nicht-intubierten ARDS-Patienten dar.

Literatur

1. Scholz SE., Knothe C., Thiel A., Hempelmann G.: Improved oxygen delivery by positive pressure ventilation with continuous negative external chest pressure. *Lancet* 349 (1997)1295-6.
2. Raymonds K., Capewell M., Molitoris U., Verner L., Heine J., Piepenbrock S: Externe Negativdruckbeatmung (ENDB) im Vergleich zur Positivdruckbeatmung (PDB) bei intubierten ARDS-Patienten. *Intensivmedizin und Notfallmedizin* 39 Suppl. 1 (2002) I/21.
3. Raymonds K. Der Kammer-Respirator - Ein neues Gerät zur externen Negativdruckbeatmung (ENDB) schwerkranker Intensivpatienten. *Intensivmedizin und Notfallmedizin* 39 Suppl. 1 (2002) I/21.

Detektion lokaler Sauerstoffpartialdrücke im Tierversuch und bei Patienten mit chronischer thromboembolischer pulmonaler Hypertonie mittels ³Helium-MRT

K. Markstaller¹, A. Herweling¹, A. Stepniak¹, C.P. Heussel², W.G. Schreiber² und B. Eberle¹

¹ Klinik für Anästhesiologie der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

² Klinik für Radiologie der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

Fragestellung

Die Magnetresonanztomographie der Lunge mit laserpolarisiertem ³Helium (³HeMRT) ermöglicht eine nichtinvasive Bildgebung des eingeatmeten ³He [1] und Berechnung des lokalen intrapulmonalen Sauerstoffpartialdruckes P_RO₂ [2, 3]. Mittels einer selbst erstellten Software kann dabei ein Mapping der intrapulmonalen Sauerstoffkonzentration und dessen regionale Abnahmerate dargestellt werden. Wir untersuchten (1), ob im Tierexperiment damit eine durch periphere Pulmonalarterienokklusion induzierte regionale Gasaustauschstörung detektiert und lokalisiert werden kann und (2), ob diese Methode auch bei Patienten mit chronischer thromboembolischer pulmonaler Hypertonie (CTEPH) regionale Inhomogenitäten des alveolären Sauerstoffpartialdruckes nachweisen lässt.

Methodik

Mit Genehmigung der Tierschutzkommission wurde in 6 anästhesierten, beatmeten Schweinen (24 - 29 kg; FIO₂ = 0,29) je eine Kaudallappenarterie mittels eines angiographisch lagekontrollierten Ballonkatheters okkludiert. Pulmonalisdrukke und physiologische Totraumfraktion wurden gemessen und der belüftete Lungenraum mittels der O₂-sensitiven ³He-MRT dargestellt (1,5 T-MRT; Doppel-Akquisition im Atemhalt; Inhalation von je 5 ± 1 ml / kg KG ³He, 39% polarisiert). Lungenregionen "at risk" (LRAR) wurden in perfundiertem und okkludiertem Zustand hinsichtlich maximaler Signalintensität (SNR), des P_RO₂ sowie dessen zeitlicher Abnahmerate RO₂(t) verglichen.

Daraufhin wurde mit Genehmigung der Ethikkommission und Patienteneinverständnis bei 6 Patienten mit CTEPH (mittlerer pulmonalarterieller (PA)-Druck 51 mmHg) nach konventioneller Diagnostik (CT, Pulmonalangiographie, MR-Angiographie) der belüftete Lungenraum mittels der O₂-sensitiven ³He-MRT dargestellt (3,5 ml ³He-/kg KG, 50% polarisiert; FIO₂ = 0,21). Lungenregionen, die nach konventionellen Angiographie-Verfahren distal zentraler PA-Okklusionen lagen, wurden als LRAR definiert und mit perfundierten Regionen verglichen (nicht parametrische Testverfahren).

Ergebnisse

Im Tierexperiment zeigten perfundierte (P) im Vergleich zu hypoperfundierten (H) Regionen einen endinspiratorisch signifikant erhöhten P_RO₂ (P: 148 (107/195) vs. H: 186 (148/265); Median (Min.-Max.); p < 0,02) und während kurzer Apnoe eine signifikant raschere Abnahme des P_RO₂ (RO₂(t), P: -3,0 (-4,2/-2,0) mm Hg/s vs. H: -0,9 (-3,1/+3,9) mm Hg/s; p < 0,02). In den Patienten mit CTEPH zeigten perfundierte Regionen im Vergleich zu hypoperfundierten Regionen während kurzer Apnoe ebenso eine signifikant raschere Abnahme des P_RO₂ (RO₂(t) (P: -3,9 (-4,6/-0,5) mm Hg/s vs. H: -1,1 (-4,1/+5,6) mm Hg/s; p = 0,03), jedoch keine wesentlichen Unterschiede im endinspiratorischen P_RO₂ (P: 131 (88-179) mmHg vs. H: 124 (63-153) mmHg; n.s.)

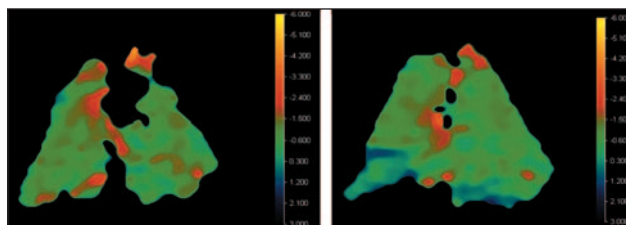


Abbildung 1: Regionale Verteilung der Abnahme des P_RO₂ (RO₂(t)) vor (links) und nach (rechts) Ballonokklusion der rechten Kaudallappenarterie im Tierversuch. Nach Perfusionseinschränkung zeigt sich rechts basal ein scharf begrenztes Areal mit signifikant verminderter Abnahme des P_RO₂.

Interpretation

Im Tierversuch bestätigt die regionale, ³He-MRT-basierte Messung des intrapulmonalen PO₂ die in nicht- oder hypoperfundierten Lungenbezirken zu erwartende Angleichung des regionalen alveolären PO₂ an den inspiratorischen PO₂ und zeigt deutlich die regionale Störung der O₂-Aufnahme in das Pulmonalkapillarblut. Die trotz Gefäßokklusion weitgehend unveränderte inspiratorische ³He-Signal-Verteilung reflektiert andererseits die aufrechterhaltene Ventilation der nicht perfundierten Lungenregionen. Bei Patienten mit chronischer Lungenembolie können regionale Gasaustauschstörungen (Hypoventilation bzw. Hypoperfusion) nicht invasiv über die Verlaufsmessung des intrapulmonalen PO₂ im Atemhalt detektiert und lokalisiert werden.

Literatur

1. Markstaller K., Kauczor H.U., Puderbach M., Mayer E., Viallon M., Gast K., Weiler N., Thelen M., Eberle B.: ³He MRI-based vs. conventional determination of lung volumes in patients after unilateral lung transplantation: A new approach to regional spirometry. *Acta Scand Anesth.* 46: 845-852 (2002).
2. Eberle B., Weiler N., Markstaller K., Kauczor H.U., Deninger A., Ebert M., Grossmann T., Heil W., Lauer L., Roberts T.P.L., Schreiber W., Surkau R., Dick W., Otten E.W., Thelen M.: Analysis of intrapulmonary O₂ concentration by MR imaging of inhaled hyperpolarized helium-3. *J Appl Physiol* 87: 2043-2052 (1999).
3. Deninger A.J., Eberle B., Bermuth J., Escat B., Markstaller K., Schmiedeskamp J., Schreiber W., Surkau R., Otten E., Kauczor H.U.: Assessment of a Single-Acquisition Imaging Sequence for Oxygen-Sensitive ³He MRI. *Magn Res Med* 47: 105-114 (2002).

Salzsäure-induzierte Lungenschädigung – Effekte einer frühen partiellen Flüssigkeitsbeatmung auf den Gasaustausch und das Überleben von Ratten

M.A. Pakulla, D. Obal, D. Seidel und S.A. Loer
Klinik für Anaesthesiologie, Universitätsklinikum Düsseldorf

Fragestellung

Die Aspiration von Säure führt zu einer biphasischen Schädigung der alveolokapillären Membran, bei der primär physikochemische und sekundär inflammatorische Reaktionen im Vordergrund stehen [1]. Eine partielle Flüssigkeitsbeatmung mit Perfluorokarbonen konnte in tierexperimentellen Studien den Gasaustausch, die Atemmechanik und die kapillären Filtrationsvorgänge nach Aspiration günstig beeinflussen [2, 3]. Unbekannt ist bisher, welche Rolle das zeitliche Intervall zwischen der Schädigung und Beginn der partiellen Flüssigkeitsbeatmung für die Effekte auf den Gasaustausch und die Überlebenszeit spielen.

Methodik

Mit Genehmigung der zuständigen Bezirksregierung wurden anästhesierte (α -Chloralose) und beatmete Ratten ($VT = 6 \text{ ml/kg}$; $f = 80 \text{ min}^{-1}$; $FiO_2 = 1,0$; $PEEP = 5 \text{ cmH}_2\text{O}$) randomisiert fünf Gruppen zugeteilt (je $n = 6$). Gruppe 1 diente als Kontrollgruppe, in den anderen Gruppen wurde ein subletaler Lungenschaden durch intratracheale Salzsäureinstillation ($2,5 \text{ ml/kg}$, $\text{pH } 1,0$) induziert. Tiere der Gruppe 2 wurden konventionell beatmet, die übrigen Tiere erhielten eine partielle Flüssigkeitsbeatmung ($5 \text{ ml/kg PF } 5080$, $3M$, Neuss). Diese wurde entweder 5 (Gruppe 3) oder 30 Minuten nach Schädigung (Gruppe 4 und 5) begonnen. Die Tiere der Gruppe 5 erhielten zusätzlich zur einmaligen Perfluorokarboninstillation eine kontinuierliche Applikation (5 ml/kg/h). Gemessen wurden kontinuierlich der PaO_2 , PaCO_2 und pH (Paratrend 7+) sowie die Überlebenszeit für einen Beobachtungszeitraum von 12 Stunden. Die Ergebnisse ($MW \pm SD$) wurden mittels Kruskal-Wallis-Test auf Signifikanz der Unterschiede ($p < 0,05$) geprüft.

Ergebnisse

Die Salzsäureinstillation führte zu einem Abfall des PaO_2 von 481 ± 37 auf $128 \pm 71 \text{ mmHg}$ innerhalb von 30 Minuten ($p < 0,05$). Während alle Tiere der Gruppen 2 und 4 innerhalb des Beobachtungszeitraumes starben (Abb. 1), überlebten 4 Tiere der Gruppe 3 und 2 Tiere der Gruppe 5. Wir fanden jedoch keine signifikanten Unterschiede im PaO_2 der geschädigten Tiere (Abb. 2).

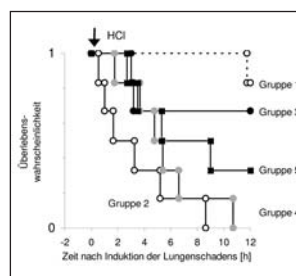


Abbildung 1: Kaplan-Meier-Diagramm.

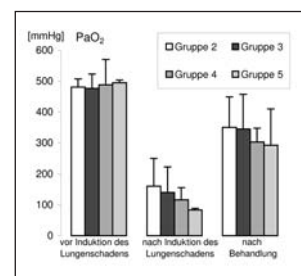


Abbildung 2: Effekte unterschiedlicher Beatmungsverfahren auf den PaO_2 .

Interpretation

Eine früh nach einer ausgedehnten Säureaspiration begonnene partielle Flüssigkeitsbeatmung vermag die Überlebenszeit gegenüber einem verspäteten Beginn zu verlängern. Die fehlenden Unterschiede in der arteriellen Oxygenierung der einzelnen Gruppen deuten jedoch darauf hin, dass neben dem Effekt auf den Gasaustausch andere Wirkungen einer partiellen Flüssigkeitsbeatmung, z.B. auf die inflammatorische Reaktion, eine entscheidende Rolle spielen.

Literatur

- Kennedy T.P., Johnson K.J., Kunkel R.G., Ward P.A., Knight P.R., Finch JS.: Acute acid aspiration lung injury in the rat: biphasic pathogenesis. *Anesth Analg* 1989; 69: 87-92
- Loer S.A., Tarnow J.: Partial liquid ventilation reduces fluid filtration of isolated rabbit lungs with acute hydrochloric acid-induced edema. *Anesthesiology* 2001; 94: 1045-1049
- Nader N.D., Knight P.R., Davidson B.A., Safaee S.S., Steinhorn D.M.: Systemic perfluorocarbons suppress the acute lung inflammation after gastric acid aspiration in rats. *Anesth Analg* 2000; 90: 356-361.

„Fade“ der forcierten Vitalkapazität deckt respiratorische Effekte einer partiellen neuromuskulären Blockade auf

M. Eikermann, H. Groeben und J. Peters
Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin, Universitätsklinikum Essen

Fragestellung

Eine partielle neuromuskuläre Blockade erhöht das Risiko postoperativer pulmonaler Komplikationen (1), kann jedoch weder mit den Sinnen des Anästhesisten noch mittels optischer oder taktile Abschätzung des muskulären „Fade“ nach Train-of-four (TOF)-Stimulation hinreichend erfasst werden (2). Selbst bei Anwendung eines quantitativen Monitoring (Accelerometrie) können respiratorisch relevante Effekte nicht ausgeschlossen werden (3), zumal sich die Wirkung von Muskelrelaxantien an verschiedenen Skelettmuskeln intraindividuell, mit interindividueller Variabilität, unterscheidet. Wir testeten die These, dass respiratorische Effekte einer neuromuskulären Blockade durch ein „Fade“ in der forcierten Vitalkapazität (FVC), d.h. eine Abnahme der FVC um mehr als 10% vom ersten zum zweiten konsekutiven spirometrischen, aufgedeckt werden können.

Methoden

Nach Zustimmung der Ethikkommission wurde bei 6 wachen Probanden die TOF-Ratio des M.adductor pollicis (Mechanomyographie) vor und nach Injektion von Rocuronium ($0,01 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1} + 2\text{-}10 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) alle 30 Sekunden gemessen. Während „steady state“-Relaxierung (TOF-ratio: 0,5 und 0,8) sowie alle 5 Minuten bis zur Erholung der TOF-ratio (1,0) wurden zudem zumindest drei konsekutive spirometrische Manöver (FVC, FEV₁, FIV₁) durchgeführt und deren Ergebnisse verglichen. Mc-Nemar-Test, $p < 0,05$.

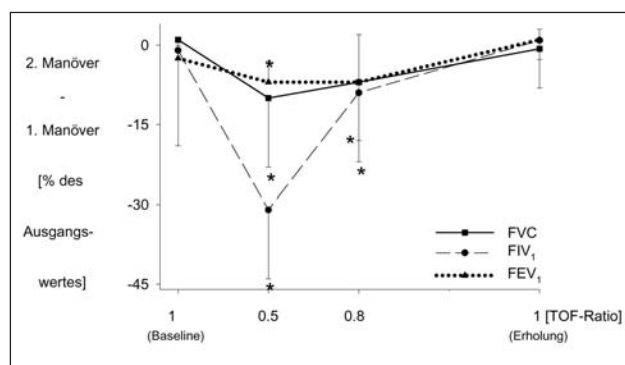


Abbildung 1

Ergebnisse

Insgesamt wurden 169 spirometrische Untersuchungen bei 6 Probanden durchgeführt. Während neuromuskulärer Blockade ($n = 129$ Messungen) nahmen FVC, FEV₁ FIV₁ mit dem zweiten spirometrischen Manöver ab

($p < 0.05$), es zeigte sich keine weitere Reduktion der Messwerte zwischen dem zweiten und dritten Manöver. Bei einer TOF-Ratio von 0.5 betrug das Fade der FVC, FEV1 und FIV1 10 [9 - 23] (Median [Inter Quartil Spannweite]), 7 [2 - 16] bzw. 31 [19 - 47] Prozent. Dem gegenüber zeigte sich ein Fade weder vor Relaxation noch nach Erholung der TOF-Ratio auf 1.0 (Abb. 1). Das Fade in der FVC korrelierte gut ($r = 0.81$, $p < 0.0001$) mit der FVC-Reduktion während neuromuskulärer Blockade (TOF-Ratio: 0.45-0.98), und ein Fade von zumindest 10% war stets mit einer relevanten (≥ 10 %, [3]) FVC-Reduktion assoziiert (Abb. 2).

Schlussfolgerung

Während partieller neuromuskulärer Blockade lässt sich bei repetitiven spirometrischen Untersuchungen ein Fade-Phänomen in der Lungenfunktion nachweisen. Ein relevantes Fade der forcierten Vitalkapazität (≥ 10 %) weist darüber hinaus auf relevante respiratorische Effekte (FVC Reduktion ≥ 10 %) einer neuromuskulären Blockade hin. Das FVC-Fade erscheint damit zur Aufdeckung respiratorischer Effekte einer partiellen neuromuskulären Blockade geeignet.

Literatur

1. Berg H, et al. Residual neuromuscular block is a risk factor for postoperative pulmonary complications. A prospective, randomised, and blinded study of postoperative pulmonary complications after atracurium, vecuronium, and pancuronium. Acta Anaesth Scand 41 (1997) 1095-1103.

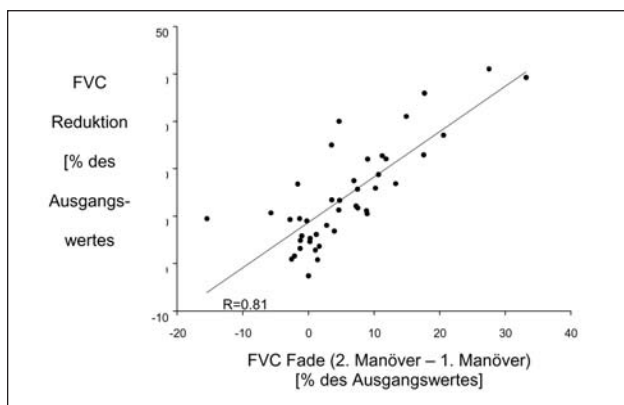


Abbildung 2

2. Pedersen T. et al. Does perioperative tactile evaluation of the train-of-four response influence the frequency of postoperative residual neuromuscular blockade? Anesthesiology 1990;73: 835-9.
3. Eikermann M. et al. Accelerometry predicts effects of neuromuscular blockade on respiratory function. Anesthesiology 2003;98:1333-7.

Regionale Ventilationscharakteristik der Lungen beatmeter Patienten

J. Hinz, P. Neumann, O. Mörer, T. Dudykevych, I. Frerichs, G. Hahn und G. Hellige
 Zentrum Anaesthesiologie, Rettungs- und Intensivmedizin, Universität Göttingen

Fragestellung

Bei der maschinellen Beatmung sollten end-expiratorischer Lungenkollaps und end-inspiratorische Überblähung in Regionen mit unterschiedlicher Atemmechanik vermieden werden (1). Dies kann durch regionale Druck-Volumen-Kurve der Lunge realisiert werden (2). Jedoch können die für diese Technik notwendigen regionalen intrapulmonalen Drücke nur näherungsweise über den Trachealdruck abgeschätzt werden. Ein Ausweg könnte die Berechnung der regionalen Ventilationscharakteristik sein, welcher ohne Druckmessung auskommt. Wir haben die Heterogenität der regionalen Ventilationscharakteristik bei beatmeten Patienten mit akutem Lungenversagen untersucht.

Methodik

Nach positiver Begutachtung durch das örtliche Ethikkomitee und schriftlicher Einwilligung durch die nächsten Angehörigen wurden maschinell beatmete Patienten in die Studie eingeschlossen. Die Einstellung des Beatmungsmodus erfolgte durch den behandelnden Arzt. Die regionale Ventilationscharakteristik der Lunge wurde mit der elektrischen Impedanztomographie (Goe-MF, EIT-Group Göttingen, Deutschland) im 6. ICR parasternal betseitig und nicht invasiv gemessen. Durch grafische Darstellung des regionalen Tidalvolumen versus globalen Tidalvolumen und Anpassung an ein Polynom $y = ax^2 + bx + c$ wurde der Polynomkoeffizient a berechnet (Abb.). Es erfolgte die Einteilung des Polynomkoeffizient a in drei Gruppen: Gruppe A: $a < -0,1$ „Krümmung nach oben“; Gruppe B: $-0,1 > a > 0,1$ „keine Krümmung“ und Gruppe C: $a > 0,1$ „Krümmung nach unten“. Die Daten werden als Min-Max und Median angegeben. Die statistische Analyse erfolgte mit dem t-Test für verbundene Stichproben auf einen Signifikanzniveau $p < 0,05$.

Ergebnisse

Wir untersuchten neun Patienten (Gewicht 75 - 100 (85) kg, Größe 162 - 185 (175) cm, Horowitz-Index 143 - 298 (260) mmHg, Diagnosen: 5 Pneumonie, 4 Atelektase, Compliance 37 - 111 (65) ml/mbar), Tidalvolumen 7 -

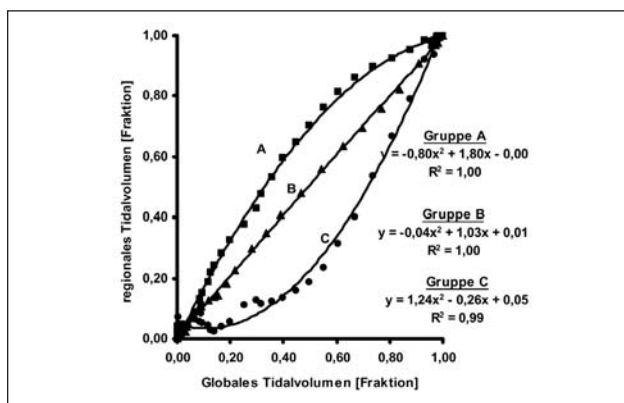


Abbildung 1

10 (9) ml/kg mit 297 - 557 (475) ventilerten Regionen. Die Ergebnisse der Polynomkoeffizienten zeigt die Tabelle.

Interpretation

Die regionalen Ventilationscharakteristik der Lungen zeigt signifikante Unterschiede. Wir fanden Regionen mit positivem Polynomkoeffizient (Gruppe C). Diese Regionen weisen am Anfang der Inspiration nur kleine Änderungen des regionalen Tidalvolumen auf. Sie kollabieren möglicherweise end-expiratorisch und werden während der Inspiration rekrutiert. Dies als Hinweis auf einen zu niedrigen positiv end-expiratorischen Druck. Weiterhin fanden wir Regionen mit negativem Polynomkoeffizient (Gruppe A). Diese Regionen weisen am Ende der Inspiration kleine Änderungen des regionalen Tidalvolumen auf. Sie zeigen möglicherweise eine end-inspiratorische Überblähung. Dies könnte auf die Anwendung zu hoher inspira-

Gruppe	Polynomkoeffizient	Anzahl Regionen	Hypothese
A	-0,11 bis -1,40 (-1,10)	16-89 (43)	Lungenüberblähung end-inspiratorisch
B	-0,10 bis 0,10 (-0,10)	224-432 (356)	Lungenprotektion
C	0,11 bis 1,73 (1,12)	23-100 (76)	Lungenkollaps end-expiratorisch

torischer Atemwegsdrücke zurückzuführen sein. Des weiteren fanden wir Regionen mit annähernd linearem Verhältnis zwischen regionalem und globalem Tidalvolumen (Gruppe B). Dies weist möglicherweise auf eine protektive Beatmung ohne Lungenkollaps und Überblähung hin. Die Messung der regionalen Ventilationscharakteristik der Lungen könnte deshalb hilfreich sein, um Respiratoreinstellungen zu optimieren.

Literatur

1. Amato M.B., Barbas C.S., Medeiros D.M., Magaldi R.B., Schettino G.P.,

Lorenzi-Filho G., Kairalla R.A., Deheinzelin D., Munoz C., Oliveira R., Takagaki T.Y., Carvalho C.R.: Effect of a protective-ventilation strategy on mortality in the acute respiratory distress syndrome. *N. Engl. J Med* 1998; 338: 347-354.

2. Crotti S., Mascheroni D., Caironi P., Pelosi P., Ronzoni G., Mondino M., Marini J.J., Gattinoni L.: Recruitment and derecruitment during acute respiratory failure: a clinical study. *Am. J Respir. Crit Care Med* 2001; 1: 131-140.

Endotoxin-Toleranz: Eine mögliche Rolle von iNOS und HO-1 für die Organprotektion von Leber und Niere

O. Boehm¹, P. Zacharowski¹, H. Rensing² und K. Zacharowski¹

¹ Klinik für Anaesthesiologie, Universitätsklinikum Düsseldorf

² Klinik für Anaesthesiologie und Intensivmedizin, Universitätsklinik Homburg an der Saar

Fragestellung

Obwohl die Endotoxintoleranz gut untersucht ist, sind die zugrunde liegenden pathophysiologischen Mechanismen immer noch nicht vollständig verstanden. Seit längerem ist bekannt, dass die induzierbare Stickoxidsynthase (iNOS) mit seinem Syntheseprodukt NO konzentrations- und zellspezifisch eine wichtige Rolle bei der Abwehr von infektiösen Organismen spielt (1). Auch über die vornehmlich organprotektiven Eigenschaften von Hämoxigenase (HO)-1 wurde bereits in der Literatur berichtet (2). Eine mögliche Stimulation der de novo Proteinsynthese von HO-1 durch NO ist ebenfalls beschrieben (3). Ziel war es, die Rolle von iNOS und HO-1 für die Organprotektion von Leber und Niere während der Endotoxintoleranz zu untersuchen.

Methodik

Männliche Wistar-Ratten wurden nach behördlicher Genehmigung in zwei Versuchsgruppen eingeteilt:

1. Zunächst untersuchten wir den Leber und Nierenschaden während Endotoxintoleranz. Die randomisierten Interventionsgruppen (n = 8/Gruppe) wurden entweder mit a) 0.9% NaCl (1 ml/kg i.p.), b) LPS (1 mg/kg i.p.) oder c) LPS (1 mg/kg i.p.) + 1400W (selektiver iNOS-Inhibitor, 5 mg/kg i.p.) vorbehandelt („first hit“). 24 Stunden später wurde für 6 Stunden ein Gram-negativer Schock mit LPS (6 mg/kg i.v.) induziert („second hit“). Die Detektion von Organschaden/-protektion erfolgte mit Hilfe von klinisch-chemischen Parametern (AST/ALT für die Leber und Harnstoff/Kreatinin für die Niere).
2. Im zweiten Abschnitt analysierten wir die Rolle von iNOS und HO-1 während der Endotoxintoleranz in der Leber. Es erfolgte die gleiche Vorbehandlung wie unter 1.) für 2 bis 24 Stunden (n = 4/Gruppe). Das Lebergewebe wurde mit Hilfe von Northern/Western Blots untersucht, um den Zeitverlauf der mRNA- und Proteinsynthese von iNOS und HO-1 zu erfassen. Die iNOS-Enzymaktivität bestimmten wir indirekt mit Hilfe der Griess-Reaktion.

Statistik: Varianzanalyse (ANOVA) + Bonferroni-Posthoc-Test (p < 0.05). Datendarstellung: arithmetisches Mittel ± Varianz.

Ergebnisse

Mit niedrig dosiertem LPS vorbehandelte Ratten erleiden während eines Gram-negativen Schocks einen signifikant geringeren Organschaden (Leber und Niere, Abb. 1ab) im Vergleich zu unbehandelten Tieren. Außerdem sind diese Tiere signifikant kreislaufstabiler als die Vergleichsgruppe (Daten nicht gezeigt). Bei gleichzeitiger Applikation von 1400 W ist diese Protek-

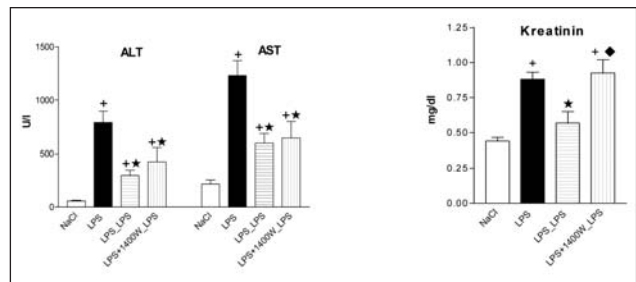


Abbildung 1 A-B: + = Intervention vs NaCl (p < 0.05), ★ = Intervention vs LPS (p < 0.05), ◆ = LPS-LPS vs LPS+1400 W (p < 0.05).

tion vermindert. Die Densitometrieanalyse der Northern-/Western Blots in der Leber eine zeitabhängige Synthese mit einem signifikanten Anstieg nach 2 - 4 Stunden für mRNA und einem Maximum von iNOS-Protein nach 8 Stunden. Zeitgleich bestimmten wir einen signifikanten Anstieg der Nitrit/Nitratkonzentration als Indikator für die Syntheseleistung von iNOS. Interessanterweise trat dieser hohe NO-Spiegel parallel zu einer signifikanten Steigerung der HO-1 mRNA in der Leber auf. Das Maximum von HO-1-Protein lag bei 16 - 24 Stunden (Tab. I).

Interpretation

Die Vorbehandlung mit niedrig dosiertem LPS („first hit“) schützt die Leber und Nieren vor einem nachfolgenden, potentiell deletärem LPS-Stimulus („second hit“). Dieser Effekt lässt sich mit Hilfe des selektiven iNOS Inhibitors 1400 W teilweise blockieren. Die dargestellte sequentiell logische Synthese und Funktion von iNOS und HO-1 impliziert hierbei eine mögliche Beeinflussung der HO-1 Synthese durch NO und könnte für die beobachtete Organprotektion mitverantwortlich sein.

Literatur

1. Chen T., Zamora R., Zuckerbraun B., Billiar T.R. Role of nitric oxide in liver injury. *Curr Mol Med*. 2003;3(6):519-26.
2. Alcaraz M.J., Fernandez P., Guillen M.I. Anti-inflammatory actions of the heme oxygenase-1 pathway. *Curr Pharm Des*. 2003;9(30):2541-51.
3. Hoetzel A., Vagts D.A., Loop T., Humar M., Bauer M., Pahl H.L., Geiger K.K., Pannen B.H. Effect of nitric oxide on shock-induced hepatic heme oxygenase-1 expression in the rat. *Hepatology*. 2001;33(4):925-37.

Tabelle: Dargestellt sind arithmetisches Mittel ± Varianz (* p < 0.05).

Zeit (h)	iNOS / NO		HO-1	
	mRNS (x-fach zu NaCl)	Nitrit/Nitrat (µmol/l)	mRNS (x-fach zu NaCl)	Protein (x-fach zu NaCl)
NaCl-Kontrolle = 0	1.00 ± 0.12	40 ± 2	1.03 ± 0.30	1.01 ± 0.10
2	2.63 ± 0.25 *	38 ± 1	0.91 ± 0.05	0.58 ± 0.13
4	2.45 ± 0.18 *	120 ± 17	1.66 ± 0.26	0.60 ± 0.18
8	1.59 ± 0.20	377 ± 96 *	2.81 ± 0.20 *	1.16 ± 0.30
16	1.59 ± 0.20	328 ± 90 *	1.81 ± 0.06	1.88 ± 0.11 *
24	1.24 ± 0.13	121 ± 40	1.89 ± 0.56	2.62 ± 0.27 *

Systemische inflammatorische Reaktion nach extrakorporaler Zirkulation bei der Ratte: Epiphänomen oder Ursache für neurokognitive Defizite?

B. Jungwirth, B. Eckel, M. Blobner, E.F. Kochs und G.B. Mackensen
 Klinik für Anaesthesiologie, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München

Fragestellung

Neurokognitive Defizite nach herzchirurgischen Eingriffen mit extrakorporaler Zirkulation (EKZ) sind häufig und mindern die Lebensqualität der Patienten (1). Zur Aufklärung möglicher Pathomechanismen wurde kürzlich ein Modell der EKZ an der Ratte entwickelt und durch die Einführung eines an die Rattengröße adaptierten Oxygenators technisch entscheidend verbessert (2, 3). Die vorliegende Studie untersucht, ob das Füllungsvolumen der EKZ einen Einfluss (a) auf das Ausmaß der inflammatorischen Reaktion und (b) auf die postoperative neurokognitive Funktion hat.

Methodik

Nach Einverständnis der Tierschutzkommission wurden 20 männliche Sprague-Dawley-Ratten (352 ± 24 g) für 90 Minuten einer normothermen EKZ zugeführt, wobei 10 Ratten mit einem neuentwickelten Membranoxygenator (Füllungsvolumen der EKZ 10 ml) und 10 Ratten mit einem Neugeborenenoxxygenator (38 ml) versorgt wurden, die beide mit Vollblut gefüllt wurden. 10 Sham-operierte Tiere wurden identisch kanüliert, aber nicht an die EKZ angeschlossen, während 7 Kontrolltiere weder kanüliert noch anästhesiert wurden. Die systemischen Interleukin-6 (IL-6)-Konzentrationen wurden vor Beginn der EKZ, nach 90 Minuten EKZ und 2 Stunden nach der EKZ bzw. zu analogen Zeitpunkten bei den Sham-Tieren mittels ELISA bestimmt. Mit dem modifizierten Hole-Board-Test wurden prä- und 21 Tage postoperativ das Arbeitsgedächtnis und das deklarative Gedächtnis beobachtet. Die Gruppen wurden mit einer Zwei-Wege-ANOVA verglichen. War der Wechselwirkungsfaktor signifikant ($p < 0,05$) wurde posthoc mit faktoriellen ANOVAs und mit Bonferoni-Tests analysiert.

Ergebnisse

Mit dem Neugeborenenoxxygenator wurden 2 Stunden nach der EKZ signifikant höhere IL-6-Spiegel gemessen als mit dem neu entwickelten Oxygenator ($p < 0,05$). Die IL-6-Werte der Sham-operierten Tiere stiegen im Vergleichszeitraum nicht nennenswert (Abb. 1). Das deklarative Gedächtnis war in den vier untersuchten Gruppen zu keinem Zeitpunkt beeinträchtigt. Es zeigten sich keine Unterschiede der beiden EKZ-Gruppen, weder zu den Sham-operierten Tieren noch zu den nicht anästhesierten Kontrolltieren (Abb. 2). Das Arbeitsgedächtnis war ebenfalls sowohl über die Zeit als auch zwischen den Gruppen unverändert.

Interpretation

Diese Studie zeigt einen signifikanten Einfluss des Füllungsvolumens der EKZ auf die systemische Freisetzung von IL-6, vergleichbar mit Ergebnissen aus klinischen Studien. Diese systemische inflammatorische Reaktion war jedoch nicht mit einer beeinträchtigten neurokognitiven Funktion assoziiert, die im modifizierten Hole-Board-Test beobachtet werden kann. Obwohl wir in dieser Studie nur ein Zytokin untersucht haben, legen unsere Ergebnisse dennoch nahe, dass neben der EKZ und der dadurch ausgelösten systemischen inflammatorischen Reaktion zusätzliche Faktoren für das Entstehen von neurokognitiven Defiziten verantwortlich sein müssen. Solche Faktoren und die ihnen zugrunde liegenden Pathomechanismen können in diesem Modell simuliert und untersucht werden.

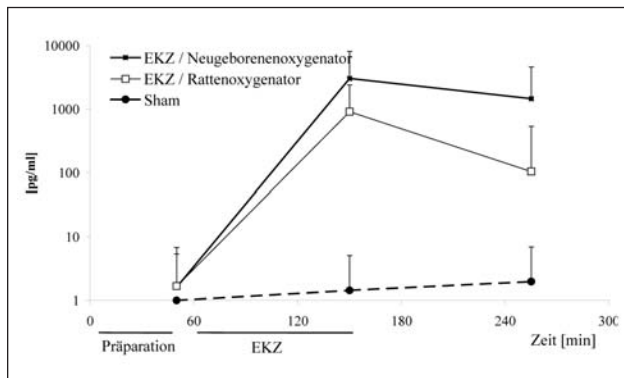


Abbildung 1: IL-6.

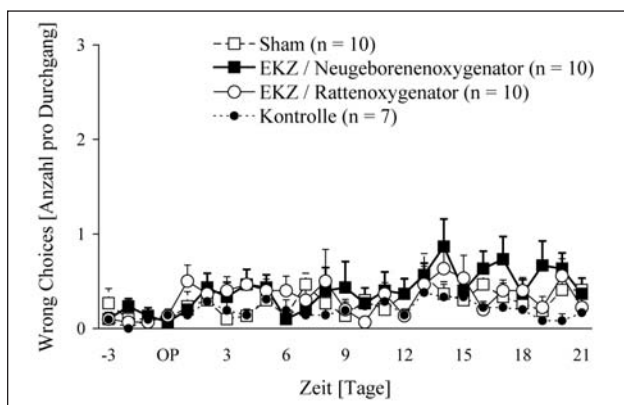


Abbildung 2: Deklaratives Gedächtnis.

Literatur

- Newman M.F., Grocott H.P., Mathew J.P., White W.D., Landolfo K, Reves J.G., Laskowitz D.T., Mark D.B., Blumenthal J.A.: Report of the substudy assessing the impact of neurocognitive function on quality of life 5 years after cardiac surgery. *Stroke*; 2001; 32 (12): 2874-81.
- Mackensen G.B., Sato Y., Nellgard B., Pineda J., Newman M.F., Warner D.S., Grocott H.P.: Cardiopulmonary bypass induces neurologic and neurocognitive dysfunction in the rat. *Anesthesiology*; 2001; 95 (6): 1485-91
- Jungwirth B., Kochs E.F., Mackensen G.B.: Development of a small volume oxygenator: an essential improvement to a model of cardiopulmonary bypass in the rat. *Anesth Analg*; 2003; 96, SCA 72.

Gram-positive Sepsis und angeborene Immunabwehr: Bedeutung von Toll-Like Rezeptor 2 für eine myokardiale Entzündungsreaktion

P. Knuefermann¹, Y. Sakata², O. Takeuchi³, S. Akira³, D.L. Mann², A. Hoeffl¹ und J.G. Vallejo²

¹ Klinik für Anästhesie und Operative Intensivmedizin, Universitätsklinik Bonn

² Baylor College of Medicine, Houston, Texas, USA

³ Osaka University, Osaka, Japan

Fragestellung

Bei der Sepsis kommt es über die Aktivierung des Toll/IL-1 Signaltransduktionswegs zur systemischen und myokardialen Expression von proinflammatorischen Mediatoren (TNF, IL-1b), die eine negativ inotrope Wirkung besitzen und eine wichtige Rolle für die Pathogenese der linksventrikulären Dysfunktion spielen (1, 2). In Immunzellen konnte gezeigt werden, dass Toll-Like Rezeptor 2 (TLR2) gram-positive Bakterien (*Staphylococcus aureus*) erkennt und eine Signaltransduktionskaskade aktiviert. Weiterhin

besitzen und eine wichtige Rolle für die Pathogenese der linksventrikulären Dysfunktion spielen (1, 2). In Immunzellen konnte gezeigt werden, dass Toll-Like Rezeptor 2 (TLR2) gram-positive Bakterien (*Staphylococcus aureus*) erkennt und eine Signaltransduktionskaskade aktiviert. Weiterhin

wird TLR2-mRNA im Herzen exprimiert (3). Die Arbeitshypothese dieser Studie untersuchte, welche Rolle Toll-Like Rezeptor 2 für eine myokardiale Entzündungsreaktion in vivo bei einer S.-aureus-Sepsis spielt.

Methodik

Zur Simulation einer gram-positiven Sepsis wurde Wildtyp- (WT) und TLR2-defizienten Mäusen (TLR2D) vergleichend *S. aureus* (1.5×10^8 KBE) intraperitoneal verabreicht (genehmigt durch Tierversuchsprotokoll, Baylor College of Medicine, Houston, Texas). Die prinzipielle myokardiale Expression von TLR2-mRNA und -Protein wurde mittels RNase Protection Assay und Western-Blot-Analyse nachgewiesen. Nach Gabe von *S. aureus* wurde die kardiale IRAK-Aktivität mittels Kinase-Assay, die myokardiale mRNA-Expression für TNF und IL-1 β mittels RNase Protection Assay, die dazugehörigen Proteinspiegel mittels ELISA und die NF κ B-Aktivierung mit einem Electro-Mobility-Shift-Assay (EMSA) untersucht. Die cGMP-Expression im Herzen wurde mittels Radioimmuno-Assay gemessen. Zusätzlich wurde die funktionelle Bedeutung der myokardialen Aktivierung der Inflammationskaskade durch Kontraktionskraftmessungen im Langendorff-Präparat mit Hitze-inaktivierten Bakterien (10^8 KBE/ml) untersucht.

Ergebnisse

Toll-Like Rezeptor 2 wird im Herzen auf mRNA- und Proteinebene exprimiert. In WT-Mäusen kam es 2 Stunden nach Stimulation mit *S. aureus* zu einer deutlichen Zunahme der mRNA-Expression. Die kardiale IRAK-Aktivität nahm in den WT-Mäusen nach 4 Stunden und 6 Stunden signifikant zu, wohingegen in den TLR2D-Mäusen der Anstieg geringer ausfiel ($n = 3$; $p < 0,05$; 2-Weg-ANOVA). Eine *S. aureus* Infektion führte nach 2 Stunden und 4 Stunden zu einer deutlichen NF κ B-Aktivierung im Herzen von WT-Mäusen, während eine NF κ B-Aktivierung in TLR2D-Mäusen nicht detektiert wurde ($n = 4$). Die myokardiale TNF und IL-1 β mRNA-Expression war in den WT-Mäusen 4 Stunden und 6 Stunden nach einer *S. aureus* Infektion signifikant größer als in den TLR2D-Mäusen ($n = 3$; $p < 0,05$; 2-Weg-ANOVA). Die dazugehörigen TNF-Proteinspiegel waren ebenfalls sig-

nifikant größer in den WT-Mäusen im Vergleich zu den TLR2D-Mäusen ($n = 3$; $p < 0,05$; 2-Weg-ANOVA). In den WT-Mäusen waren die TNF-Spiegel etwa 20mal höher als in den TLR2D-Mäusen (4,2 vs. 0,2 pg/mg Gewebe). Die IL-1 β Gewebeproteinspiegel zeigten ein ähnliches Verteilungsmuster. Weiterhin waren zum Zeitpunkt 6 Stunden die kardialen cGMP-Spiegel in den WT-Mäusen um das 2,5fache angestiegen, wohingegen in den TLR2D-Mäusen nur ein 1,3facher Anstieg verzeichnet wurde ($n = 5$; $p < 0,05$; 2-Weg-ANOVA). Die funktionellen Untersuchungen im Langendorff-Präparat zeigten nach Perfusion mit *S. aureus* eine stärkere Abnahme der LV Druckentwicklung in den Herzen von WT-Mäusen als in den TLR2D-Mäusen. Dabei sank die LV Kontraktionskraft in den WT-Mäusen auf 58,5% ($n = 3$) bzw. in den TLR2D-Mäusen auf 91,3% ($n = 3$) vom Ausgangswert bei Perfusionsbeginn.

Interpretation

Im Rahmen einer gram-positiven Sepsis spielen TLR2 und nachfolgende Moleküle des Toll/IL-1 Signaltransduktionswegs eine wichtige Rolle für die kardiale Expression von proinflammatorischen Mediatoren sowie für die Entstehung einer Pumpfunktionsstörung. Eine Beeinflussung des TLR2-Signaltransduktionswegs könnte ein alternatives Therapiekonzept bei der myokardialen Entzündungsreaktion bei einer gram-positiven Sepsis darstellen.

Literatur

1. Kumar A., Thota V. et al.: Tumor necrosis factor alpha and interleukin-1beta are responsible for in vitro myocardial cell depression induced by human septic shock serum. *J Exp Med* 1996;183:949-958
2. Kneuferrmann P., Nemoto S. et al.: CD14-deficient mice are protected against lipopolysaccharide-induced cardiac inflammation and left ventricular dysfunction. *Circulation* 2002;106:2608-2615
3. Frantz S., Kelly R.A., Bourcier T.: Role of TLR-2 in the activation of nuclear factor kappaB by oxidative stress in cardiac myocytes *J Biol Chem.* 2001;276:5197-203.

Lipopolysaccharid (LPS) reduziert den Lungenschaden während Gram-positivem Schock Hinweis für das Auftreten von Cross-Tolerance in vivo

A. Koch¹, P. Zacharowski¹, H. Rensing², S. Foster³ und K. Zacharowski¹

¹ Klinik für Anaesthesiologie, Universitätsklinikum Düsseldorf

² Klinik für Anaesthesiologie und Intensivmedizin, Universitätsklinik Homburg an der Saar

³ Department of Molecular Biology and Biotechnology, University of Sheffield, Großbritannien

Fragestellung

Die Endotoxintoleranz ist ein gut beschriebenes, wenn auch nicht in allen Einzelheiten aufgeklärtes Phänomen (1). Auch konnten diesbezüglich bereits Lungen-protective Eigenschaften in vivo demonstriert werden (2). Im Gegensatz hierzu ist die Toleranz gegenüber Gram-positiven Erregern nach einem Kontakt mit Gram-negativen Bakterien („cross-tolerance“), insbesondere in vivo noch wenig untersucht. Bei der Exposition und Protektion gegenüber diverser Mediatoren spielen im Rahmen der Sepsis-induzierten Lungenschädigung u.a. die zwei Enzymsysteme induzierbare Stickoxidsynthetase (iNOS) und Hämoxigenase (HO)-1 nachweislich eine wichtige Rolle. Die iNOS gilt als potentiell entscheidender Trigger, mittels erhöhter NO-Konzentrationen, eine de novo Proteinakkumulation der organprotectiven HO-1 zu induzieren (3). Daher untersuchten wir, ob eine nichtletale LPS-Dosis zu einer synergistischen Hochregulierung von iNOS und HO-1 führt bzw. welcher zeitlich dynamische Bezug zwischen den beiden genannten Enzymen besteht. Wir spekulierten, dass eine LPS-Vorbehandlung den Lungenschaden während eines Gram-positiven Schocks zu reduzieren vermag. Zusätzlich untersuchten wir, ob iNOS / HO-1 an der Protektion beteiligt sein könnten.

Methodik

Nach behördlicher Genehmigung wurden folgende Versuche an männlichen Wistar-Ratten unter Thiopental-Narkose (100 mg/kg i.p.; Schock / Organentnahme) durchgeführt:

1. $n = 8$ /Gruppe: Nach einer Vorbehandlung mit LPS (1 mg/kg i.p.) oder Kochsalz erfolgte 24 Stunden später die Induzierung eines Gram-positiven Schocks (Lipoteichonsäure (LTA, 3 mg/kg i.v.) + Peptidoglykan (PepG, 10 mg/kg i.v.)). Eine weitere unbehandelte Gruppe diente als Kontrolle. Nach 6 Stunden folgte die Entnahme und (immuno-)histologische Aufarbeitung des Lungengewebes (HE/Nitrotyrosin).

2. $n = 4$ /Gruppe: Um die Auswirkungen der LPS-Vorbehandlung (1 mg/kg i.p.) auf iNOS und HO-1 im zeitlichen Verlauf zu erfassen, wurden nach 2, 4, 8, 16 oder 24 Stunden Blutproben und die Lunge entnommen. In der Lunge wurden der mRNA- und Proteingehalt von iNOS und HO-1 mittels Northern bzw. Western Blot bestimmt (densitometrische Analyse; s. Abb. 1, 3 und 4). Des Weiteren wurden Nitrat/Nitrit Konzentrationen im Plasma als Ausdruck der Syntheseleistung von iNOS, mit Hilfe der Griess-Reaktion gemessen.

Statistische Auswertung: Varianzanalyse (ANOVA) + Bonferroni-Posthoc-Test (* $p < 0,05$).

Ergebnisse

1. Die Induktion eines Gram-positiven Schocks führt zu einem Lungenschaden (semi-quantitativ) und vermehrtem Nachweis von Nitrotyrosin. Eine deutliche Reduktion der Lungenschädigung / des Nitrotyrosinnachweises wurde bei den LPS-vorbehandelten Tieren beobachtet (Daten nicht abgebildet).
2. Die Vorbehandlung mit einer nichtletalen Dosis LPS führt in der Lunge zunächst zu einem Anstieg der iNOS mRNA (Abb. 1) mit einem signifikanten Maximum nach 2 Stunden, gefolgt von einer iNOS Protein-erhöhung (Daten nicht abgebildet) mit einem Maximum nach 8 Stunden. Dies geht zeitlich einher mit einem signifikanten Anstieg der Nitrat/Nitrit Plasmakonzentrationen (Abb. 2) nach 8 und 16 Stunden. Ebenfalls nach 8 und 16 Stunden zeigt sich ein signifikanter Anstieg der HO-1 mRNA (Abb. 3, Maximum bei 16 Stunden), gefolgt von einem signifikanten Maximum der HO-1 Proteinkonzentration nach 24 Stunden (Abb. 4).

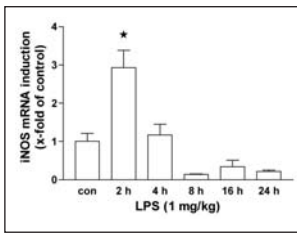


Abbildung 1

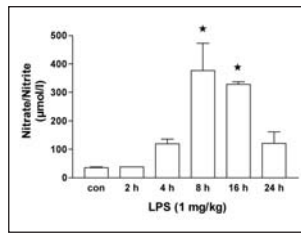


Abbildung 2

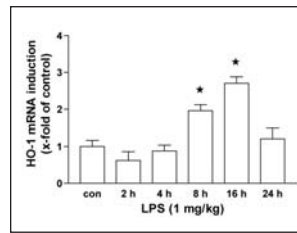


Abbildung 3

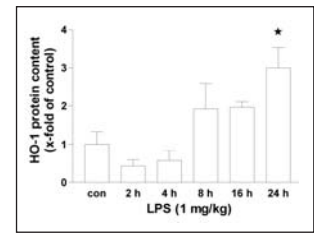


Abbildung 4

Interpretation

Die Vorbehandlung mit niedrig dosiertem LPS führt in der Lunge zu einer zeitabhängigen Induktion der iNOS Transkription und Proteinkonzentration, einhergehend mit erhöhten Nitrat/Nitrit Plasmakonzentrationen mit einem Maximum nach 8 Stunden. Dies geht zeitlich mit der Induktion der HO-1 mRNA einher, welche zu einer maximalen HO-1 Proteinkonzentration nach 24 Stunden führt. Folgt auf diese 24-stündige Vorbehandlung ein Gram-positiver Schock, lässt sich eine deutliche Reduktion des Lungenschadens sowie der Nitrotyrosin-Färbung in der Lunge gegenüber nicht-vorbehandelten Tieren beobachten.

Literatur

1. Beeson P.B. Tolerance to bacterial pyrogens. *J Exp Med* 1947; 86:29.
3. Frank L., Summerville J., Massaro D. Protection from oxygen toxicity with endotoxin. Role of the endogenous antioxidant enzymes of the lung. *J Clin Invest* 1980; 65(5):1104-1110.
3. Otterbein L.E., Choi A.M. Heme oxygenase: colors of defense against cellular stress. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 279(6):L1029-L1037.

Milde Hypothermie (32°) vor intra-abdomineller Sepsis verschlechtert das Outcome

A. Torossian, S. Rühlmann, H. F. Wulf, M. Middeke¹, W. Lorenz¹ und A. Bauhofer¹

Klinik für Anästhesie und Intensivtherapie und ¹ Institut für Theoretische Chirurgie, Philipps-Universität Marburg

Fragestellung

Wir testeten die Hypothese, dass eine präinfektiöse Hypothermie (32°C) bei septischen Ratten die Mortalität erhöht, immunsuppressiv wirkt und die muskuläre Oxygenierung (p_mO₂) erniedrigt.

Methodik

Mit Genehmigung durch die Tierschutzkommission wurden 96 männliche Wistar-Ratten randomisiert und in Fentanyl/DHB-Analgesie, nach i.v. Antibiotikaprophylaxe, laparotomiert und mit einer standardisierten humanen Stuhlsuspension infiziert (1) und entweder perioperativ normotherm gehalten oder 1 Stunde vor OP auf 32°C gekühlt, n = 42/Gruppe; oder gekühlt und operiert ohne Infektion, n = 12/Gruppe. Primärer Endpunkt war die 120-Stunden-Überlebensrate, sekundäre Endpunkte die Plasmazytokinspiegel von IL-10, MIP-2 und IL-6 (ELISA), die Leuko-/ Granulozytenzahl sowie der muskuläre Sauerstoffpartialdruck (Licox®).

Ergebnisse

Die Effekte der präinfektiösen Hypothermie waren deletär: nur 16 von 42 Tieren überlebten 120 Stunden, in Normothermie waren es 26/42 Tiere; p < 0,05, Abb. 1. Alle hypothermen Tiere ohne Infektion überlebten. IL-10 war nach Hypothermie erhöht: 1843 ± 12 pg/ml; in Normothermie 945 ± 26 pg/ml und in Hypothermie ohne Infektion 520 ± 104 pg/ml (p < 0,01). IL-6 war nach Hypothermie erniedrigt: 119 ± 73 pg/ml; in Normothermie 276 ± 105 pg/ml; p < 0,01, Abb. 2. Die MIP-2 Freisetzung unterschied sich nicht, ebenso wenig die postinfektiöse Granulozytenzahl. Der Sauerstoffpartialdruck war in Hypothermie niedriger (40 mmHg) als in Normothermie (55 mmHg). Nach OP stieg er in Normothermie an bis auf 85 ± 12 mmHg, nach Hypothermie blieb er jedoch bei 49 ± 9 mmHg.

Interpretation

Eine präinfektiöse milde Hypothermie ist ebenso schädlich wie eine postinfektiösen Hypothermie, jedoch verändert sie die Zytokinbalance in Richtung Immunsuppression (bei postinfektiöser Hypothermie finden wir eine Hyperinflammation (2)).

Literatur

1. Lorenz W, Reimund K.-P., Weitzel F., Celik I., Kurnatowski M., Schneider C., Mannheim W., Heiske A., Neumann K., Sitter H., Rothmund M: Granulocyte colony-stimulating factor prophylaxis before operation protects against lethal consequences of postoperative peritonitis. *Surgery* 1994;116:925-934.
2. Torossian A., Rühlmann S., Middeke M., Lorenz W., Wulf H., Bauhofer A: Deleterious effects of mild hypothermia in septic rats are ameliorated by granulocyte-colony stimulating factor. *Anesthesiology* 2003; 99:1087-1092.

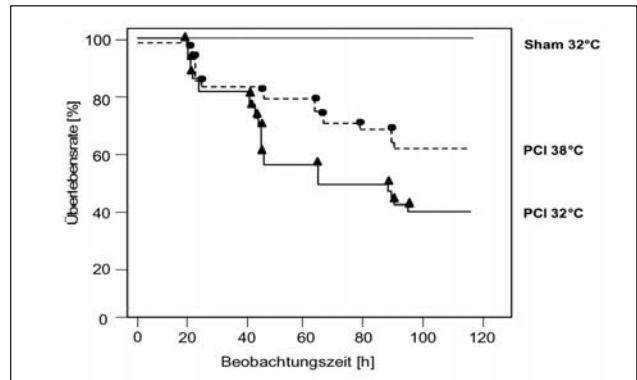


Abbildung 1

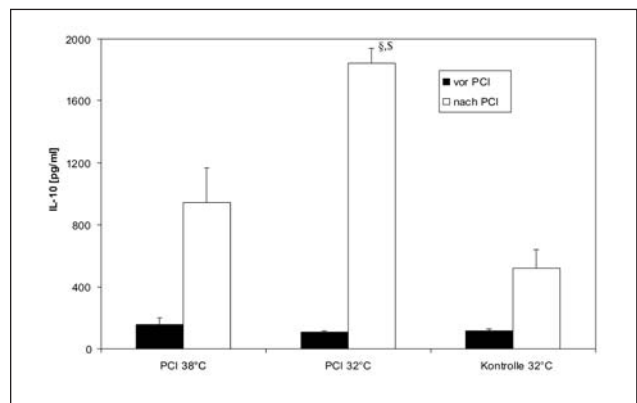


Abbildung 2

Spinale und zerebrale Effekte von Sevofluran und Propofol zeigen unterschiedliche zeitliche Verläufe bei Konzentrationsänderungen

J. Baars, M. Grünewald, D. Kalisch, C. Dangel, S. Tas, W. Kox und B. Rehberg

Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin, Charité Campus Mitte, Berlin

Fragestellung

Die Beeinflussung spinaler Funktionen durch verschiedene Anästhetika ist von besonderem Interesse, da der immobilisierende Effekt der Anästhetika überwiegend auf spinaler Ebene vermittelt wird. Aus diesem Grund wurden Parameter der Erregbarkeit spinaler Motoneurone (H-Reflex und F-Welle) zur Vorhersage motorischer Reaktionen auf Schmerzreize vorgeschlagen [1, 2]. Es ist jedoch noch unbekannt, inwieweit sich die spinal vermittelten Effekte der Anästhetika von den zerebral vermittelten Effekten hinsichtlich ihrer Pharmakokinetik unterscheiden. Unterschiede in der Pharmakokinetik wären ein weiterer Hinweis auf unterschiedliche Wirkorte und wären zudem auch klinisch bedeutsam. Wir verglichen daher mit Hilfe einer pharmakokinetische-pharmakodynamischen Modellbildung [3] die Äquilibriumshalbwertszeiten ($t_{1/2k_{e0}}$) der spinalen Parameter H-Reflex und F-Welle mit den EEG-Parametern BIS® und der Spektralen Eckfrequenz (SEF₉₅).

Methodik

Nach Zustimmung der Ethikkommission und schriftlicher Einwilligung wurden an 82 Patienten präoperativ Sevofluran- bzw. Propofol-Mononarkosen durchgeführt. Nach Bestimmung von Baselinewerten der verschiedenen Parameter wurde die Anästhetikakonzentration kontinuierlich erhöht, bis die spinalen Parameter deutlich reduziert waren. Anschließend wurde die Konzentration wieder reduziert, bis erneut reproduzierbare F-Wellen- bzw. H-Reflexantworten ableitbar waren. Alle fünf bzw. 10 Sekunden wurden nach Stimulation des N. tibialis die maximale F-Wellen- bzw. H-Reflexamplitude über den jeweiligen Kennmuskeln (H-Reflex: M. soleus; F-Welle M. abductor hallucis) der unteren Extremität ermittelt. Die Registrierung des BIS und der SEF erfolgte mit Hilfe des Aspect® 1000 Monitors. Die Hysterese zwischen den Anästhetikakonzentrationen und den gemessenen Effekten konnte unter Annahme eines Emax-Modells mit einer Äquilibriumshalbwertszeit $t_{1/2k_{e0}}$ in eine sigmoidale Konzentrations-Wirkungsbeziehung kollabiert werden. Die $t_{1/2k_{e0}}$ beschreibt die zeitlichen Verzögerung der Konzentrationsänderung zwischen der Plasmakonzentration und dem Effektkompartiment. Die statistischen Vergleiche erfolgten mit einer Varianzanalyse (ANOVA) und Tukey-Vergleichstest.

Ergebnisse

Die $t_{1/2k_{e0}}$ der spinalen Parameter H-Reflex- und F-Wellenamplitude (Abb. 1) unterscheiden sich weder in der Sevofluran- noch in der Propofolgruppe signifikant. Es bestehen jedoch in beiden Gruppen signifikante Unterschiede der $t_{1/2k_{e0}}$ beider spinaler Parameter im Vergleich zu den zerebralen Parametern BIS und SEF. Diese Unterschiede sind bei beiden Pharmaka mit Ausnahme des Vergleichs der F-Wellen mit dem BIS ($p < 0,01$) hochsignifikant ($p < 0,001$). In der Sevoflurangruppe, nicht jedoch in der Propofolgruppe zeigte sich auch ein geringer signifikanter ($p < 0,05$) Unterschied zwischen der $t_{1/2k_{e0}}$ des BIS und der SEF.

Schlussfolgerung

Es konnte gezeigt werden, dass die spinalen Effekte mit einer deutlichen zeitlichen Verzögerung gegenüber zerebralen Effekten auf Konzentrationsänderungen der Anästhetika reagieren. Dies kann das klinische Phänomen erklären, dass unmittelbar nach Maskeneinleitungen von Kindern noch motorische Reaktionen beobachtet werden, wenn bereits tiefste Schlafzustände erreicht sind. Die Ergebnisse sind zudem ein weiterer Hinweis für unterschiedliche Wirkorte der Anästhetika am Menschen.

Literatur

1. Antognini J.F., Carstens E: In vivo characterization of clinical anaesthesia and its components. *Br.J Anaesth.* 2002; 89: 156-66.
2. Zhou H.H., Jin T.T., Qin B., Turndorf H: Suppression of spinal cord motoneuron excitability correlates with surgical immobility during isoflurane anesthesia. *Anesthesiology* 1998; 88: 955-61.
3. Sheiner L.B., Stanski D.R., Vozeh S., Miller R.D., Ham J: Simultaneous modeling of pharmacokinetics and pharmacodynamics: application to d-tubocurarine. *Clin.Pharmacol.Ther.* 1979; 25: 358-71.

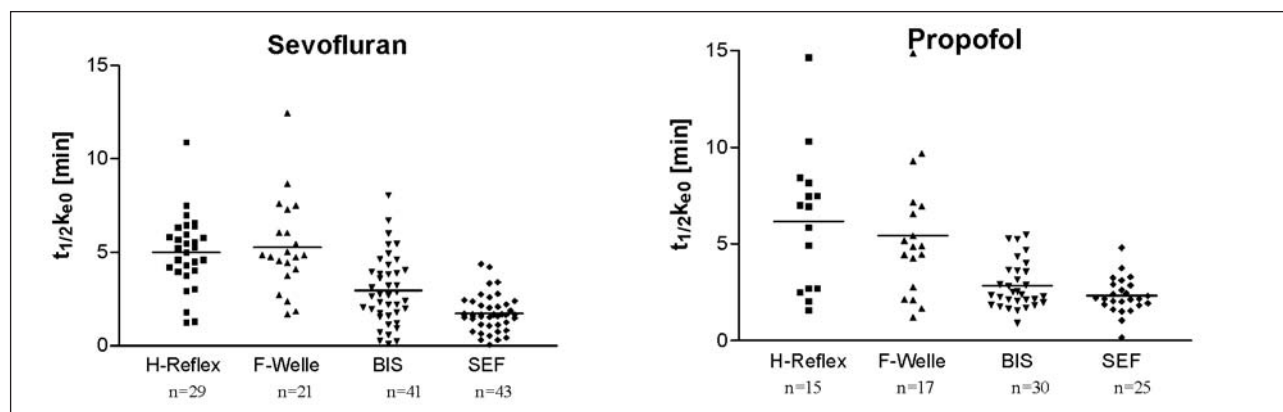


Abbildung 1: Äquilibriumshalbwertszeit $t_{1/2k_{e0}}$ der einzelnen Messungen (Waagerechter Balken = Mittelwert). N ist die Anzahl der in die Auswertung eingegangenen Messwerte.

Isofluran verbessert die kognitiven Funktionen von transgenen Mäusen mit einer Alzheimer-typischen Mutante

B. Eckel¹, M. Riemenschneider², F. Ohl³ und M. Blobner¹

¹ Klinik für Anästhesiologie und

² Psychiatrische Klinik der Technischen Universität München

³ Institut für Labortierkunde, Universität Utrecht, Niederlande

Fragestellung

Das Auftreten postoperativer kognitiver Defizite bei älteren Patienten ist allgemein bekannt und mit 26% eine Woche nach der Operation häufig. Dabei ist nicht zu unterscheiden, wodurch diese klinische Verschlechterung ausgelöst wurde: die zu operierende Krankheit, der Transport ins Krankenhaus, das operative Trauma oder die Narkose [1]. Ein prädisponierender Faktor könnten auch ein vorbestehendes demenzielles Syndrom darstellen. Diese Frage kann bei Patienten ohne die Notwendigkeit einer Operation nicht geklärt werden. Wir untersuchten daher den Effekt von Isofluran auf Ausprägung und Dauer von Hirnleistungsstörungen transgener Mäuse mit einer Alzheimer typischen Mutante.

Methodik

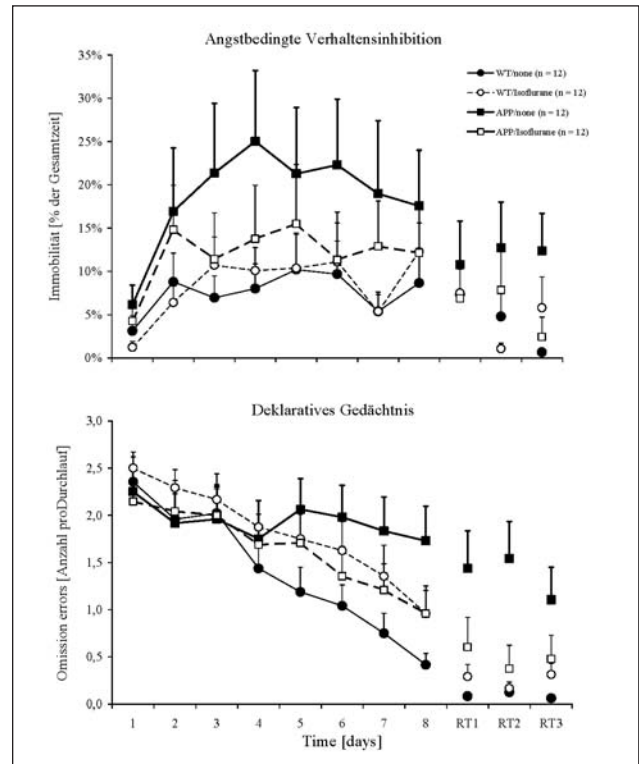
Die Untersuchungen wurden an transgenen Mäusen (APP23; n = 24) und ihren gesunden Geschwistern (WT; n = 24) durchgeführt. Diese transgenen Mäuse exprimieren humane APP751 cDNA mit der schwedischen Doppelmutation (G670-T; A671-C) unter Kontrolle des Neuronen spezifischen Maus Thy-1 Promoter Fragments [3]. Wir untersuchten Mäuse in einem Alter von 15 - 16 Monaten, in dem Plaque-Ablagerungen, Neuronen-Untergänge und kognitive Defizite im Water-Maze-Test bekannt sind [3]. Jeweils 12 Mäuse jeder Gruppe wurden für 2 Stunden mit Isofluran anästhesisiert. Dabei wurde alle 10 Minuten die Konzentration des Isofluran um 0,2 Vol% verändert, bis die Maus auf einen definierten Schmerzreiz (Kneifen in die Vorderpfote) nicht mehr reagiert. Am folgenden Tag erlernten alle Tiere den modifizierten Hole-Board-Test, ein Verhaltenstest, der in der Lage ist, ohne jeden Stress für die Mäuse Kognition, Emotion und grobe Kraft der Tiere zu erfassen [2]. Dieser Test wurde über 8 Tage täglich durchgeführt und danach drei Mal nach je einer Woche wiederholt. Die Isofluran-Konzentration, die für die Unterdrückung des Zehenkneifreflexes erforderlich war, wurde zwischen den beiden Gruppen mit t-Tests verglichen. Die Variablen des Hole-Board-Tests wurden mit einer Zweifache-ANOVA verglichen. Unterschiedliche Lernerfolge wurden bei signifikantem Wechselwirkungsfaktor (Gruppe x Anästhesie x Zeit) angenommen.

Ergebnisse

Die APP23-Mäuse benötigten eine höhere Narkosegaskonzentration, um den Zehenkneifreflex zu unterdrücken ($1,64 \pm 0,10$ Vol% vs. $1,33 \pm 0,09$ Vol% Isofluran, $P < 0,05$). Die transgenen Tiere profitierten hinsichtlich ihrer kognitive Leistung von einer Narkose, während sich bei den gesunden Kontrolltieren die kognitive Leistung nach der Narkose verschlechterte (Abb).

Interpretation

Das von uns bislang untersuchte Modell der APP23-Maus trägt die sogenannte Schwedische Doppelmutation von APP und simuliert diese Pathologie über zwei verschiedene Mechanismen: (1) Erhöhte Freisetzung von $A\beta_{(40/42)}$ infolge der Doppelmutation und (2) erhöhtes Substratangebot für die β -Sekretase, aufgrund einer etwa 7-fachen Überexpression des Amyloid Vorläuferproteins (APP751) [3]. Die höhere, erforderliche Isofluran-Konzentration und die verbesserte kognitive Funktion durch Isofluran könnte auf beiden Mechanismen beruhen. Isofluran wirkt an vielen Stellen und an verschiedenen Rezeptoren im ZNS, die alle durch erhöhtes $A\beta_{(40/42)}$



Abbildung

modifiziert werden könnten. Bevor diese jedoch untersucht werden, muss geklärt sein, ob unsere Beobachtung an den APP23-Mäusen mit dem Neuronenuntergang oder lediglich mit dem Epiphänomen des APP23-Modell nämlich der Überexpression des Präcursorproteins korreliert.

Literatur

1. Moller J.T., Cluitmans P., Rasmussen L.S., et al. Long-term postoperative cognitive dysfunction in the elderly ISPOCD1 study. ISPOCD investigators. International Study of Post-Operative Cognitive Dysfunction. Lancet 1998;351:857-61.
2. Ohl F., Holsboer F., Landgraf R. The modified hole board as a differential screen for behavior in rodents. Behav Res Methods Instrum Comput 2001;33:392-7.
3. Sturchler-Pierrat C., Abramowski D., Duke M., et al. Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. Proc Natl Acad Sci USA 1997;94:13287-92.

Aktivierung von Adenosine-A1-Rezeptoren in primären Hippokampusneuronen der Ratte durch Enfluran und Sevofluran

C. Eisemann, P.W.L. Tas und N. Roewer

Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie, Universität Würzburg

Fragestellung

Spontane Ca^{2+} -Oszillationen in Kulturen von Hippokampusneuronen beruhen auf einer exzitatorischen Signalübertragung durch Aktivierung von NMDA- und AMPA/Kainat-Rezeptoren sowie Modulation durch inhibitorische $GABA_A$ -Rezeptoren (1). Auch Adenosin bewirkt über A1-Rezeptoren eine Hemmung spontaner Ca^{2+} -Oszillationen. Diese Hemmung wurde nicht beobachtet in Anwesenheit von 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (DPCPX), ein spezifischer Antagonist für Adenosin-A1-Rezeptoren. Vor kurzem (2) konnten wir zeigen, dass DPCPX die Isofluran-induzierte Hemmung der spontanen Ca^{2+} -Oszillationen in 29 - 38% der untersuchten Neuronen teilweise revertierte, ein Hinweis, dass ein Teil der Hemmung über Adenosin-A1-Rezeptoren vermittelt wurde. Interessant war daher die Frage, ob andere volatile Anästhetika wie Enfluran und Sevofluran eine ähnliche Adenosin-A1-Rezeptor-vermittelte Hemmung der spontanen Ca^{2+} -Oszillationen zeigen.

Methodik

Experimente wurden mit 8 - 10 Tage alten Kulturen von Hippokampusneuronen der Ratte durchgeführt. Die mit dem Ca^{2+} -Indikator Fluo-3 beladenen Zellen wurden in einer gasdichten Inkubationskammer bei 30 °C und einer Flussgeschwindigkeit von 500 μ l/min mit Anästhetika in An- oder Abwesenheit von 100 nM DPCPX perfundiert. Die Registrierung spontaner Ca^{2+} -Oszillationen einzelner Zellen erfolgte mit Hilfe eines konfokalen Laser Scanning Mikroskops (Biorad MRC-1024) und der Lasersharp Acquisition Software. Für die Analyse von Frequenzen und Höhe der Ca^{2+} -Oszillationen wurde „Labview 5.1“ benutzt. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Student's t-Test.

Ergebnisse

Die spontanen Ca^{2+} -Oszillationen in den Hippokampusneuronen wurden durch Sevofluran dosisabhängig gehemmt. Abbildung 1a zeigt die sehr starke Unterdrückung ($81.4 \pm 6.6\%$, $n=17$) der Ca^{2+} -Oszillationen durch 1 MAC Sevofluran und die teilweise Reversion der Oszillationsamplitude

bei etwa 30% der untersuchten Neuronen durch 100 nM DPCPX (Abb. 1b). Eine ähnliche Reversion der Oszillationsamplitude durch DPCPX wurde auch bei 0.25 und 0.5 MAC Sevofluran (Abb. 1b) und bei 0.25 und 0.5 MAC Enfluran beobachtet. Die Zugabe von DPCPX zeigte bei 1 MAC Enfluran keinen Effekt. Weitere Untersuchungen zeigten, dass die Oszillationen dosisabhängig (10 - 30 μ M) durch S-(p-nitrobenzyl)-6-thioguanosine (NBTG), einen Hemmer der Adenosinaufnahme, unterdrückt wurden. Andererseits führte die metabolische Konversion von Adenosin in Inosine mit Hilfe von Adenosin-Deaminase (2 U/ml) zu einem starken Anstieg der Oszillationsamplituden in einigen Präparaten.

Schlussfolgerungen

Die volatilen Anästhetika aktivieren Adenosine-A1-Rezeptoren in primären Hippokampusneuronen. Dieser Effekt wird vermutlich indirekt vermittelt über einen Adenosinanstieg als Folge einer Beeinflussung des Adenosin-Transportmechanismus oder der Schlüsselenzyme im Adenosinstoffwechsel durch die volatilen Anästhetika. Interessant ist in diesem Zusammenhang die Beobachtung anderer Untersucher, dass auch unter hypoxischen oder ischämischen Bedingungen die exzitatorische Signalübertragung in Hippokampusneuronen über die Freisetzung von Adenosin und die Aktivierung von Adenosin-A1-Rezeptoren gehemmt wird (3).

Literatur

1. Sakai N, Yamada M, Numakawa T, Ogura A, Hatanaka H: BDNF potentiates spontaneous Ca^{2+} -oscillations in cultured hippocampal neurons. *Brain Res* 1997, 778: 318-328.
2. Tas P.W.L., Eisemann C., Roewer N: The volatile anesthetic isoflurane suppresses spontaneous calcium oscillations in vitro in rat hippocampal neurons by activation of adenosine A1 receptors. *Neurosci Lett* 2003, 338: 229-232.
3. Brundage J.M., Dunwiddie T.V: Modulation of excitatory synaptic transmission by adenosine released from single hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci* 1996, 16: 5603-5612.

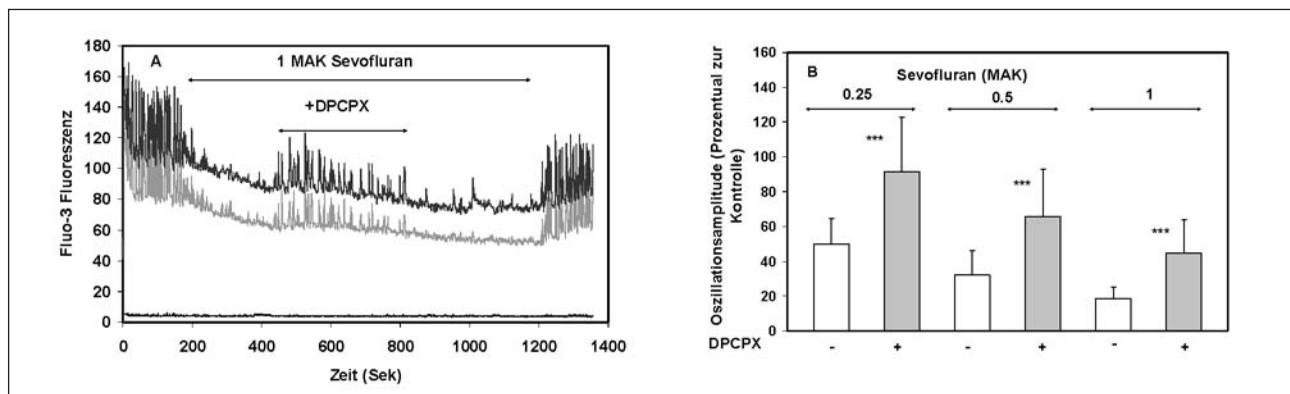


Abbildung 1a: Unterdrückung der spontanen Ca^{2+} -Oszillationen durch 1 MAC Sevofluran und Reversion der Hemmung durch 100 nM DPCPX. Die Abbildung zeigt die Original-Aufzeichnungen von zwei Hippokampusneuronen.
b. Quantifikation der Oszillationshemmung in An- oder Abwesenheit von DPCPX für 0.25; 0.5 und 1 MAC Sevofluran. (***) $p < 0.001$, Student's T-test).

Die Bedeutung von GABA_A-Rezeptoren mit einer β 3-Untereinheit für die hemmende und synchronisierende Wirkung von Etomidat in kortikalen Netzwerken

B. Drexler¹, C. L. Roether¹, R. Jurd², U. Rudolph² und B. Antkowiak¹

¹ Sektion Experimentelle Anaesthesiologie, Abteilung für Anaesthesiologie und Intensivmedizin, Eberhard-Karls-Universität Tübingen

² Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Zürich

Fragestellung

Zahlreiche Isoformen des GABA_A-Rezeptors, die sich in ihren Untereinheiten unterscheiden, sind heute bekannt. Das intravenöse Anästhetikum Etomidat wirkt über GABA_A-Rezeptoren, die eine β 2- oder β 3-Untereinheit besitzen [1]. Bei Mäusen, die eine Punktmutation in der β 3-Untereinheit aufweisen, kann Etomidat über diese Untereinheit keine Effekte mehr ausüben [2]. Im Neokortex besitzen nur 25% aller GABA_A-Rezeptoren eine β 3-Untereinheit. Es ist ungeklärt, in welcher Weise diese Rezeptoren zur Wirkung von Etomidat in der Großhirnrinde beitragen. Zur Charakterisierung der Effekte von Etomidat wurden vergleichende elektrophysiologische Untersuchungen an neokortikalen Gewebekulturen des Wildtyps und der β 3-N(265)M Mutante durchgeführt. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Etomidat (0,2 μ M) in Präparaten der Mutante zu einer signifikant geringeren Hemmung der Spontanaktivität führt ($n = 9$; 30,9% vs. 65,4%; $p < 0,05$) als in Präparaten des Wildtyps [2].

Methodik

Gewebeschnitte aus dem Neokortex junger Mäuse (P2-4) der β 3-N(265)M Mutante und des Wildtyps wurden kultiviert. Das nach zwei bis drei Wochen weitgehend ausgereifte neuronale Netzwerk zeigte spontane elektrische Aktivität. Mittels extrazellulärer Ableitungen wurden die Effekte von Etomidat untersucht. Registriert wurde das lokale Feldpotential als Korrelat synchroner synaptischer Aktivität. Netzwerksoszillationen wurden durch Fourier-Analyse charakterisiert. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt.

Ergebnisse

Präparate des Wildtyps und der Mutante zeigten unter Kontrollbedingungen keine signifikanten Unterschiede. Oszillatorische Prozesse wurden beim Wildtyp im Bereich von 3 - 8 Hz durch das Anästhetikum verstärkt, während in Präparaten der Mutante in diesem Frequenzband eine Dämpfung eintrat.

Interpretation

Die β 3-Untereinheit des GABA_A-Rezeptors vermittelt teilweise die hemmende und weitgehend die synchronisierende Wirkung von Etomidat auf neokortikale Neurone. Da kürzlich gezeigt werden konnte, dass die β 2-Untereinheit allenfalls für die sedierende Wirkung von Etomidat verantwortlich ist [3], werden die klinisch relevanten Wirkungen dieser Substanz weitgehend über GABA_A-Rezeptoren mit β 3-Untereinheit vermittelt.

Literatur

1. Belelli D., Lambert J.J., Peters J.A., Wafford K., Whiting P.J. The interaction of the general anesthetic etomidate with the γ -aminobutyric acid type A receptor is influenced by a single amino acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:11031-11036.
2. Jurd R., Arras M., Lambert S., Drexler B., Siegart R., Crestani F, et al. General anesthetic action in vivo strongly attenuated by a point mutation in the GABA_A receptor β 3 subunit. *FASEB J* 2003; 17:250-252.
3. Reynolds D.S., Rosahl T.W., Cirone J., O'Meara G.F., Haythornthwaite A., Newman R.J., et al. Sedation and Anesthesia Mediated by Distinct GABA_A-Receptor Isoforms. *J Neurosci* 2003; 23:8608-8617.

Unterschiede im molekularen Wirkmechanismus von Sevofluran und Propofol auf spinale Neurone in vitro

Ch. Grasshoff und B. Antkowiak

Sektion Experimentelle Anaesthesiologie, Abteilung für Anaesthesiologie und Intensivmedizin, Eberhard-Karls-Universität Tübingen

Fragestellung

Ein zentraler Aspekt der Narkose ist die Unterdrückung von Schmerzreflexen. Sie wird durch eine Hemmung der Erregbarkeit spinaler Neurone herbeigeführt [1]. Von der überwiegenden Zahl der klinisch verwendeten Allgemeinanaesthetika ist allerdings nicht bekannt, welche molekularen Zielstrukturen im Bereich klinisch relevanter Dosierungen hierfür von Bedeutung sind. In dieser Arbeit wurden die Wirkmechanismen eines geräuchlichen inhalativen Anästhetikums (Sevofluran) sowie eines intravenösen Anästhetikums (Propofol) an organotypischen Rückenmarksnerven der Ratte untersucht.

Methodik

Den thorakalen und lumbalen Segmenten des Rückenmarks embryonaler Ratten (E13-15) wurden Gewebeschnitte entnommen und nach der von Gähwiler beschriebenen Methode kultiviert [2]. Ab dem 14. Tag in vitro wurden Aktionspotenziale von Interneuronen des Vorderhorns extrazellulär registriert. Zur Quantifizierung des Erregungszustandes diente die Rate, mit der diese Neurone spontan Aktionspotenziale generieren. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt.

Ergebnisse

Sevofluran und Propofol verminderten die Spontanaktivität der Neurone konzentrationsabhängig. Die Konzentrationen halbmaximaler Wirkungen (EC50) betragen für Sevofluran $0,12 \pm 0,01$ mM ($0,34 \pm 0,04$ MAC) und für Propofol $0,11 \pm 0,01$ μ M und sind somit von klinischer Relevanz. Die Konzentrations-Wirkungskurve für Sevofluran zeigte im Bereich hoher Konzentrationen (2-3 MAC) eine vollständige Unterdrückung der Aktionspotenzialaktivität. Im Gegensatz hierzu hemmte Propofol die Feuerraten maximal um ca. 60%. Zur Charakterisierung der molekularen Wirkmechanismen wurden die Wirkungen von 0,5 MAC Sevofluran bzw. 0,5 μ M Propo-

fol auf spontane Feuerraten in Anwesenheit verschiedener Rezeptorantagonisten getestet. Vor Applikation des jeweiligen Anästhetikums wurde entweder der GABA_A-Rezeptorantagonist Bicucullin (100 μ M), der Glyzin-Rezeptorantagonist Strychnin (1 μ M) oder eine Kombination beider Antagonisten zum Perfusionsmedium hinzugegeben. Die Wirkung von Sevofluran auf die Spontanaktivität war in Anwesenheit von Bicucullin um 38% ($n = 13$, $p < 0,01$), in Anwesenheit von Strychnin um 45% ($n = 11$, $p < 0,001$) und in Anwesenheit beider Antagonisten um 78% ($n = 11$, $p < 0,001$) reduziert. Propofol hingegen zeigte in Gegenwart von Bicucullin keinerlei hemmende Wirkung ($n = 9$, $p < 0,001$). Strychnin beeinflusste den Effekt von Propofol auf spinale Neurone nicht.

Interpretation

Die untersuchten Narkosemittel unterdrücken in niedrigen, klinisch relevanten Dosierungen die spontane Feuerrate spinaler Neurone. Sevofluran und Propofol unterscheiden sich jedoch hinsichtlich des molekularen Wirkmechanismus. Sevofluran wirkt vorwiegend über Glyzin- und GABA_A-Rezeptoren und moduliert somit beide inhibitorischen Transmittersysteme im Rückenmark. Im Gegensatz hierzu wirkt Propofol nahezu ausschließlich über GABA_A-Rezeptoren. Die Beobachtung, dass die Effekte von Propofol fast ausschließlich über GABA_A-Rezeptoren vermittelt werden, kann die eingeschränkte Hemmung der Netzwerkaktivität durch Propofol in unserer Studie erklären.

Literatur

1. Sonner J.M., Antognini J.F., Dutton R.C. et al. Inhaled anesthetics and immobility: Mechanisms, mysteries and minimum alveolar anesthetic concentration. *Anesth Analg* 2003; 97:718-740.
2. Gähwiler B.H. Organotypic monolayer cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods* 1981; 4: 329-342.

Wirkung von Opioiden auf den menschlichen 5-HT₃-Rezeptor

M. Wittmann, I. Peters, J. Nadstawek, B. W. Urban und M. Barann
Klinik für Anästhesiologie und Spezielle Intensivmedizin der Universität Bonn

Fragestellung

Der 5-HT₃-Rezeptor ist der einzige ligandgesteuerte Ionenkanal unter den Serotoninrezeptoren. Er spielt sowohl bei der Vermittlung von Nausea und Emesis als auch bei der Modulation der Nozizeption eine wichtige Rolle [1]. Historisch wurde der 5-HT₃-Rezeptor wegen seiner Affinität für Morphin als M-Rezeptor klassifiziert. Da Opiode sowohl Emesis als auch Analgesie hervorrufen, stellt sich die Frage, ob humane 5-HT₃-Rezeptoren ein pharmakologisch relevantes Ziel für Opiate sein könnten.

Methode

In HEK-293 Zellen stabil transfizierte humane 5-HT_{3A}-Rezeptoren wurden elektrophysiologisch mittels der Patch-Clamp-Technik im „voltage-clamp“-Modus bei einer Membranspannung von -60 mV in „whole cell patches“ gemessen.

Ergebnisse

5-HT (Serotonin) verursachte einen konzentrationsabhängigen Einwärtsstrom (EC₅₀-Wert = 2.04 µM). Diese durch 5-HT (3 µM) induzierten Ströme wurden durch Fentanyl (IC₅₀ = 0.034 µM), Hydromorphon (IC₅₀ = 0.15 µM), Morphin (IC₅₀ = 1.0 µM) und Piritramid (IC₅₀ = 8.56 µM) konzentrationsabhängig und bei klinischen Konzentrationen gehemmt (Abb. 1). Die Wirkung von Morphin war kompetitiv und somit spezifisch, denn die Konzentrations-Wirkungskurve von 5-HT wurde durch Morphin (1 µM) nach rechts verschoben. Neben dieser Inhibierung des Peakstromes des 5-HT₃-Rezeptors und einer Verlangsamung seiner Aktivierung hatte Morphin auch eine zusätzliche potenzierende Wirkung, denn es verlangsamte deutlich die Inaktivierung des durch Serotonin-evozierten Stromes.

Interpretation

Die Wirkkonzentrationen am 5-HT₃-Rezeptor korrelieren mit der klinischen analgetischen Potenz [2] der Opiode (Abb. 2). In Übereinstimmung mit Befunden an 5-HT₃-Rezeptoren der Ratte [3] belegen die Ergebnisse einen kompetitiven Hemmeffekt von Morphin an humanen 5-HT₃-Rezeptoren. Eine reine Hemmung der Signale spräche gegen eine Beteiligung von 5-HT₃-Rezeptoren an Opioid-induzierter Emesis. Dem gegenüber zeigt sich aber gleichzeitig eine Verlangsamung der Inaktivierung der Ströme mit der Konsequenz, dass die Ionenkanäle länger geöffnet bleiben. Dieser Effekt kann die Vermittlung von Morphin-induzierter Emesis über 5-HT₃-Rezeptoren begünstigen. Die Beobachtung, dass die Hemmpotenz der Opiode am 5-HT₃-Rezeptor mit den entsprechenden klinischen analgetischen Wirkpotenzen korrelieren, legt die Vermutung nahe, dass Opiodeffekte auf den menschlichen 5-HT₃-Rezeptor eine Rolle bei der Schmerzmodulation spielen könnten. Darüber hinaus deutet sich die Möglichkeit an, dass die analgetische und die emetogene Wirkung durch gezielte Synthese neuer Opiode pharmakologisch separierbar sein könnten.

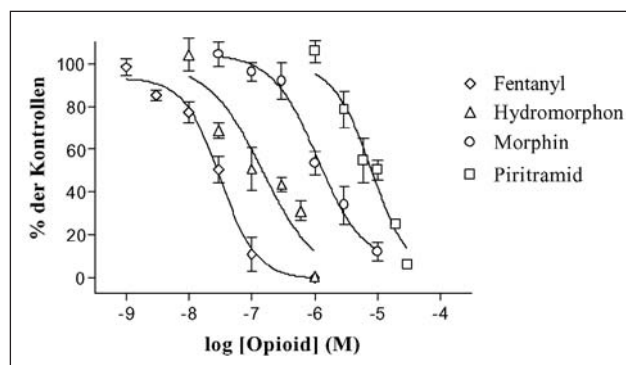


Abbildung 1: Inhibierung des 5-HT₃-Rezeptors durch vier Opiode.

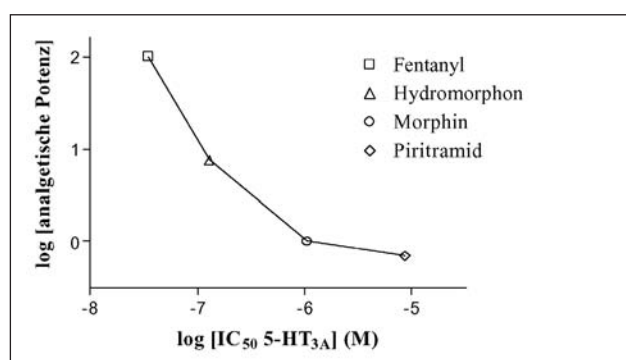


Abbildung 2: Korrelation der analgetischen Potenz der Opiode mit ihrer Wirkung (IC₅₀-Werte) am 5-HT₃-Rezeptor (siehe Abb. 1).

Literatur

- Barann M., Molderings G., Brüß M., Bönisch H., Urban B.W., Göthert M: Direct inhibition by cannabinoids of human 5-HT_{3A}-receptors: probable involvement of an allosteric modulatory site. *Br J Pharmacol* 2002; 137, 589-96.
- Fan P: Nonopioid Mechanism of Morphine Modulation of the Activation of 5-Hydroxytryptamine Type-3-Receptors. *Mol Pharmacol* 1995 Mar;47(3):491-5.
- Frey E: Opiode in der Medizin. Springer-Verlag 1999.

Gewebständige Monozyten/Makrophagen in der Entzündung: Hyperalgesie versus Opioid-vermittelte periphere Antinozizeption

A. Brack¹, D. Labuz¹, A. Schiltz¹, H.L. Rittner¹, M. Schäfer¹, R. Reszka² und C. Stein¹

¹ Klinik für Anästhesiologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin und

² AG Drug Targeting, Max-Delbrück-Zentrum für Molekulare Medizin, Berlin-Buch

Fragestellung

In einer Entzündung werden schmerzverstärkende (i.e. pro-algetische; z.B. Zytokine und Protonen) und schmerzhemmende (i.e. antinozizeptive) Mediatoren von Leukozyten gebildet [1]. Die am besten charakterisierte antinozizeptive Wirkung wird durch endogene Opioidpeptide vermittelt: im Tiermodell einer durch Freund's Complete Adjuvant (FCA) induzierten Entzündung wandern Opioid-haltige Leukozyten ein, setzen nach Stressreizen wie z.B. Kaltwasserschwimmstress (CWS) Opioidpeptide frei und erzeugen eine lokale Antinozizeption [2]. In dieser Studie wurde untersucht, i) in welchen Phasen der Entzündung Monozyten/Makrophagen die größte Leukozytensubpopulation darstellen und ii) ob die selektive Depletion dieser Zellpopulation durch Clodronat-haltige Liposomen (Cl2MDPLipos) in

der späten Entzündung die Hyperalgesie oder die Antinozizeption vermindert.

Methodik

Wistar-Ratten (n = 5 - 7 je Gruppe) wurde 150µl FCA intraplantar (i.pl.) injiziert. Zellsuspensionen der entzündeten Pfote wurden mittels Durchflusszytometrie (FACS) mit Antikörpern gegen Leukozyten (CD45), Monozyten/Makrophagen (ED1), Granulozyten (RP-1), Lymphozyten (CD3) und Opioidpeptide (3E7) im Zeitraum 2 - 96 h post FCA analysiert. Weitere FCA-injizierte Ratten erhielten entweder Cl2MDP-Lipos oder PBS i.pl. injiziert (je 150 µl; 1 und 24 h post FCA für 48 h sowie 1 und 48 h post FCA für 96 h Entzündungsdauer). Nach 48 bzw 96 h post FCA wurden

i) Zellsuspensionen mittels FACS analysiert, ii) die Pfotendruckschwelle (PPT = paw pressure threshold in [g]) und die Hitzeschwelle (PWL = paw withdrawal latency in [sec]) bestimmt und iii) die PPT nach CWS oder i.pl. Injektion von Fentanyl (1 µg) erneut gemessen [%MPE = maximum possible effect].

Ergebnisse

i) In der späten Entzündung (> 24 h post FCA) waren ED1⁺ Zellen die dominante Leukozytenpopulation (Abb. A, Mittelwert ± SEM) und die wesentlichen 3E7⁺ Zellen (71 - 77% aller CD45⁺ Zellen bei 48 bzw. 96 h post FCA); die Depletion mit Cl2MDP-Lipos wurde sowohl bei 48 als auch bei 96 h post FCA untersucht (letztere als Grafiken B-C); ii) Cl2MDP-Lipos reduzierten die Anzahl von ED1⁺CD45⁺ und 3E7⁺CD45⁺ Zellen, nicht aber von RP-1⁺CD45⁺ Zellen (48 h post FCA: PBS vs. Cl2MDP-Lipos: ED1: 661 ± 40 vs. 468 ± 77 x10³ Zellen/Pfote, 3E7: 381 ± 46 vs. 247 ± 29 x 10³ Zellen/Pfote beide p < 0,05, RP-1: 345 ± 51 vs. 295 ± 42 x 10³ Zellen/Pfote, p > 0,05, alle t-test; 96 h post FCA: Abb. B); iii) Cl2MDP-Lipos veränderten die PWL und die PPT der entzündeten Pfote nicht (48 h post FCA: PBS vs. Cl2MDP-Lipos: PWL 5,1 ± 0,3 vs. 5,5 ± 1,0 sec und PPT 33,3 ± 0,9 vs. 34,8 ± 1,3 g, beide p > 0,05, t-test; 96 h post FCA: Abb. C); iv) Cl2MDP-Lipos führten zu einem reduzierten Anstieg der PPT nach CWS, nicht aber nach Fentanylgabe (48 h post FCA: PBS vs. Cl2MDP-Lipos: PPT CWS: 74,9 ± 4,0 vs. 61,0 ± 4,9 % MPE; PPT Fentanyl: 56,9 ± 8,6 vs. 56,1 ± 7,6 % MPE, p < 0,05 und p > 0,05; t-test; 96 h post FCA: Abb. D).

Interpretation

In der späten Entzündung (> 24 h post FCA) vermitteln Opioid-haltige Monozyten/Makrophagen die periphere, Stress-induzierte Antinozipeption. Bereits eine moderate Depletion dieser Zellpopulation durch Clodronat-haltige Liposomen vermindert die körpereigene Schmerzhemmung, nicht aber die inflammatorische Hyperalgesie. Dieser Effekt beruht nicht auf einer unspezifischen Wirkung auf die Opioidrezeptoren, da die exogene

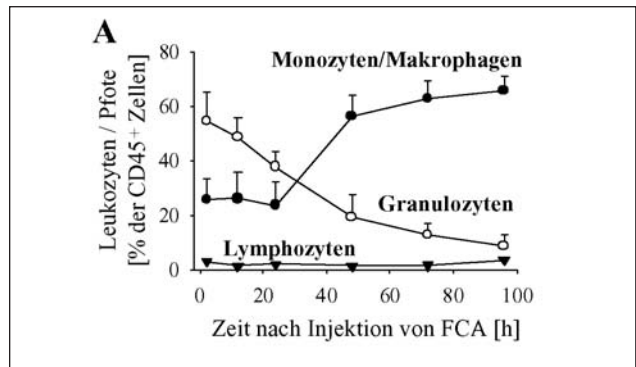


Abbildung 1a

Antinozipeption gegenüber Fentanyl unbeeinträchtigt bleibt. Unsere Daten legen folgende Interpretation nahe: Während eine erhöhte Migration von Leukozyten die Hyperalgesie nicht verstärkt [3], könnte eine entzündungshemmende Therapie initial paradoxerweise zu mehr Schmerzen führen.

Literatur

- Rittner H.L., Brack A., Stein C. Current Opinion in Anaesthesiology 2003; 16(5): 527-33.
- Stein C., Schäfer M., Machelska H. Nature Medicine 2003; 9(8): 1003-8.
- Brack A, Rittner HL, Machelska H et al. Pain 2004 in press.

Gefördert von der DFG (Klinische Forschergruppe KFO 100/1, TP 2: Brack/Rittner).

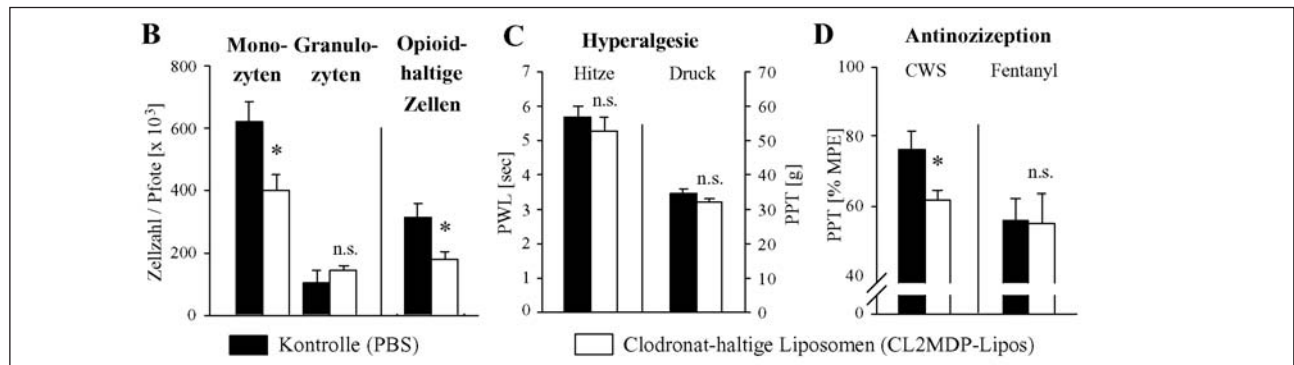


Abbildung 1 b-d

Sevofluran induziert mitochondrial- und caspase-vermittelt Apoptose in humanen T-Lymphozyten in vitro

T. Loop, D. Doviakue, M. Frick, L. Egger¹, F. Musshoff², H. Pahl, K. Geiger und B. Pannen

Anaesthesiologische Universitätsklinik

¹ Institut für Molekulare Medizin und Zellforschung, Universität Freiburg

² Institut für Rechtsmedizin, Universität Bonn

Fragestellung

Die Anwendung von Inhalationsanästhetika (IA) geht mit einer transienten Lymphopenie und dem Nachweis von proapoptotischen Faktoren, wie Fas/CD95 und seines Liganden FasL, einher [1, 2, 3]. Die molekularen Mechanismen dieser Immunmodulation durch IA sind bisher nur unvollständig charakterisiert. Mit dieser Untersuchung sollte die Frage beantwortet werden, ob Sevofluran (SEVO) 1. in humanen T-Lymphozyten Apoptose induziert und 2. welcher molekulare Mechanismus dafür verantwortlich sein könnte.

Methodik

Jurkat-T-Lymphomzellen wurden in vitro mit verschiedenen Konzentrationen von SEVO (bis 8 Vol.%) inkubiert. Die Konzentration von SEVO im Medium wurde gaschromatographisch-massenspektrometrisch mittels

Headspace-Festphasenmikro-extraktions-Technik bestimmt. Die Analyse der Apoptose, des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\psi_m$) und der reaktiven O₂-Spezies (ROS) erfolgte mittels Flowzytometrie nach Annexin V-FITC- und DiOC₆-Färbung, der Caspase-3-Aktivität mittels fluorogenem Assay (Ac-DEVD-AMC Substrat) und der Procaspase-3-Degradation mittels Western Blot. Die mitochondriale Cytochrom C-Freisetzung wurde nach Zellfraktionierung mittels Western Blot und „Enzyme Linked Immunosorbent Assay“ bestimmt. Die Ergebnisse wurden statistisch mittels Varianzanalyse (ANOVA mit Student-Newman-Keuls-Post-Hoc-Test, Signifikanzniveau p < 0.05) verglichen.

Ergebnisse

SEVO induzierte Apoptose in humanen T-Lymphozyten (Tab. A und Abb. 1). SEVO reduzierte das $\Delta\psi_m$ und steigerte die Produktion von ROS

Tabelle: Apoptose in T-Lymphozyten; Median (25 - 75% KI); *p < 0.05 vs. Kontrollen; # p < 0.05 vs. SEVO.

A	Kontrollen	SEVO
Annexin V-FITC (%)	6 (4-8)	16 (13-23)*
DiOC ₆ /Δψ _m (%)	94 (93-95)	86 (81-89)*
ROS (%)	4 (3-5)	13 (10-16)*
Caspase-Aktivität	1	3.1 (2-4.8)*
Cytochrom C (ng)	2.8 (2.7-3.1)	1.1 (0.7-1.1)*
B	SEVO	SEVO + z-VAD-fmk
Annexin V-FITC (%)	14 (13-15)	6 (5-6)#

(Tab. A). Die Caspase-3-Aktivität in T-Lymphozyten war nach Exposition mit SEVO gegenüber unbehandelten Zellen 3-fach gesteigert (Tab. A). Die Degradation der Procaspase-3 und die Spaltung ihres Substrats Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP) wurde dosisabhängig durch SEVO induziert (Abb. 2). Der Pancaspase-Inhibitor z-VAD-fmk hob die SEVO-induzierte Apoptose vollständig auf (Tab. B). T-Lymphozyten, die in Bezug auf Caspase-8 und die „Fas-associated-death-domain“ (FADD) gendefizient sind, zeigten nach SEVO-Exposition eine vergleichbare Apoptose wie Wildtyp-T-Zellen. SEVO führte zu einer signifikanten Abnahme des mitochondrialen Cytochrom C-Proteins in T-Lymphozyten.

Interpretation

SEVO induziert Caspase-3-abhängig und Fas/FADD-unabhängig Apoptose in humanen T-Lymphozyten in vitro. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass die SEVO-induzierte Apoptose durch die Abnahme des Δψ_m und der Cytochrom C-Freisetzung über die Mitochondrien der T-Lymphozyten vermittelt wird.

Literatur

- Oka M., Hirazawa K., Yamamoto K., Iizuka N., Hazama S., Suzuki T., Kobayashi N: Induction of Fas-mediated apoptosis on circulating lymphocytes by surgical stress. *Ann Surg* 1996;223:434-440.

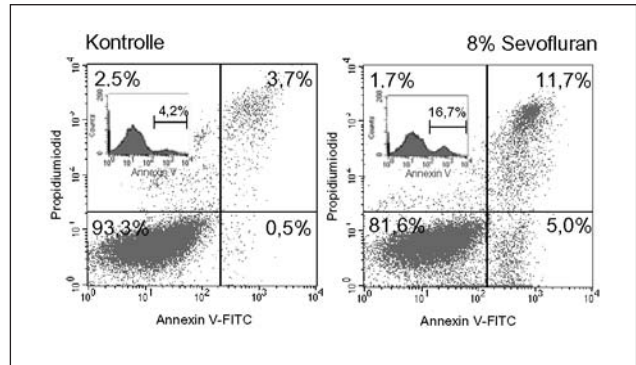


Abbildung 1: Exemplarische flowzytometrische Analyse.

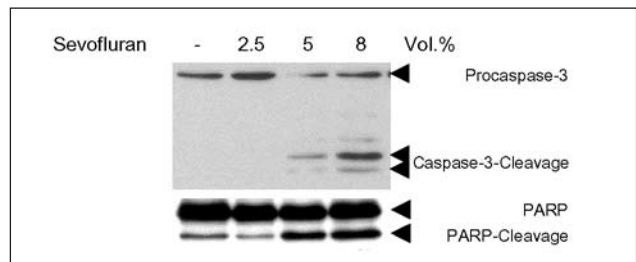


Abbildung 2: Western Blot für Caspase-3-Cleavage und PARP.

- Sugimoto M., Shimaoka M., Hosotsubo K., Tanigami H., Taenaka N., Kiyono H., Yoshiya I: Up-regulation of Fas ligand (FasL) mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) after major surgery. *Clin Exp Immunol* 1998 ;112 :120-125.
- Delogue G., Moretti S., Antonucci A., Marcellini S., Masciangelo R., Famularo G., Signore L., De Simone C: Apoptosis and surgical trauma: dysregulated expression of death and survival factors on peripheral lymphocytes. *Arch Surg* 2000;135:1141-1147.

Bedeutung des Duffy-Antigenrezeptors für Chemokine (DARC) beim durch Endotoxin induzierten akuten Nierenversagen (ANV)

K. Singbartl, S. große Bockhorn und H. Van Aken

Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin, Universitätsklinikum Münster

Fragestellung

Systemisch-inflammatorische Zustände zählen zu den Hauptursachen eines ANV bei kritisch kranken Patienten. Die Rekrutierung verschiedener Leukozytensubpopulationen, z.B. neutrophiler Granulozyten (PMN), ist ein zentrales Ereignis i.R. der inflammatorischen Organschädigung. Chemoattraktiven Cytokinen (Chemokine) kommt hierbei eine Schlüsselfunktion für die Aktivierung und spätere Extravasation von Leukozyten zu [1]. Im Vergleich zu den sog. klassischen Chemokinrezeptoren nimmt DARC eine Sonderstellung ein. Ursprünglich als Blutgruppenantigen und erythrozytäre Bindungsstelle für Plasmodien beschrieben wird DARC u.a. auch endothelial (selbst von serologisch Duffy negativen Individuen) exprimiert. DARC besitzt ferner eine breite Spezifität für Chemokine verschiedener Klassen [1]. Die genaue (patho-) physiologische Bedeutung von DARC i.R. inflammatorischer Ereignisse ist aber noch unbekannt. Ziel der vorliegenden Untersuchung ist es daher, die Bedeutung von DARC i.R. eines systemisch-inflammatorischen ANV aufzuzeigen.

Methodik

Alle Experimente waren durch die zuständige Aufsichtsbehörde genehmigt. DARC Gen-defiziente Mäuse (DARC^{-/-}) sowie entsprechende Wildtyp-Mäuse (WT) erhielten zur Induktion eines systemisch-inflammatorischen ANV 10 µg/g Körpergewicht LPS. Um die Bedeutung von PMN für die Ausbildung eines ANV unter diesen Bedingungen zu verifizieren, erhielt eine Untergruppe von WT 24 h vor LPS-Gabe zusätzlich Anti-PMN-Serum bzw. Kontrollserum. Nach 4 - 24 h wurden die Mäuse zwecks Organ- und Blutentnahme anästhesiert. Messungen der Kreatinin- und N-

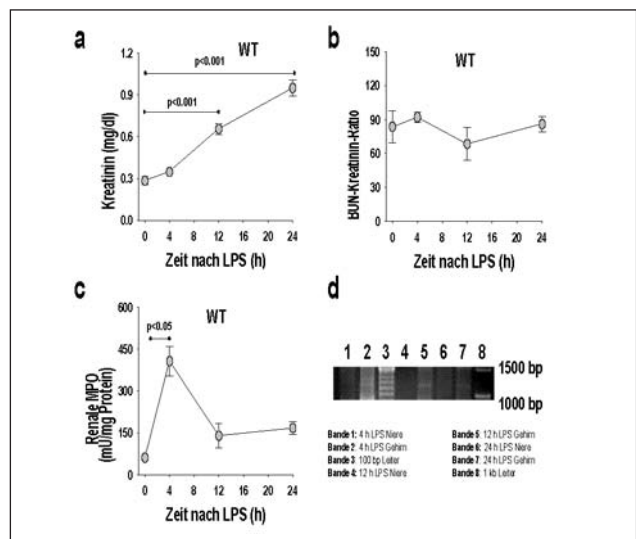


Abbildung 1: Einfluss von LPS auf die renale Funktion (a+b), renale PMN-Rekrutierung (c) und DARC mRNA-Expression (d, RT-PCR) in Wildtyp-Mäusen (WT).

Harnstoffkonzentrationen (BUN) im Plasma dienten als Indikator der Nierenfunktion. Die Quantifizierung der globalen renalen PMN-Rekrutierung erfolgte mittels Myeloperoxidase- (MPO) Assay. Immunhistologische Untersuchungen wurden zur Analyse der lokalen PMN-Rekrutierung durchgeführt. Die Expression von DARC wurde mittels RT-PCR evaluiert. Alle Ergebnisse wurden mit denen unbehandelter Kontrolltiere verglichen. Die statistische Auswertung bestand aus einfacher Varianzanalyse sowie Student-Newman-Keuls- und t-Test (Daten als MW \pm SEM, n = 5 - 7).

Ergebnisse

Abbildung 1 zeigt die Auswirkung der LPS-Gabe auf die Nierenfunktion (a+b), renale PMN-Rekrutierung (c) sowie die renale und cerebrale DARC mRNA-Expression in WT (d). Abbildung 2 zeigt den Vergleich zwischen WT und DARC hinsichtlich der renalen Funktion und MPO nach LPS-Gabe. PMN-depletierte WT zeigten 24h nach LPS-Gabe deutlich reduzierte Kreatininkonzentrationen (0,56 \pm 0,03mg/dl), die denen von DARC^{-/-} vergleichbar waren. In immunhistologischen Untersuchungen zeigten sowohl WT als auch DARC^{-/-} eine ausgeprägte renale PMN-Rekrutierung, die besonders in den cortico-medullären Abschnitten zu beobachten war. Während WT eine erhebliche interstitielle PMN-Infiltration aufwies, ließen sich in DARC^{-/-} nur sehr wenige extravasale PMN beobachten.

Interpretation

Eine LPS-Applikation verursacht in WT innerhalb von 24 h ein ausgeprägtes, intrarenales ANV, das zu einem erheblichen Teil PMN-abhängig ist. Trotz nicht nachzuweisender renaler DARC-Expression führt eine Blockade von DARC durch Gen-Defizienz zu einer erheblichen, klinisch-relevanten Protektion bei der Ausbildung eines LPS-induzierten ANV, ohne

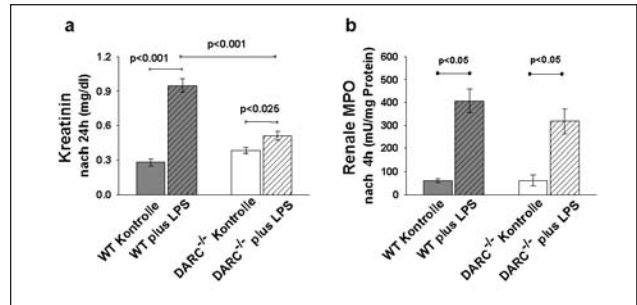


Abbildung 2: Vergleich von Wild-Typ-Mäusen (WT) und DARC-gendefizienten Mäusen (DARC^{-/-}) i.R. eines LPS-induzierten ANV.

allerdings die renale PMN-Rekrutierung insgesamt zu beeinflussen. Diese Ergebnisse lassen eine bedeutende extrarenale, d.h. systemische Rolle von DARC bei der Entstehung eines LPS-induzierten ANV vermuten, die möglicherweise durch eine Beeinflussung der Extravasation von PMN vermittelt wird.

Literatur

- Middleton, J., Patterson, A. M., Gardner et al.: (2002) Leukocyte extravasation: chemokine transport and presentation by the endothelium. *Blood* 100: 3853-3860.

Ein neuer Mechanismus für die Immunantwort von Gedächtnis-T-Zellen: Interaktion von CXCL12 (SDF-1 α) und CXCR4

T. W. Felbinger^{1,2}, M. L. Scimone², I. B. Mazo², J. V. Stein^{2,3}, U. H. von Andrian² und W. Weninger²

¹ Klinik für Anästhesiologie, Klinikum der Universität München

² CBR Institute for Biomedical Research und Department of Pathology, Harvard Medical School, Boston MA, USA

³ Centro Nacional de Biotecnología, Universidad Autónoma de Madrid, Campus Canto-Blanco, Madrid, Spanien

Fragestellung

Erworbene Immunität gegen virale oder bakterielle Infektionen ist ein essentieller Abwehrmechanismus des Körpers. Aufgrund unterschiedlicher Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinrezeptoren wurden vor kurzem zwei Subpopulationen von langlebigen Gedächtnis-T-Zellen beschrieben: Zentrale- und Effektor-Gedächtnis-(Memory)-T-Zellen (1). Zentrale Memory-CD8⁺-T-Zellen (T_{CM}) zirkulieren durch sekundäre lymphatische Organe (SLO) aufgrund ihrer Expression von L-Selektin (CD62L) und Chemokinrezeptor 7 (CCR7). Bei Reinfektion mit demselben Pathogen reagieren solche Antigen-spezifischen Gedächtnis-Zellen in SLO mit rascherer Proliferation. Da die Migration von T_{CM} in Lymphknoten von pl_t/pl_t-Mäusen (Spontanmutation der CCR7-Liganden CCL19/ELC/ MIP-3b, CCL21-Ser/SLC/TCA-4/6Ckine/exodus-2) nicht vollständig aufgehoben, sondern nur teilweise reduziert ist (2), war es das Ziel dieser Untersuchungen, diesen CCR7-unabhängigen molekularen Mechanismus zu klären, mit dem TCM in der Lage sind, in SLO zu gelangen.

Methodik

TCM wurden durch Kultur einer Zellsuspension von Splenozyten einer Wildtyp-Maus für 5 - 7 Tage nach Stimulation mit anti-CD3 ϵ (1 μ g/ml) und Interleukin-15 (20 ng/ml) generiert (2). In vitro markierte T_{CM} (tetramethylrhodamine-5-isothiocyanate, TRITC; 30 mg/ml) wurden in die Schwanzvene von rezipienten Mäusen injiziert. Peripheres Blut, Milz, mesenteriale und periphere Lymphknoten wurden nach 1h oder 24 h entnommen. Die entsprechenden Zellsuspensionen der einzelnen Organe wurden mittels FACS analysiert und der Homing-Index berechnet (2, 3). In einigen Experimenten wurden T_{CM} vor Injektion mit Pertussis-Toxin oder anti-CXCL12 inkubiert. Zur Quantifizierung des Rollens und der festen Adhäsion von T_{CM} an postkapilläre Venolen wurde bei anästhesierten Tieren Intravitalmikroskopie, wie beschrieben, durchgeführt (Fluoreszenz-Epi-Illumination, videogetriggerte Xenon-Stroboskop-Lampe) (2, 3).

Ergebnisse

Intravitalmikroskopie des inguinalen Lymphknotens von pl_t/pl_t-Mäusen ergab, dass T_{CM} in postkapillären Venolen (High Endothelial Venules) rol-

len und fest adhären. Dies zeigt, dass T_{CM} aus der Blutbahn, und nicht aus der Lymphe in die T-Zell-Areale von Lymphknoten wandern. Im Gegensatz zu T_{CM} können naive T-Zellen zwar rollen, aber nicht fest adhären. Das deutet darauf hin, dass naive T-Zellen komplett auf CCR7-Liganden angewiesen sind. Homing-Experimente von T_{CM} ergaben, dass die Akkumulation von T_{CM} in Lymphknoten Pertussis-Toxin sensitiv ist, was beweist, dass die Migration von T_{CM} von G α_i -verbundenen Proteinen, zu welchen Chemokinrezeptoren gehören, abhängt. Desensibilisierung von T_{CM} mit CXCL12 hemmte die Migration von T_{CM} in periphere Lymphknoten, nicht aber in die Milz. Hingegen ermöglichte exogene Applikation von CXCL12 in verschiedenen peripheren Geweben, wie etwa dem Cremaster Muskel, auch das Wandern von T_{CM}, nicht aber von naiven T-Zellen, in nicht-lymphatische Organe.

Interpretation

Unabhängig von der Chemokin-Interaktion CCR7-CCL19/21 sind T_{CM} durch Interaktion ihres Chemokin-Rezeptors CXCR4 mit dem Chemokin CXCL12 (SDF-1 α), dessen Expression bei Entzündungen hochreguliert wird, in der Lage, in lymphatische und nicht-lymphatische Organe zu gelangen. Dieser neu beschriebene Mechanismus ermöglicht TCM zur Ausübung protektiver Immunität flexibler als naive T-Zellen auf chemotaktische Stimuli zu reagieren. Außerdem assistiert dieser Mechanismus T_{CM} an den Ort einer Entzündung zu gelangen.

Literatur

- Sallusto F, Lenig D, Forster R., Lipp M., Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 1999; 401:708-712.
- Weninger W., Crowley M.A., Manjunath N., von Andrian U.H. Migratory properties of naive, effector, and memory CD8(+) T cells. *J. Exp. Med.* 2001; 194:953-966.
- Hoffmeister K.M., Felbinger T.W., Falet H., Denis C.V., Bergmeier W., Mayadas T., von Andrian U.H., Wagner D.D., Stossel T.P., Hartwig J.H. Mechanism of rapid clearance of transfused chilled platelets. *Cell* 2003; 112: 87-97.

“Ecstasy” hat einen peripheren Wirkmechanismus am Skelettmuskel von Patienten mit Veranlagung zu Maligner Hyperthermie

M. Fiege, F. Wappler, R. Weißhorn, M.U. Gerbershagen, K. Kolodzie und J. Schulte am Esch
Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Hamburg

Fragestellung

In tierexperimentellen Studien konnte bei Schweinen mit MH-Veranlagung (MHS) durch die Gabe von 3,4-Methylenedioxyamphetamin (MDMA, „Ecstasy“) eine MH-Krise ausgelöst werden (1). Kontrovers ist allerdings, ob MDMA die MH-Reaktion durch Stimulation zentraler Rezeptoren oder über eine direkte Wirkung am peripheren Skelettmuskel induziert hat. In der vorliegenden Untersuchung wurde daher die Wirkung von MDMA auf isolierte Skelettmuskelpräparate von MHS- und MH-normalen (MHN) Patienten überprüft.

Methodik

Nach Genehmigung durch die Ethikkommission wurden 19 Patienten mit Verdacht auf Veranlagung zur MH untersucht. Bei allen Patienten wurde eine Muskelbiopsie aus *M. quadriceps femoris* in triggerfreier Allgemein-anästhesie oder in Leitungsanästhesie entnommen. Die Überprüfung der MH-Disposition erfolgte standardisiert mit dem In-vitro-Kontrakturtest (IVKT) mit Halothan und Koffein nach dem Protokoll der „European MH Group“ (2). Jeweils ein weiterer vitaler Muskelfaszikel wurde für einen IVKT mit MDMA verwendet. Das MDMA wurde dem Muskelfaszikel kumulativ in 10-minütigen Abständen in Organbadkonzentrationen von 0,5 – 1,0 – 2,0 – 4,0 – 8,0 mmol/l zugeführt. Die Muskelkontraktionskraft und die Kontrakturrentwicklung wurden kontinuierlich registriert. Die Daten sind angegeben als Mediane und Variationsbreiten. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem U-Test nach *Mann* und *Whitney* ($p < 0,05$).

Ergebnisse

Neun Patienten wurden durch den IVKT mit Halothan und Koffein als MHS, zehn Patienten als MHN diagnostiziert. MDMA induzierte dosisabhängig in allen MHS-Muskelpräparaten eine Kontrakturrentwicklung (Abb. 1). Bei zwei MHS-Muskeln setzte bereits bei einer MDMA-Konzentration von 0,5 mmol/l eine Kontraktur von maximal 1,1 mN ein. Bei 4,0 mmol/l MDMA zeigten sieben MHS-Muskelpräparate eine Kontraktur von 8,4 mN (0,0 – 12,5 mN). Die Kontraktur der MHS-Muskeln bei 8,0 mmol/l MDMA betrug 16,0 mN (10,8 – 18,0 mN). Neun MHN-Muskelpräparate zeigten nach Gabe von MDMA keine Veränderung der Muskelgrundspannung, lediglich ein MHN-Muskel entwickelte bei 8,0 mmol/l MDMA eine Kontraktur von 3,3 mN. MDMA wirkte sowohl bei den MHS- als auch bei den MHN-Muskeln negativ inotrop. Bei den MHS-Muskeln fiel die Muskelkontraktionskraft von 47,0 mN (10,2 – 50,2 mN) vor Versuchsbeginn auf 3,6 mN (1,6 – 12,3 mN). Bei den MHN-Muskeln kam es zu einem Abfall von initial 37,0 mN (10,4 – 85,9 mN) auf 9,4 mN (1,0 – 56,2 mN).

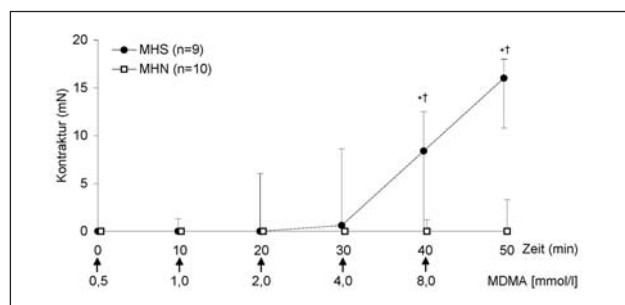


Abbildung 1: Kontrakturrentwicklung von MHS- und MHN-Muskeln im IVKT mit kumulativer Gabe von 0,5 - 8,0 mmol/l 3,4-Methylenedioxyamphetamin (MDMA).

* $p < 0,05$ MHS vs. MHN, † $p < 0,05$ MHS vs. 0 mmol/l MDMA.

Interpretation

In der vorliegenden Untersuchung wurde erstmals ein peripherer Wirkmechanismus von MDMA am isolierten Skelettmuskel nachgewiesen. MHS-Muskeln reagierten im Vergleich zu MHN-Muskeln auf die Exposition mit MDMA mit einer deutlichen Kontrakturrentwicklung. Die MDMA-Konzentration, die in vitro eine Kontrakturrentwicklung bei den MHS-Muskeln auslöste, war allerdings um ein Vielfaches höher als die in vivo gemessene Plasmakonzentration während der MDMA-induzierten MH beim Schwein ($3,97 \pm 0,49 \mu\text{mol/l}$ MDMA) (1). Dieses legt den Schluss nahe, dass MDMA eine MH-Krise vermutlich über einen zentralen Mechanismus, z.B. über die Stimulation von Serotoninrezeptoren induziert.

Literatur

- Fiege M, Wappler F, Weisshorn R., Gerbershagen M.U., Menge M., Schulte am Esch J: Induction of Malignant Hyperthermia in Susceptible Swine by 3,4-Methylenedioxy-methamphetamine (“Ecstasy”). *Anesthesiology* 99 (2003) 1132-1136.
- Ørding H. et al.: In vitro contracture test for diagnosis of malignant hyperthermia following the protocol of the European MH Group: results of patients surviving fulminant MH and unrelated low-risk subjects. *Acta Anaesthesiol Scand* 41 (1997) 955-966.

Genetische Risikofaktoren polytraumatisierter Patienten

S.G Little¹, T. Langefeld¹, J. Stricker¹, K. Weismüller¹, T. Menges¹, T. Chakraborty², G. Hempelmann¹ und G. Bein³

¹ Abteilung Anaesthesiologie, Operative Intensivmedizin, Schmerztherapie

² Institut für klinische Mikrobiologie

³ Institut für klinische Immunologie und Transfusionsmedizin
Universitätsklinikum Gießen

Fragestellung

Die vielfach sehr unterschiedliche Größenordnung der inflammatorischen Mediatorenfreisetzung polytraumatisierter Patienten zeigt als Ergebnis verschiedener Studien eine enge Assoziation zu genetischen Variabilitäten in Kandidatengen der inflammatorischen Reaktionskaskade [1]. Diese genetische Variabilität in Form von „Zwei-Allel-Polymorphismen“ (SNP's) proinflammatorischer Zytokine wie des Tumornekrosefaktors (TNF) und von Serinproteasen wie des Plasminogenaktivator-Inhibitors 1 (PAI-1) scheint dabei eine entscheidende Bedeutung für die Entwicklung einer Sepsis und Organfunktionsstörungen nach einem Trauma zu haben [2, 3]. Ausgehend von diesen klinischen Ergebnissen stellt sich die Frage nach der Bedeutung molekularbiologischer Genomanalysen als Möglichkeit der verbesserten Risikostratifizierung von polytraumatisierten Patienten speziell unter Berücksichtigung der Entwicklung einer Sepsis und eines Multiorganfunktionsyndroms (MODS).

Methodik

Die von der Ethikkommission genehmigte, prospektive Studie umfasste 149 polytraumatisierte Patienten, die über einen Zeitraum von mindestens 14 Tagen auf unserer operativen Intensivstation untersucht wurden. Neben einer standardisierten Medikamenten-, Infusions- und Transfusionstherapie einschließlich bedarfsadaptierter, kontrollierter Beatmung erfolgte eine Antibiotikatherapie nach Antibiogramm. Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurden SNP's im Tumornekrosefaktor alpha- (TNF α , Position -308 Promoterregion, G/A Austausch), Tumornekrosefaktor beta- (TNF β [LTA], Position 1064-1069 erstes Intron, A/G Austausch) und PAI-1-Gen (ein zusätzlich fünftes Guaninmolekül an Position -675 innerhalb der Promotorregion) mittels Sequenz spezifischer Proben (TaqMan 7000) analysiert. Die TNF α - und PAI-1-Plasmaspiegel wurden mittels Elisa-Technik in den ersten 48 Stunden 6-stündlich und dann 24-stündlich erfasst. Für jeden Polymorphismus wurde das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht entspre-

Polymorphismus	Genotyp	Sepsis	Keine Sepsis	Odds-Ratio (OR)	(95% Konfidenzintervall (CI))
TNF α	C/C	29 (19,5%)	71 (47,7%)		
	C/T	32 (21,5%)	8 (5,4%)	11,05	4,23 - 33,03
	T/T	6 (4,0%)	3 (2,0%)	122,16	17,91 - 1091,18
TNFB (LTA)	A/A	18 (12,1%)	40 (26,8%)		
	A/G	37 (24,8%)	38 (25,5%)	2,21	1,22 - 4,16
	G/G	12 (8,1%)	9 (6,1%)	4,89	1,48 - 17,34
PAI-1	5G/5G	15 (10,1%)	32 (21,5%)		
	4G/5G	31 (20,8%)	40 (26,8%)	1,85	1,11 - 3,14
	4G/4G	21 (14,1%)	10 (6,7%)	3,40	1,22 - 9,88
		Verstorben	Überlebt		
TNF α	C/C	15 (10,1%)	89 (59,7%)		
	C/T	20 (13,4%)	22 (14,8%)	6,53	2,63 - 17,1
	T/T	5 (3,4%)	4 (2,7%)	42,61	6,93 - 292,42
TNFB (LTA)	A/A (B1/B1)	7 (4,7%)	54 (36,2%)		
	A/G (B1/B2)	24 (16,1%)	48 (32,2%)	2,87	1,40 - 6,12
	G/G (B2/B2)	9 (6,0%)	7 (4,7%)	8,23	1,97 - 38,62
PAI-1	5G/5G	5 (3,4%)	42 (28,2%)		
	4G/5G	15 (10,1%)	51 (34,2%)	2,38	1,28 - 4,59
	4G/4G	20 (13,4%)	16 (10,7%)	5,67	1,64 - 21,1

chend dem von Guo und Thompson beschriebenen Verfahren bewertet [4]. Assoziationen zwischen Plasmaspiegeln (TNF α , PAI-1) und Polymorphismen (TNF α , TNFB, PAI-1) wurden mittels des Kruskal-Wallis- oder des Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests untersucht. Ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ war statistisch signifikant.

Ergebnisse

Die Verteilung der Genotypen für TNF α , TNFB, PAI-1 der Patienten entsprach der des Normalkollektivs von 52 Patienten. 67 Patienten (44,9%) entwickelten eine Sepsis, und 40 Patienten (26,8%) verstarben (Tab. 1).

Homozygote Patienten für die Allele TNFB2 und PAI-1/4G hatten signifikant höhere TNF α - und PAI-1-Plasmaspiegel als heterozygote und TNFB1 und PAI-1/5G homozygote Patienten ($p < 0,01$). TNF/B2- und PAI-1/4G homozygote Patienten haben gegenüber Patienten, die TNF/B1 und PAI-1/5G homozygot genotypisiert waren, ein 8,2-fach (LTA) und 5,7-fach (PAI-1) erhöhtes Risiko im septischen Multiorganversagen zu versterben.

Schlussfolgerung

Das gemeinsame Auftreten der Allele TNF/B2 und PAI-1/4G ist assoziiert mit der signifikant vermehrt freigesetzten Menge an TNF α und PAI-1. Die

Genotypisierung polytraumatisierter Patienten kann durch die Unterscheidung von „High“- und „Low-Respondern“ eine präzisere Definition von Hochrisikopatienten gewähren. Die Genomanalyse des TNF- und PAI-1 Genlocus kann neue therapeutische Ansatzpunkte zur Verbesserung der Prognose und Therapie kritisch kranker Patienten eröffnen.

Literatur

1. Cariou A., Chiche J.D., Charpentier J., Dhainaut J.F., Mira J.P.: The era of genomics: Impact on sepsis clinical trial design. Crit Care Med 2002; 30 (Suppl): S341-S348.
2. Majetschak M., Obertacke U., Schade U.F., Bardenheuer M., Voggenreiter G., Bloemeke B., Heesen M.: Tumor necrosis factor gene polymorphisms, leukocyte function, and sepsis susceptibility in blunt trauma patients. Clin Diagn Lab Immunol 2002; 9: 1205-1211.
3. Menges T., Hermans P.W.M., Little S.G., Langefeld T., Böning O., Engel J., Sluijter M., de Groot R., Hempelmann G.: The plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G promoter polymorphism affects prognosis and outcome of severely injured patients. Lancet 2001; 357 (9262): 1096-1097.
4. Guo S.W., Thompson E.A.: Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. Biometrics 1992; 48: 361-372.

Kalziumstoffwechsel in Myotuben von Individuen mit nicht eindeutigen Testergebnis im In-Vitro-Kontraktur-Test bei der Diagnostik der Malignen Hyperthermie

M. Wehner, H. Ruffert, F. König und D. Olthoff

Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie, Universitätsklinikum Leipzig AÖR

Fragestellung

Mit dem In-Vitro-Kontraktur-Test IVKT wird die Disposition zur Malignen Hyperthermie (MH) bestimmt [1]. Durch eine pathologische Muskelkontraktion nur auf eine der Testsubstanzen Halothan und Koffein kann bei einem Teil der Patienten die MH-Disposition nicht eindeutig als MH-positiv (MHS) bzw. MH-negativ (MHN) klassifiziert werden [1]. Diese Personen erhalten die Diagnose MHE und werden aus Sicherheitsaspekten klinisch als MH-positiv angesehen. Die tatsächliche Bedeutung des intermediären Testergebnisses ist jedoch nicht bekannt. Ziel der vorliegenden Arbeit war Untersuchung der intrazellulären Kalziumkonzentration in Ruhe und nach Exposition mit Aktivator des Ryanodinrezeptors in Myotuben von MHE-Patienten im Vergleich zu Myotuben einer Kontrollgruppe (MHN) und von Trägern einer MH-assoziierten Mutation im Ryanodinrezeptorgen Typ 1 (RyR1).

Methodik

Nach der Durchführung des IVKT wurden aus der Muskelbiopsie primäre Myotuben kultiviert. Die Bestimmung der intrazellulären Kalziumkonzentration erfolgte in Ruhe bzw. nach Exposition mit 4-Chloro-m-Cresol, Koffein und Halothan mit dem Kalziumimaging (System Fa. Till Photonics, Gräfelfing, Deutschland, Farbstoff FURA 2) [2].

Ergebnisse

Myotuben wurden von 13 MHE-Individuen, von 36 gesunden, MHN getesteten Kontrollpersonen und von 14 Mutationsträgern im RyR1-Gen (MHS) untersucht. Die intrazelluläre Kalziumkonzentration in Ruhe betrug in der ersten Untersuchungsserie für die Myotuben der Kontrollgruppe 53,4 nM (40,7/72,3; Median mit der 25. bzw. 75. Perzentile) und für die MHE-Myotuben 47,1 nM (39,3/56,7). In der zweiten Serie lag die Ruhokalzium-

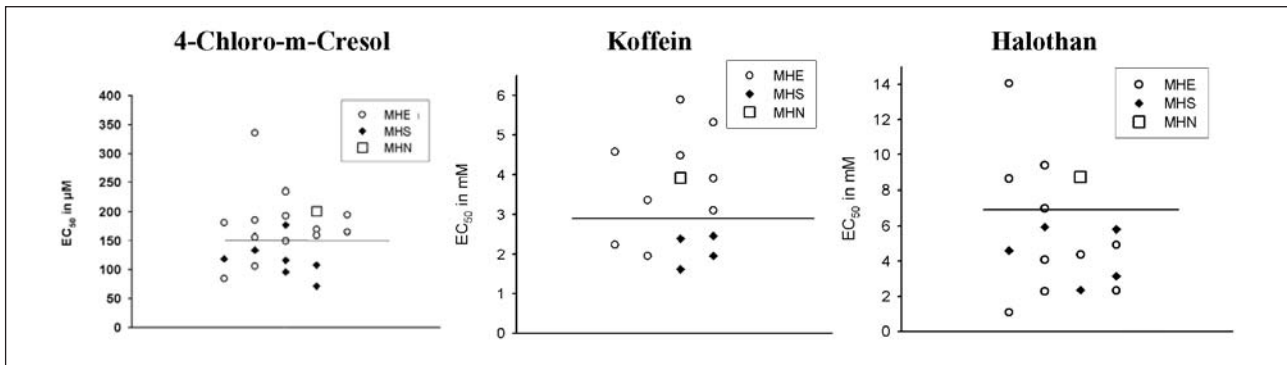


Abbildung 1: Verteilung des Medians der halbmaximalen Wirkkonzentration EC_{50} in humanen Myotuben für 4-Chloro-m-Cresol, Koffein und Halothan für MHE gefestete Personen, für Mutationsträger im RyR1-Gen (MHS) und für eine Kontrollgruppe (MHN). Das Quadrat kennzeichnet den Median der Kontrollgruppe und die Linie den Schwellwert für MHN Myotuben (4CmC 150 μ M, Koffein 3,0 mM, Halothan 7,5 mM). In der MHS-Gruppe wurden jeweils die Myotuben der RyR1-Mutationsträger in den einzelnen Familien zusammengefasst.

konzentration der MHN-Myotuben bei 56,7 nM (42,4/76,8) und der MHE-Myotuben bei 54,4 nM (42,2/67,1). Die Ruhekalziumkonzentration war nur bei einem MHE-Patienten signifikant erhöht (Kruskall-Wallis Anova on Ranks), dagegen regelmäßig bei den Myotuben der RyR1-Mutationsträger. Eine Erniedrigung der halbmaximalen Wirkkonzentration EC_{50} im Vergleich zur Kontrollgruppe ist Ausdruck einer höheren Sensitivität gegenüber den Ryanodinrezeptoragonisten. Dies konnte nur bei einem Teil der Myotuben der MHE-Individuen beobachtet werden (Abb. 1).

Interpretation

Der Nachweis einer erhöhten Ruhekalziumkonzentration und einer Erniedrigung der EC_{50} in Myotuben als typische Befunde bei RyR1-Mutationsträgern nur für einen Teil der MHE-Individuen unterstützt die Annahme, dass den MHE-Resultaten im IVKT falsch-positive Testergebnisse zu Grunde liegen können. Die häufigere Reduktion der EC_{50} für Halothan kann als Ausdruck der unspezifischen Effekte dieser Substanz

angesehen werden. Diese Befunde unterstreichen die Notwendigkeit, nach Wegen zu suchen, um die Spezifität der MH-Diagnostik zu steigern [3].

Literatur

1. The European Malignant Hyperpyrexia Group. A protocol for the investigation of Malignant hyperpyrexia (MH) susceptibility. *Br J Anaesth* 1984; 56:1267-1269.
2. Wehner M., Rueffert H., Koenig F., Neuhaus J., Olthoff D. Increased sensitivity to 4-chloro-m-cresol and caffeine in primary myotubes from MHS-individuals carrying the RyR1 Thr2206Met (C6617T) mutation. *Clin Genet* 2002; 62:135-146.
3. Wappler F., Anetseder M., Bauer C.P. et al. Multicenter evaluation of in vitro contracture testing with bolus administration of 4-chloro-m-cresol for diagnosis of malignant hyperthermia susceptibility. *Eur J Anaesthesiol* 2003; 20:528-536.

Halothan und Succinylcholin sind keine vergleichbaren Trigger bei maligne Hyperthermie-suszeptiblen Schweinen

F. Schuster, M. Anetseder, H. Schöll und N. Roewer
Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie, Universität Würzburg

Fragestellung

Succinylcholin gilt als Triggersubstanz der malignen Hyperthermie (MH). Unklar ist jedoch, ob Succinylcholin alleine beim Menschen eine fulminante MH-Krise auslösen kann. Unklar ist weiterhin, ob die bekannte „Triggerwirkung“ bei MH-Schweinen über die motorischen Endplatten oder über eine direkte Wirkung auf die Muskelfasern vermittelt wird [1, 2].

Wir nahmen an, dass die lokale intramuskuläre Succinylcholin-Applikation bei MHS-Schweinen zu keiner hypermetabolen Reaktion führt, während die systemische intravenöse Applikation von Succinylcholin eine Halothan-getriggerte MH-Krise potenziert.

Methodik

Mit Tierschutzgenehmigung wurden je 6 MHS- und MHN-Pietrain-Schweine (28 - 35 kg) mit Thiopental, Midazolam und Fentanyl anästhesiert und nach endotrachealer Intubation ventiliert. Die Vitalfunktionen wurden kontinuierlich überwacht (EKG, ABP, SpO₂, etCO₂, Temp.). Mikrodialysetsonden wurden ultrashallgesteuert im M. sartorius, im M. gracilis und eine Kontrollsonde im M. pectineus platziert und mit Ringerlösung mit 1 μ l min⁻¹ perfundiert. Nach 30 Minuten Äquilibration wurde ein Bolus von 10 mg Succinylcholin bzw. 100 μ l Halothan 5 Vol%, gelöst in Sojabohnenöl, an je eine Spitze einer Mikrodialysetsonde appliziert. Im Dialysat wurde Laktat über 135 Minuten in 15-minütigen Intervallen spektrometrisch gemessen.

In einem zweiten Versuch wurde bei 12 MHS- und 11 MHN-Tieren eine MH-Krise unter 15-minütlich steigender Halothankonzentration (0,5; 1 und 2 Vol%) und intravenöser Succinylcholingabe (4 mg kg⁻¹) induziert. Kohlen-

dioxid-Partialdruck und Laktat wurden diskontinuierlich in der V. femoralis bestimmt. Daten als Median und Quartilen. Friedman-Test und Wilcoxon-Test für Unterschiede zwischen den Succinylcholin-, Halothan- und Kontrollmessreihen mit $p < 0.05$.

Ergebnisse

Die mittels Mikrodialyse gemessenen intramuskulären Laktatwerte unterschieden sich nicht zwischen den Messreihen vor Medikamentengabe. Bei MHS-Tieren führte die intramuskuläre Halothan- bzw. Succinylcholin-Injektion zu einer maximalen Laktatkonzentration von 5,3 [5,1 - 10,4] mM bzw. 2,1 [2,0 - 2,6] mM gegenüber der Kontrollmessung mit 2,9 [2,3 - 3,0] mM. Bei MHN erhöhte weder Halothan (1,5 [1,4 - 2,7] mM), noch Succinylcholin (1,8 [1,5 - 2,0] mM) die lokale Laktatkonzentration im Vergleich zur Kontrollmessung (2,0 [1,8 - 2,3] mM) (Abb. 1). Die Vitalparameter unterschieden sich nicht.

Im zweiten Versuch führte die systemische Applikation von Succinylcholin unter 1 Vol% Halothan ausschließlich bei MHS-Tieren zu einem rasanten Anstieg des femoralvenösen pCO₂ von 57 [52 - 63] mmHg auf 90 [66 - 105] mmHg nach 5 min. und auf 155 [130 - 175] mmHg nach 10 min. Die Laktatkonzentration in der V. femoralis stieg in dieser Zeit von 2,5 [1,9 - 2,8] mM auf 17,5 [15,1 - 19,9] mM (Abb. 2).

Interpretation

Die direkte Exposition des MH-Muskels mit Succinylcholin führt im Tierversuch, im Gegensatz zu Halothan, weder in vitro noch in vivo zu MH-typischen Reaktionen wie Kontraktur [3] und Laktatanstieg. Damit ist eine direkte, nicht endplattenvermittelte Triggerwirkung von Succinylcholin

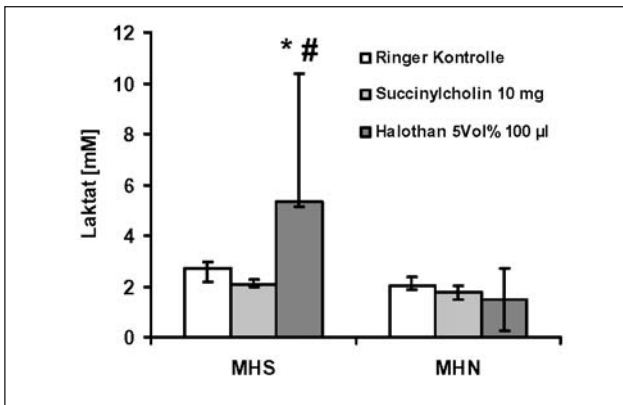


Abbildung 1: Maximale intramuskuläre Laktatwerte unter Mikrodiyalysen-perfusion nach Succinylcholin- bzw. Halothan-Applikation bzw. in der Kontrollmessreihe; n = 6 pro Messreihe; *, #: p < 0,05 Halothan vs. Kontrolle bzw. vs. Succinylcholin; Median und Quartilen.

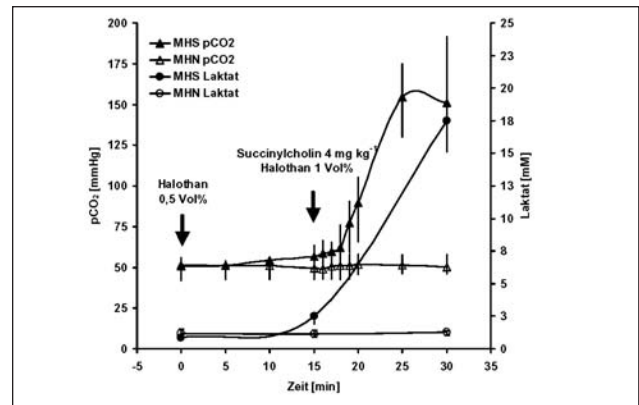


Abbildung 2: Laktatwerte bzw. pCO₂ in der Vena femoralis während einer Halothan-Succinylcholin-induzierten MH-Episode; MHS (n = 12), MHN (n = 11); Median und Quartilen.

unwahrscheinlich. Dagegen induziert Succinylcholin bei systemischer Applikation im Tierversuch eine MH1 und potenziert den Verlauf einer Halothan-getriggerten MH explosionsartig. Wir folgern hieraus, dass der MH-Pathomechanismus von Succinylcholin nicht über einen direkten Effekt an der Muskelzelle vermittelt wird, sondern vermutlich auf einer anhaltenden Depolarisation und der damit verbundenen Kalziumfreisetzung am Ryanodin-Rezeptor beruht.

Literatur

1. Sigg D.C, Iaizzo P.A: Malignant hyperthermia phenotype: hypotension induced by succinylcholine in susceptible swine. *Anesthesiology* 2000;92:1777-1788.
2. Iaizzo P.A, Wedel D.J: Response to succinylcholine in porcine malignant hyperthermia. *Anesth Analg* 1994;79:143-151.
3. Galloway G.J, Denborough M.A: Suxamethonium chloride and malignant hyperpyrexia. *Br J Anaesth* 1986;58:447-450.

Einladung*

zur Beteiligung an den 19. Wissenschaftlichen Arbeitstagen der DGAI

Die nächsten Wissenschaftlichen Arbeitstage der Deutschen Gesellschaft für Anästhesiologie und Intensivmedizin (DGAI) werden vom 18. - 19.02.2005 in Würzburg, Festung Marienberg, Hofstuben, veranstaltet.

Nach Maßgabe der Statuten** der Wissenschaftlichen Arbeitstage werden hiermit Interessenten, die Mitglieder der DGAI sind, eingeladen, ihre Teilnahme durch elektronische Einsendung eines Abstracts an die u. a. Anschrift anzumelden. Die angenommenen Arbeiten nehmen an dem Auswahlverfahren für das Forschungsstipendium der Fresenius-Stiftung teil.

Einsendeschluss: 05.01.2005

Nähere Informationen: <http://www.anaesthesie.uni-wuerzburg.de/wat>
E-Mail: Schubert_A@klinik.uni-wuerzburg.de

Anschrift:
Klinik und Poliklinik für Anaesthesiologie, Universitätsklinikum Würzburg (Sekretariat Frau A. Schubert),
Direktor: Prof. Dr. N. Roewer, Oberdürrbacher Straße 6, D-97080 Würzburg,
Tel.: 0931 / 20130001, Fax: 0931 / 20130444.

* siehe auch: *Anästh Intensivmed* 2003, 44: 348
** siehe: *Anästh Intensivmed* 2001, 42: 805-807