# Abstracts der 20. Wissenschaftlichen Arbeitstage der DGAI*

Die Vorträge, deren Abstracts nachfolgend publiziert werden, wurden in einem verblindeten Verfahren von fünf Gutachtern ausgewählt und auf den Wissenschaftlichen Arbeitstagen der DGAI vom **17. - 18.2.2006** in Würzburg gehalten und diskutiert. Nachfolgend wurde über die Publikationswürdigkeit der entsprechenden Abstracts im Plenum der Arbeitstage abgestimmt. Sie erfüllen damit die Kriterien einer begutachteten Publikation. Die **Auschreibung für die Wissenschaftlichen Arbeitstage 2007 und das DGAI-Forschungsstipendium der Fresenius-Stiftung** finden Sie auf der Seite 384.

## Bedeutung der Proteinkinase C und der Tyrosinkinase Src in der Sevofluran-induzierten Präkonditionierung bei Patienten während aorto-koronarer Bypassoperationen

**J. Fräßdorf**[1], **N.C. Weber**[1], **P. Feindt**[2], **A. Borowski**[2], **B. Preckel**[1], **J. Müllenheim**[3] und **W. Schlack**[1]

[1] Klinik für Anästhesiologie,
[2] Klinik für Thorax- und Kardiovaskuläre Chirurgie, Universitätsklinikum Düsseldorf, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf;
[3] Anaesthetic Department, South Tyneside District Hospital, South Shields, Großbritannien

### Fragestellung

Im Gegensatz zu tierexperimentellen Untersuchungen konnte die Anästhetika-induzierte-Präkonditionierung [APC] in klinischen Studien bisher nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden [1]. Eine zweimalige, nicht jedoch eine einzelne Applikation von 1 MAC Sevofluran für 5 min vor Aortenausklemmung (AOX), reduzierte die Troponin I Plasmaspiegel von Patienten während aorto-koronaren Bypassoperationen (ACB-OP) [2]. Über die Signaltransduktion der APC in humanem Myokard unter klinischen Bedingungen ist bisher wenig bekannt. Im Rattenmyokard spielt die Proteinkinase C Isoform ε (PKCε) eine zentrale Rolle und die Tyrosinkinase Src [Src] scheint ebenfalls involviert zu sein. Wir haben daher in rechts atrialen Gewebeproben von Patienten Phosphorylierung bzw. Translokation dieser Mediatoren während APC bei ACB-OP untersucht.

### Material und Methoden

Nach Genehmigung der Ethikkommission und schriftlicher Einwilligung wurden 30 Patienten in die Studie eingeschlossen. Einschlusskriterien waren: Bypass-OP bei 3–Gefäß-KHK und eine Ejektionsfraktion des linken Ventrikels > 40%. Auschlusskriterien waren: ASA-Status 4 oder 5, Angina pectoris in den letzten 72 h vor der OP oder instabile Angina pectoris, akuter Myokardinfarkt, Notfalleingriffe, zusätzlicher Eingriff an einer Herzklappe, vorhergehende Herzoperationen, Diabetes mellitus und Therapie mit Theophyllinen. Die Patienten wurden in eine der drei Studiengruppen randomisiert (n=10 pro Gruppe). Alle Patienten erhielten eine totale intravenöse Anästhesie (Propofol und Sufentanil, target controlled infusion, Plasmazielspiegel für Propofol 2.5 µg/ml, für Sufentanil 0,2 µg/kg/h). Die Patienten der SEVO-I Gruppe erhielten 1 MAC Sevofluran für 5 min, 10 min vor AOX (=Beginn Ischämie des Herzens). Die Patienten der SEVO-II Gruppe erhielten 2 x 1 MAC Sevofluran für 5 min, unterbrochen durch eine 5-min. Auswaschphase, 10 min vor AOX. Vor der Sevoflurangabe und 10 min nach der letzten Sevoflurangabe beziehungsweise den korrespondierenden Zeitpunkten in der Kontrollgruppe wurde Gewebe des rechten Vorhofes entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das Gewebe wurde einer Fraktionierung in drei Kompartimente unterzogen: P1: Cytosol, P2: Membran und P3: partikuläre Fraktion. In den einzelnen Fraktionen wurden mittels Immunoblotting unter Verwendung geeigneter Antikörper die Zielproteine PKCε und Src analysiert. Die Aktivierung der PKCε erfolgt durch intrazelluläre Translokation oder Phosphorylierung. Die Tyrosinkinase Src wird durch Phosphorylierung an der Position Tyr 416 aktiviert. Wir untersuchten daher die Translokation und Phosphorylierung der PKCε und die Phosphorylierung der Src an der Position Tyr 416.

### Ergebnisse

Alle Daten sind Mittelwerte±Standardabweichung. Statistik: ANOVA und Bonferroni Korrektur für Mehrfachvergleiche.
Die zweimalige Gabe von Sevofluran führt im Gegensatz zur einmaligen Applikation zu einer deutlichen Translokation der PKCε vom Cytosol in die partikuläre Fraktion (Abb. 1). Es zeigt sich weder eine Phosphorylierung der PKCε, (Abb. 2) noch der Src (Abb. 3).

### Interpretation

Die zweimalige Gabe von Sevofluran, die auch einen klinisch kardioprotektiven Effekt hat (Reduktion der Troponinfreisetzung) [2], führt zu einer Translokation der PKCε aus dem Cytosol in die partikuläre Fraktion. Der andere Aktivierungsweg, die Phosphorylierung, der bei der Ratte ebenfalls eine Rolle spielt, ist im humanen Vorhofmyokard unter diesem APC Protokoll nicht nachweisbar.

* Rechte vorbehalten

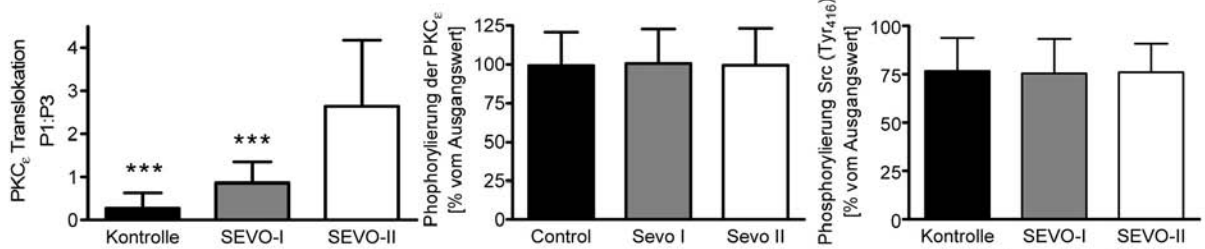


Abbildung 1: Translokation der PKCε von P1 nach P3; *** P<0.001 vs. SEVO-II

Abbildung 2: Phophorylierung der PKCε in P1

Abbildung 3: Phophorylierung der Src in P1

Die Src wird nicht aktiviert. Diese Aktivierung der PKCε beim APC von Patienten während ACB-OP weist darauf hin, dass die PKCε auch im humanen Myokard eine Rolle bei der klinischen Kardioprotektion spielen könnte.

Literatur
1. **De Hert SG, Van Der Linden PJ, Cromheecke S, Meeus R, Nelis A, Van R, V, ten Broecke PW, De B, I, Stockman BA, Rodrigus IE.** Cardioprotective properties of sevoflurane in patients undergoing coronary surgery with cardiopulmonary bypass are related to the modalities of its administration. Anesthesiology 2004;101:299-310
2. **Frassdorf, J., Weber, N. C., Feindt, P., Borowski, A., and Schlack, W.** Sevoflurane-Induced Preconditioning: Evaluation of Two Different Protocols in Humans Undergoing Coronary Artery Bypass Grafting (CABG). Anesthesiology 2005;103:A338.

## Desfluran präkonditioniert im In-vivo-Herzinfarktmodell der Maus stärker gegen Myokardinfarkt als eine ischämische Präkonditionierung

**A. Redel, T. Smul, M. Lange, N. Roewer** und **F. Kehl**
Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie, Universitätsklinikum Würzburg, Julius-Maximilians-Universität Würzburg

### Fragestellung

Die Anästhetika-induzierte Präkonditionierung (APC) ist in den vergangen Jahren an verschiedenen Tiermodellen nachgewiesen worden, und zahlreiche Mediator- und Zielproteine der APC konnten identifiziert werden [1]. Die Untersuchung transgener oder gendeletierter Tiere könnte die bisherigen Erkenntnisse zum Verständnis der APC erweitern, jedoch ist die APC – im Gegensatz zur ischämischen Präkonditionierung (IPC) – an der Maus bisher nicht gezeigt worden. Wir prüften daher im In-vivo-Herzinfarktmodell der Maus die Hypothese, dass die APC an der Maus nachweisbar ist und eine der IPC vergleichbare Wirkung aufweist.

### Methodik

Die Tierversuchsgenehmigung der zuständigen Landesbehörde lag vor. Männliche C57BL/6-Mäuse (n=22, 8-12 Wochen, 20-25g) wurden randomisiert drei Gruppen zugeteilt. Alle Tiere erhielten Pentobarbital zur Narkoseeinleitung (70 mg/kgKG i.p.), wurden endotracheal intubiert, mit einem Luft-Sauerstoff-Gemisch ($F_IO_2$=0,5) mechanisch ventiliert und zur Messung hämodynamischer Parameter (HF und MAP) mit einem in die rechte A. carotis communis eingebrachten flüssigkeitsgefüllten PE-10 Katheter instrumentiert. Nach linksseitiger Thorakotomie im 4. ICR und Perikardiotomie wurde eine proximale Ligatur des LAD vorgelegt. Nach einer 15-minütigen Equilibrierungsphase wurden Baseline-Werte erfasst. Alle Tiere wurden einer 45-minütigen Koronararterienokklusion (CAO) und einer 3-stündigen Reperfusion unterzogen. Vor CAO erhielt die Kontrollgruppe keine weitere Behandlung, die IPC-Gruppe erhielt 3mal eine 5-minütige Koronarligatur, getrennt von jeweils 5 min Reperfusion, 15 min vor CAO. Die APC-Gruppe erhielt für 15 min 1 MAC Desfluran (7,5 Vol% [2]), das 15 min vor CAO abgeflutet wurde. Zur Bestimmung des Risikoareals (AAR) wurde nach Religatur des LAD Evans Blue injiziert. Das Infarktareal (IA) wurde mit Triphenyltetrazoliumchlorid gefärbt. Die Infarktgröße (IS=IA/AAR) wurde gravito-planimetrisch bestimmt. Die Körpertemperatur der Tiere lag während des gesamten Versuchsablaufes konstant bei 37,0 ± 0,2 °C. Die statistische Analyse erfolgte mittels ANOVA und posthoc Duncan-Test. Angegeben sind Mittelwert ± SEM, *P<0,05.

### Ergebnisse

Die hämodynamischen Parameter während Baseline unterschieden sich nicht. Unter Desfluran-Applikation sanken MAP und Rate-Pressure-Produkt signifikant ab, erreichten aber vor CAO wieder Ausgangswerte (Tab. 1). Die AAR war in allen Gruppen gleich groß. Die Infarktgröße betrug in der Kontrollgruppe 49 ± 6% (n=8) und wurde durch die IPC signifikant verkleinert (26 ± 4%, n=7). Die Applikation von 1,0 MAC Desfluran führte zu einer weiteren signifikanten Verkleinerung der Infarktgröße auf 9 ± 2% (n=7) (Abb. 1).

### Interpretation

In der vorliegenden Untersuchung konnte erstmals die Anästhetika-induzierte Präkonditionierung im In-vivo-Herzinfarkt-

Tab. 1: Systemische hämodynamische Parameter.

| | | | | | Reperfusion (min) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Hf (min$^{-1}$)** | **BL** | **PC** | **MEMO** | **CAO** | **60** | **120** | **180** |
| CON | 453 ± 19 | 459 ± 13 | 499 ± 35 | 417 ± 19 | 429 ± 23 | 405 ± 16 | 432 ± 12 |
| IPC | 453 ± 11 | 454 ± 19 | 449 ± 17 | 420 ± 13 | 416 ± 23 | 422 ± 24 | 416 ± 13 |
| APC | 447 ± 21 | 402 ± 24 | 417 ± 44 | 433 ± 20 | 420 ± 18 | 443 ± 19 | 433 ± 16 |
| **MAP (mmHg)** | | | | | | | |
| CON | 65 ± 5 | 62 ± 5 | 64 ± 7 | 53 ± 3 | 52 ± 4 | 46 ± 2* | 47 ± 4* |
| IPC | 65 ± 5 | 67 ± 5 | 67 ± 3 | 56 ± 7 | 54 ± 3 | 57 ± 6 | 56 ± 6 |
| APC | 64 ± 3 | 51 ± 4*# | 77 ± 7 | 48 ± 3* | 58 ± 2 | 52 ± 3 | 46 ± 5* |
| **RPP** | | | | | | | |
| CON | 29 ± 3 | 28 ± 2 | 30 ± 9 | 22 ± 1 | 22 ± 2 | 18 ± 1* | 21 ± 2* |
| IPC | 29 ± 2 | 31 ± 2 | 30 ± 3 | 24 ± 3* | 22 ± 1* | 25 ± 4 | 23 ± 3* |
| APC | 29 ± 3 | 21 ± 2*# | 32 ± 5 | 21 ± 1* | 24 ± 1 | 23 ± 1 | 20 ± 2* |

Daten sind angegeben als MW ± SEM.
* p<0,05 vs. BL; # p<0,05 vs. IPC
BL=Baseline; PC=Präkonditionierung; MEMO=Memoryperiode; CAO=Koronararterienokklusion; Hf=Herzfrequenz; MAP=mittlerer arterieller Blutdruck; RPP=rate-pressure-product (HfxMAP/1000).

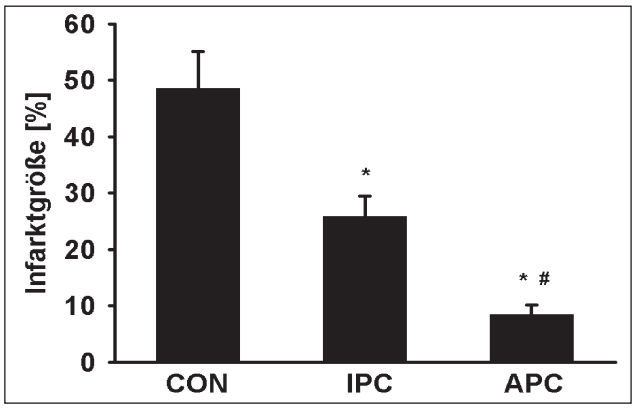


Abb. 1: Infarktgröße (IS=IA/AAR) in Prozent. Angegeben sind Mittelwert ± SEM; P < 0,05;* signifikant verschieden von CON, # signifikant verschieden von IPC.

modell der Maus nachgewiesen werden. Das Ausmaß der Reduktion der Infarktgröße durch die ischämische Präkonditionierung ist in Übereinstimmung mit publizierten Daten [3]. Die APC ist darüber hinaus stärker wirksam als die IPC. Mit dem Nachweis der APC an der Maus steht nunmehr ein In-vivo-Tiermodell mit der Möglichkeit genetischer Ansätze zur Untersuchung der für die APC verantwortlichen zellulären Mechanismen zur Verfügung.

**Literatur**
1. **Bienengraeber MW et al.** Vascul Pharmacol 2005;42:243-52
2. **Sonner JM et al.** Anesth Analg 2000;91:720-6
3. **Miller DL, Van Winkle DM.** Cardiovasc Res 1999;42:680-4.

## Defizienz für den Toll-like Rezeptor 2 verbessert das Überleben nach myokardialer Ischämie und Reperfusion bei der Maus

**J. Mersmann, M. Arafkas, Y. Maschhadi, P.A. Zacharowski** und **K. Zacharowski**
Molecular Cardioprotection and Inflammation Group, Klinik für Anästhesiologie, Universitätsklinikum Düsseldorf, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

### Fragestellung

Der Reperfusionsschaden nach myokardialer Ischämie ist unter anderem ein inflammatorischer Prozess. Die Toll-like Rezeptoren (TLR) erkennen als Rezeptoren der angeborenen Immunabwehr sowohl Wandbestandteile von Mikroorganismen als auch – unter sterilen inflammatorischen Konditionen – endogene Liganden. So geht eine Defizienz für TLR-4 mit einer Reduktion der Infarktgröße nach myokardialer Ischämie und Reperfusion (I/R) einher [1]. TLR-2-defiziente Mäuse sind nach renaler I/R besser vor einem Nierenversagen geschützt als der Wildtyp [2], sie zeigen jedoch keine Infarktgrößenreduktion nach permanenter Koronarokklusion [3].
Ziel dieser Arbeit ist es, den Einfluss von TLR-2 auf den Reperfusionsschaden nach transienter myokardialer Ischämie zu untersuchen und einen möglichen additiven Effekt auf die beschriebene Infarktgrößenreduktion durch TLR-4-Defizienz zu zeigen.

### Methodik

Die Expression von TLR-2 im Myokard der Maus wurde durch Western-Blot-Analyse verifiziert. Myokardiale I/R: Männliche Wildtyp- (WT; exprimieren TLR-2 und TLR-4), TLR-2-defiziente (TLR-$2^{-/-}$) und TLR-2+TLR-4-defiziente (TLR-$2^{-/-}$/$4^{-/-}$) Mäuse wurden mit Pentobarbital (60 mg/kg Körpergewicht) anästhesiert, intubiert und thorakotomiert. Der Ramus interventrikularis anterior (RIVA) der linken Koronararterie wurde für 20 Minuten ligiert. Nach einer anschließenden Reperfusionsphase von 2 bzw. 24 Stunden (postoperative Analgesie: Buprenorphin 0.05 mg/kg), wurde der RIVA erneut ligiert und das Risikogebiet (RG) durch intravenöse Infusion von Evans-Blau (1 %) demaskiert. Das Herz wurde exzidiert, in Scheiben geschnitten und mit p-Nitro-Blau-Tetrazolium (0.5%, 20 min, 37°C) zur Färbung vitaler Zellen inkubiert. Infarktgröße, RG und die Fläche des linken Ventrikels wurden planimetrisch erfasst. Die Genehmigung der Tierschutzkommission lag vor.

Die Daten werden gezeigt als Median [25%, 75% Perzentile]. Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit dem Mann-Whitney-Test auf Signifikanz geprüft. Ein $p<0.05$ wurde als signifikant betrachtet.

### Ergebnisse

Die Expression von TLR-2 konnte im Myokard der Maus nachgewiesen werden (Abb. 1). Die Überlebensrate nach 24-stündiger Reperfusion betrug 50% (18 von 36 Tieren) für die WT-, 100% (10/10) für die TLR-$2^{-/-}$- und 80% für die TLR-$2^{-/-}$/$4^{-/-}$-Tiere (8/10). Das RG war in allen Gruppen gleich groß (Daten nicht gezeigt). Der Infarkt/RG war nach zweistündiger Reperfusion in den WT-Mäusen gegenüber TLR-$2^{-/-}$ und TLR-$2^{-/-}$/$4^{-/-}$ signifikant größer (57.0 [45.8, 64.1] % vs. 43.9 [28.9, 53.5] % vs. 40.1 [31.1, 48.7] %, $p<0.05$, n=8/Gruppe). Auch nach 24-stündiger Reperfusion konnte dieser Unterschied detektiert werden (52.7 [45.6, 62.4] % vs. 39.2 [32.6, 43.5] % vs. 41.2 [31.1, 44.1] %, $p<0.05$, n=8/Gruppe). Die Infarktgrößen/RG der TLR-$2^{-/-}$- und TLR-$2^{-/-}$/$4^{-/-}$-Tiere unterschieden sich nicht.

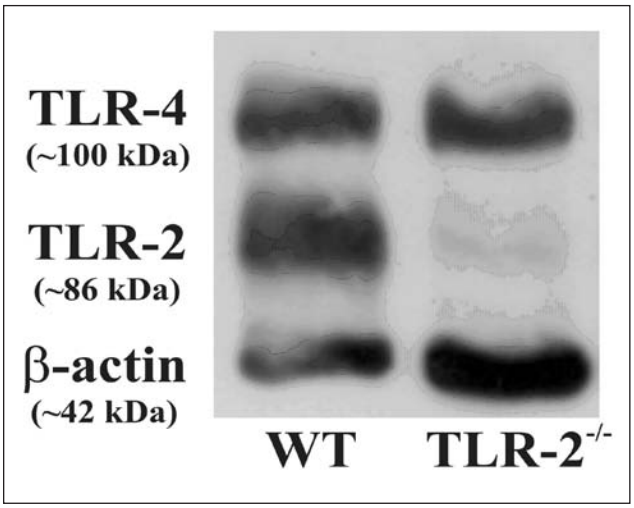


Abb. 1:

### Interpretation

Die Defizienz für den TLR-2 führt zu einer Verbesserung der Überlebensrate nach myokardialer I/R. Eine mögliche Erklärung ist die nach 2- und 24-stündiger Reperfusion beobachtete Reduktion der Infarktgröße in den TLR-2$^{-/-}$-Tieren. Eine zusätzliche Defizienz für TLR-4 hat keinen additiven Effekt auf die Infarktgrößenreduktion. Vor dem Hintergrund einer hohen Frequenz genetischer Polymorphismen der humanen TLR-2 und 4 (9% bzw. 16%, unveröffentlichte Daten unserer Arbeitsgruppe) muss geklärt werden, ob sich diese Daten von der Maus auf den Menschen übertragen lassen.

### Literatur


1. **Oyama J, Blais C Jr, Liu X, Pu M, Kobzik L, Kelly RA, et al.** Reduced myocardial ischemia-reperfusion injury in toll-like receptor 4-deficient mice. Circulation 2004;109[6]:784-789.
2. **Leemans JC, Stokman G, Claessen N, Rouschop KM, Teske GJ, Kirschning CJ, et al.** Renal-associated TLR2 mediates ischemia/reperfusion injury in the kidney. J Clin Invest 2005;115[10]:2894-2903.
3. **Shishido T, Nozaki N, Yamaguchi S, Shibata Y, Nitobe J, Miyamoto T, et al.** Toll-like receptor-2 modulates ventricular remodeling after myocardial infarction. Circulation 2003;108[23]:2905-2910.


## Einfluss eines mittels Streptozotozin induzierten Diabetes mellitus auf die Phosphorylierung mitogen-aktivierter Proteinkinasen und des Hitzeschockproteins 27 nach ischämischer Präkonditionierung im Rattenherz in vivo


**D. Ebel**[1], **N.C. Weber**[1], **O. Toma**[1], **B. Preckel**[1], **P. Rösen**[2] und **W. Schlack**[1]

[1] Klinik für Anästhesiologie,

[2] Deutsches Diabetes-Zentrum,

Universitätsklinikum Düsseldorf, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf


### Fragestellung

Die ischämische Präkonditionierung (IPC) ist der stärkste endogene Protektionsmechanismus gegen die Folgen einer Myokardischämie. Ein Diabetes mellitus blockiert diesen Schutz sowohl beim Versuchstier [1] als auch in menschlichem Myokard [2]. Der Blockademechanismus ist bislang ungeklärt. Die Aktivierung Mitogen-aktivierter Proteinkinasen (MAPK: p38, ERK-1, ERK-2) spielt in der Signaltransduktion der IPC eine wichtige Rolle [3]. Ebenso ist das über MAPK regulierte Hitzeschockprotein 27 (HSP27) involviert.

Wir untersuchten am Rattenherzen in vivo a) den Blockadeeffekt eines Diabetes mellitus auf die Protektion durch IPC (mittels Infarktgrößenmessung) und b) den Einfluss eines Diabetes mellitus auf die Aktivierung des HSP27 und der MAPK p38, ERK-1 und ERK-2 nach IPC (mittels Western Blot).

### Methodik

Nach Genehmigung der örtlichen Behörde wurde bei 36 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 die Tiere einer 25 min regionalen Myokardischämie gefolgt von 2 Stunden Reperfusion unterzogen. Am Ende der Reperfusion wurden die Herzen entnommen und die Infarktgröße bestimmt. Kontrolltiere (n = 10) erhielten keine

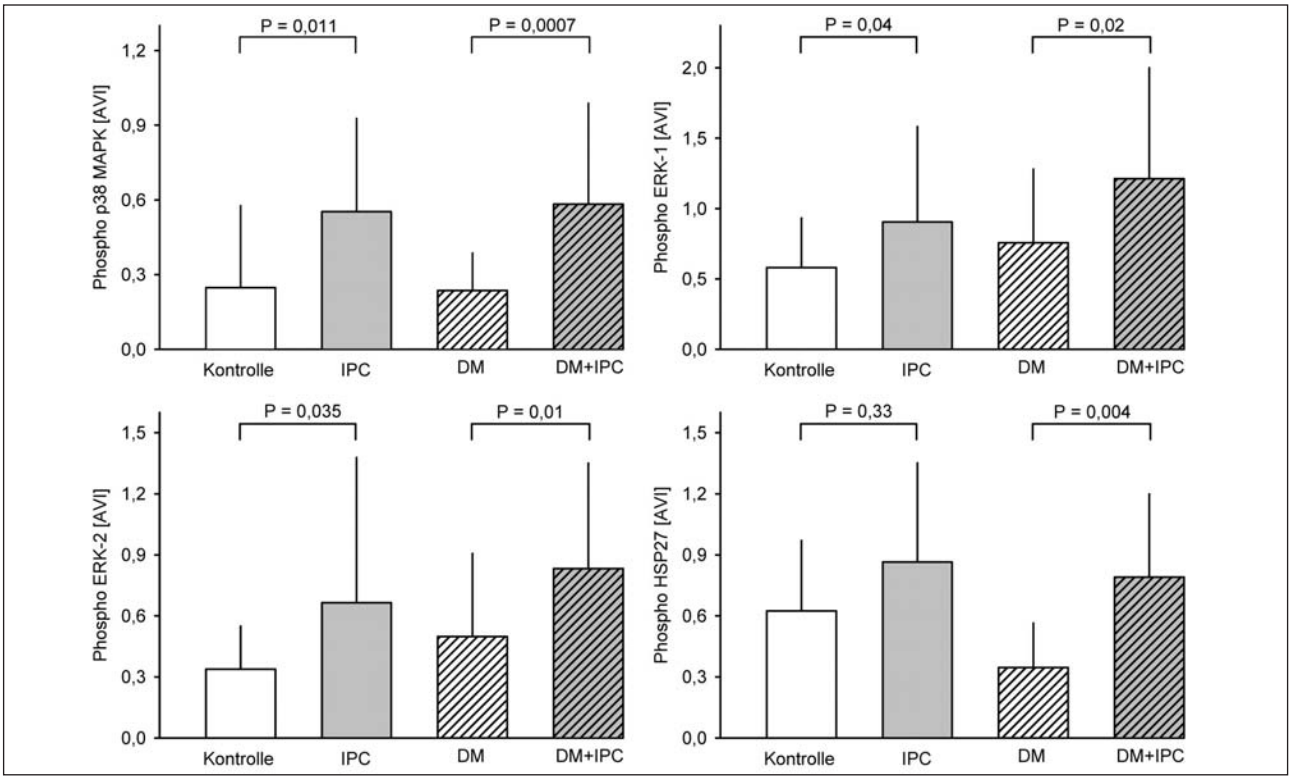


Abb. 1: Phosphorylierte (aktivierte) Form der p38 MAPK (links oben), der ERK-1 (rechts oben), der ERK-2 (links unten) und des HSP27 (rechts unten) bei nicht-diabetischen und diabetischen Tieren ohne und mit IPC.

weitere Intervention. IPC wurde durch 3x3minütige Koronarokklusion jeweils gefolgt von 5 min Reperfusion induziert (IPC, n = 12). In zwei weiteren Gruppen wurde acht Wochen vor den Versuchen durch intraperitoneale Streptozotozin-Injektion ein Insulinmangeldiabetes induziert. Acht Tiere dienten als diabetische Kontrolle (DM), weitere acht Tiere wurden zusätzlich präkonditioniert (DM+IPC). Zur Untersuchung der MAPK und des HSP27 wurden in vier weiteren Gruppen die Herzen direkt nach der Präkonditionierung entnommen und nach Gewebefraktionierung auf Phosphorylierung von p38, ERK-1, ERK-2 und HSP27 in der zytosolischen Fraktion mittels Western Blot untersucht. $\alpha$-Tubulin diente als interner Standard. Alle Daten sind Mittelwerte ± Standardfehler.

### Statistik

Student's t-Test mit Bonferroni-Korrektur für Mehrfachvergleiche.
Ergebnisse: IPC reduzierte die Infarktgröße bei den nicht-diabetischen Tieren von 55 ± 21 auf 31 ± 13 % des Risikogebietes (P = 0,01). Der Diabetes mellitus hatte keinen Einfluss auf die Infarktgröße (DM: 52 ± 12 %, P = 1,0 vs. Kontrolle), blockierte aber die Protektion durch IPC (DM+IPC: 55 ± 9, P = 1,0 vs. DM, P = 0,0004 vs. IPC). Die IPC führte bei den diabetischen Tieren zu einer Phosphorylierung der untersuchten Proteine p38, ERK-1 und ERK-2 sowie des HSP27. Bei den nicht-diabetischen Tieren erreichte nur die Phosphorylierung der p38 MAPK, der ERK-1 und ERK-2 statistische Signifikanz.

### Interpretation

Ein Insulinmangeldiabetes hebt im Rattenherzen in vivo die Kardioprotektion durch IPC auf. Dennoch sind bei den diabetischen Herzen die MAPK p38, ERK-1 und ERK-2 sowie das HSP27 phosphoryliert. Die Blockade der IPC ist daher distal dieser genannten Proteine zu vermuten.

### Literatur

**1. Kersten JR, Toller WG, Gross ER, et al.** Diabetes abolishes ischemic preconditioning: role of glucose, insulin, and osmolality. Am J Physiol 2000; 278:H1218-H1224
**2. Ghosh S, Standen NB, Galinanes M.** Failure to precondition pathological human myocardium. J Am Coll Cardiol 2001;37:711-718
**3. Yellon DM, Downey JM.** Preconditioning myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. Physiological Reviews 2003;83:1113-1151.

## Bedeutung der Ekto-5'-Nukleotidase (CD73) für die ischämische Präkonditionierung am Herzen

**T. Eckle**[1], **A. Grenz**[2], **M. Faigle**[1], **Th. Weissmüller**[1], **H. Oßwald**[2], **L. Thompson**[3], **S.P. Colgan**[4] und **H.K. Eltzschig**[1,4]
[1] Klinik für Anaesthesiologie und Intensivmedizin,
[2] Institut für Pharmakologie und Toxikologie,
Universitätsklinikum Tübingen, Eberhard-Karls-Universität Tübingen
[3] Oklahoma Medical Research Foundation, Oklahoma City, OK
[4] Center for Experimental Therapeutics and Reperfusion Injury, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA, USA

### Fragestellung

Die ischämische Präkonditionierung (IP) gilt als stärkste Form der In-vivo-Protektion vor einer akuten Myokardischämie [1]. Der Mechanismus dieses protektiven Effektes ist bislang nur unvollständig aufgeklärt. Pharmakologische Studien weisen darauf hin, dass Adenosin, welches extrazellulär durch die Ekto-5'-Nukleotidase (CD73) aus Adenosinmonophosphat gebildet wird, ein wichtiger Mediator der beobachteten Kardioprotektion sein könnte. Wie wir kürzlich zeigen konnten, wird CD73 durch Hypoxie induziert [2], und cd73-Knockout-Mäuse weisen eine verstärkte Entzündungsreaktion bei Hypoxieexposition auf [3, 4]. Auf der Basis dieser Beobachtungen untersuchten wir in der vorliegenden Studie, ob eine ischämische Präkonditionierung in cd73-Knockout-Mäusen möglich ist.

### Methodik

Die Tierversuchsgenehmigung der zuständigen Landesbehörde lag vor. Als ersten Schritt entwickelten wir eine neuartige Technik zur Durchführung von IP an intakten Mäusen. Anhand von mRNA Analysen von präkonditionierten Herzarealen untersuchten wir anschließend, ob CD73 auf transkriptioneller Ebene induziert ist. Zusätzlich wurden diese Befunde auf Proteinebene (Immunhistochemie) und in funktionellen Ansätzen (Enzymaktivität) weiter verfolgt. Als nächsten Schritt untersuchten wir den Effekt eines hochspezifischen CD73-Inhibitors (APCP) auf die IP in unserem murinen Modell. Für eine genetische Beweisführung wurden anschließend IP Versuche in cd73-Knockout-Mäusen durchgeführt. Um zu zeigen, dass ein unterschiedliches Verhalten von cd73-Knockout-Mäusen tatsächlich auf einen extrazellulären Adenosin-Mangel dieser Mäuse zurückzuführen ist, rekonstituierten wir die Mäuse nach Anlage eines zentralen Katheters durch Adenosininfusion und führten erneut IP mit anschließender Infarktgrößenbestimmung durch.

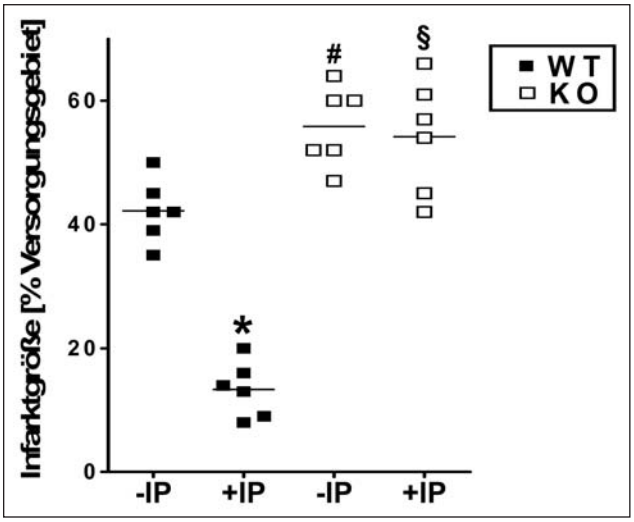


Abb. 1: Ischämische Präkonditionierung bewirkt keine Reduktion der Infarktgröße in cd73-Knockout-Mäusen. Zur Infarktgrößenbestimmung wurde mit oder ohne ischämische Präkonditionierung (± IP [4 x 5 min]) die linke Koronararterie für 60 Minuten verschlossen. Nach 2 Stunden Reperfusion wurde das Versorgungsgebiet der Koronararterie durch retrograde Färbung mit Evan's Blue bestimmt und durch eine spezifische Infarktfärbung die prozentuale Infarktgröße vermessen. Beachte: infarktgrößen-reduzierender Effekt von IP ist in cd73-Knockout-Mäusen nicht mehr nachweisbar. WT: Wildtype Mäuse, KO: cd73-Knockout- Mäuse (*p<0,001 gegenüber WT mit IP, #p<0,05 gegenüber WT ohne IP; §p<0,001 gegenüber WT mit IP).

### Ergebnisse

In präkonditioniertem Herzgewebe kommt es nach IP (4x5 min) zu einer Induktion von CD73-mRNA (18,4 ± 5,7- fach, n=6, p<0,05). Ebenso zeigten immunhistochemische Färbungen von CD73 in präkonditionierten Herzarealen eine deutliche Induktion durch IP. Messungen von CD73-Enzymaktivität an präkonditioniertem Myokard demonstrierten darüber hinaus auch eine funktionelle Induktion von CD73 durch IP. Während bei unbehandelten Mäusen die IP zu einer 3.2 ± 0.1-fachen Reduktion der Infarktgröße (n=6, p<0,05) führte, war ein infarktgrößenreduzierender Effekt durch IP nach Behandlung mit APCP nicht mehr nachweisbar. Untersuchungen an cd73-Knockout-Mäusen bestätigten die kritische Rolle von CD73 für IP (Abb. 1). So zeigten diese Mäuse bereits ohne IP größere Infarkte und IP führte zu keiner Reduktion der Infarktgröße. Behandlung von cd73-Knockout-Mäusen mit einer Adenosininfusion führte zu einer teilweisen Rekonstitution des präkonditionierenden Effektes von IP (präkonditionierte cd73-Knockout-Mäuse: 54% ± 3,0 Infarktgröße versus präkonditionierte cd73-Knockout-Mäuse mit Adenosininfusion 39,3% ± 3,3; p<0,05).

### Interpretation

Die durchgeführten Untersuchungen bestätigen eine zentrale Rolle der CD73-abhängigen Adenosinbildung für die IP am Herzen. Weitere Untersuchungen werden zeigen, durch welche Adenosinrezeptoren dieser Effekt vermittelt wird, um eine mögliche therapeutische Strategie in der Prävention und Therapie von Myokardischämien mit spezifischen Adenosinrezeptoragonisten zu entwickeln.


### Literatur

1. **Murry CE, RB Jennings, and KA Reimer.** Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. Circulation 1986;74:1124-1136
2. **Eltzschig HK, JC Ibla, GT Furuta, MO Leonard KA Jacobson, K Enjyoji, SC Robson, and SP Colgan.** Coordinated adenine nucleotide phosphohydrolysis and nucleoside signaling in posthypoxic endothelium: role of ectonucleotidases and adenosine A2B receptors. J Exp Med 2003; 198:783-796.
3. **Eltzschig HK, LF Thompson, J Karhausen, RJ Cotta, JC Ibla, SC Robson, and SP Colgan.** Endogenous adenosine produced during hypoxia attenuates neutrophil accumulation: coordination by extracellular nucleotide metabolism. Blood 2004;104:3986-3992.
4. **Colgan SP, HK Eltzschig, T Eckle, and LF Thompson.** Physiological Roles of 5'-Ectonucleotidase (CD73). Purinergic Signalling 2006 in press.


## Die Desfluran-induzierte Präkonditionierung wird über den β1-adrenergen Signaltransduktionsweg vermittelt


**M. Lange, T. Smul, C. Blomeyer, A. Redel, N. Roewer** und **F. Kehl**

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


### Fragestellung

Anästhetika-induzierte Präkonditionierung (APC) mit Desfluran wird durch den $\beta_1$-selektiven Blocker Metoprolol inhibiert [1]. Der $\beta_1$ adrenerge Signaltransduktionsweg schliesst unter anderem die spezifischen Rezeptoren, die Vermittlung über $G_s$ Proteine, cAMP und die Proteinkinase A (PKA) ein [2]. Wir testeten daher die Hypothese, dass die Blockade des $\beta_1$ adrenergen Rezeptors und der PKA die APC mit Desfluran im In-vivo-Herzinfarktmodell des Kaninchens blockiert.

### Methodik

Die Tierversuchsgenehmigung der zuständigen Landesbehörde lag vor. Pentobarbital anästhesierte weiße Neuseeland-Kaninchen (n = 41, 2,0 – 2,9 kg) wurden randomisiert in 6 Gruppen untersucht. Die Tiere wurden zur Messung folgender hämodynamischer Parameter instrumentiert: Herzfrequenz (HF), mittlerer Aortendruck (MAP) und Herzzeitvolumen (CO). Nach Thorakotomie im 4. ICR wurde ein prominenter Ast der linken Koronararterie (LAD) mit einer Ligatur umschlungen und eine Ischämie durch Okklusion des LAD (CAO) durchgeführt. Alle Tiere wurden einer CAO für 30 min mit anschliessender dreistündiger Reperfusion unterzogen. Die Untersuchungsgruppen erhielten: CON: keine Intervention, DES: 1.0 MAC Desfluran für 30 Minuten, ESMO: 30 mg/kg Esmolol (ultrakurzwirksamer β-Blocker) über 30 Minuten, H-89: 250 _g/kg H-89 (PKA-Inhibitor) als Bolus in das linke Atrium. In zwei weiteren Gruppe wurden Esmolol und Desfluran (ESMO/DES), bzw. H-89 und Desfluran (H-89/DES) kombiniert verabreicht. Die Gabe von Desfluran und Esmolol wurde 30 Minuten vor CAO beendet. Am Ende des Versuchsprotokolls wurden die Herzen entnommen, das Ischämieareal (AAR) mit Patentblau und das Infarktareal (IS) mit Triphenyl-Tetrazolium-Chlorid (TTC) angefärbt und die Infarktgröße (IS/AAR) gravimetrisch ermittelt. Statistik: ANOVA mit posthoc Duncan-Test, Mittelwert±SEM, *P<0.05.

### Ergebnisse

Während Baseline unterschieden sich die hämodynamischen Messparameter in den Untersuchungsgruppen nicht signifikant von den Kontrolltieren. Der MAP fiel unter der Gabe von Desfluran signifikant ab und die HF sank während der Applikation von Esmolol signifikant. Alle Parameter kehrten vor Beginn der CAO auf Ausgangsniveau zurück. Das CO blieb über den Verlauf der Untersuchung stabil. Die Gabe von H-89 hatte keinen Einfluss auf die hämodynamischen Parameter. Die AAR war in allen Gruppen gleich gross. Die Infarktgröße (IS/AAR) betrug in der Kontrollgruppe 61±4% (n=8). Die Gabe von Esmolol (65±5%, n=8) und H-89 (60±4%, n=4) hatte keinen Einfluß auf die Infarktgrösse. Desfluran reduzierte die Infarktgrösse signifikant auf 34±2%, (n=8). Esmolol (57±4%, n=8) und H-89 (57±5%, n=5) blockierten die Desfluran-induzierte APC. (Abb. 1).

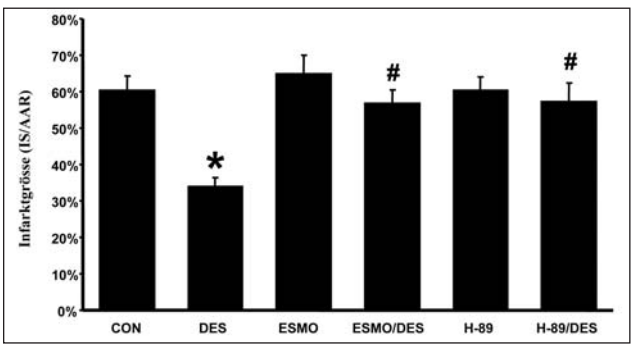


Abb. 1: Herzinfarktgröße (IS) im Verhältnis zur Größe des Ischämieareals (AAR) in Prozent. Mittelwert (IS/AAR) ± SEM, * P<0,05 zu CON, # P<0,05 zu DES.

### Interpretation

Der $\beta_1$-Signaltransduktionsweg spielt eine wichtige Rolle in der Vermittlung der Desfluran-induzierten Präkonditionierung, da diese sowohl durch die Blockade der $\beta_1$-Rezeptoren, als auch durch Inhibierung der PKA verhindert wird.


**Literatur**

1. **Lange M et al.,** Anästh Intensivmed 2005;46:546-7
2. **Bers DM,** Nature 2002;415:198-205.


## Einfluß von Noradrenalin auf die akute Anämietoleranz


**J. Meier, A. Pape, D. Loniewska, P. Lauscher, H. Kertscho, B. Zwißler** und **O. Habler**

Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie, Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main


### Fragestellung

Der intraoperative Ersatz von Blutverlusten mit kristalloiden oder kolloidalen Lösungen führt zu einer Verdünnung sämtlicher zirkulierender Blutbestandteile (sog. Hämodilution), und damit zu einem Abfall der Hämoglobinkonzentration ([Hb]). Bei Unterschreiten der „kritischen" $O_2$-Transportkapazität des Blutes (sog. „kritische Hämoglobinkonzentration" [Hbcrit]), bzw. bei Unterschreiten eines „kritischen" koronaren Perfusionsdruckes (CPP) drohen kardiozirkulatorisches Versagen und generalisierte Gewebehypoxie [1,2]. Üblicherweise wird in dieser Situation die Wiederherstellung einer adäquaten $O_2$-Transportkapazität des Blutes durch hyperoxische Beatmung und die Transfusion von Erythrozyten angestrebt [3]. Durch die passagere Steigerung der individuellen Anämietoleranz kann hierbei die Transfusion hinausgezögert, und der perioperative Fremdblutbedarf reduziert werden. Ob und inwieweit eine Steigerung der Anämietoleranz des Organismus durch die alleinige medikamentöse Stabilisierung des CPP mit Noradrenalin (NA) realisierbar ist, ist bis dato unbekannt.

### Methodik

Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurden nach behördlicher Genehmigung zwei tierexperimentelle Protokolle durchgeführt:

Protokoll 1: 14 narkotisierte, mit Raumluft beatmete Hausschweine wurden isovolämisch mit HAES 6% (MW 200 000/0.5) bis zu ihrer individuellen [$Hb_{crit}$] hämodiluiert [3] und anschließend randomisiert entweder 1) ohne jede weitere Intervention (Kontrollgruppe: KG), oder 2) nach Anhebung des koronaren Perfusionsdruckes (CPP) mit NA auf das jeweilige Ausgangsniveau vor Hämodilution (Verum-Gruppe: NA), für weitere 6 Stunden beobachtet. Hauptzielgröße war die 6h-Überlebensrate in beiden Gruppen.

Protokoll 2: 14 narkotisierte, mit Raumluft beatmete Hausschweine wurden isovolämisch mit HAES 6% (MW 200 000/0.5) bis zum Tod hämodiluiert. Hierbei wurde randomisiert entweder 1) keinerlei kreislaufunterstützende Therapie eingesetzt (Kontrollgruppe: KG), oder 2) der mittlere arterielle Blutdruck der Tiere durch adaptierte Infusion von NA zu jedem Zeitpunkt der Hämodilution über 60 mmHg gehalten (Verum-Gruppe: NA). Hauptzielgröße war dasjenige Blutvolumen, welches in den beiden Versuchsgruppen bis zum Tod der Tiere durch HAES 6% ausgetauscht werden konnte.

### Ergebnisse

Protokoll 1: Die beiden Gruppen waren identisch hinsichtlich ihrer [$Hb_{crit}$] (2.4±0.5 g/dl vs. 2.7±0.4 g/dl; ns.; ungepaarter t-Test). Während alle Tiere der KG nach Erreichen von [$Hb_{crit}$] innerhalb von 4.5 h verstarben (Überlebensrate 0%), sicherte die Erhöhung des CPP mit NA (Abb. 2; NA-dosierung bis max. 3.2±3.1 mg $kg^{-1}min^{-1}$) bei 6 von 7 Tieren das Überleben für 6h (Überlebensrate 86%; $p<0.05$; Fisher's exact test; Abb. 1). Nach Absetzen des NA verstarben 5 dieser 6 Tiere innerhalb von weniger als 3 Stunden.

Protokoll 2: Durch Stabilisierung des CPP mit NA (NA-dosierung bis max. 3.1±1.9 mg $kg^{-1}min^{-1}$) während des Hämodilutionsprozesses war es möglich, bis zum Tod der Tiere 118±13 ml/kg Blut gegen HAES auszutauschen, im Gegensatz zu lediglich 83±13 ml/kg ohne NA ($p<0.05$; ungepaarter t-Test; Abb. 3).

In beiden Protokollen führte die hochdosierte Applikation von NA im Verlauf zu einem Anstieg der Serum-Laktatkonzentration.

### Interpretation

Durch die Applikation von NA bei sich entwickelnder oder bereits manifester kritischer Anämie ist es möglich, kurzfristig die Anämietoleranz des Organismus zu steigern. Eine längerfristige, alleinige Anwendung sollte wegen der Gefahr einer peripheren Gewebehypoxie mit konsekutivem Anstieg der Serum-Laktatkonzentration vermieden werden.


**Literatur**

1. **van Woerkens E, Trouwborst A, van Lanschot J.** Profound hemodilution: what is the critical level of hemodilution at which oxygen delivery-dependent oxygen consumption starts in an anesthetized human? Anesth Analg 1992;75:818-821.
2. **Zollinger A, Hager P, Singer T, Friedl H, Pasch T, Spahn D.** Extreme hemodilution due to massive blood loss in tumor surgery. Anesthesiology 1997;87:985-987.
3. **Meier J, Kemming G, Kisch-Wedel H, Wölkhammer S, Habler O.** Hyperoxic ventilation reduces 6-hour mortality at the critical hemoglobin concentration. Anesthesiology 2004;100:70-76.


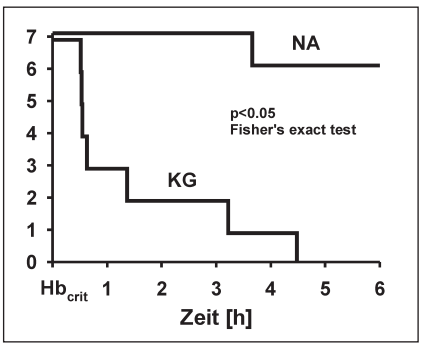


Abb. 1

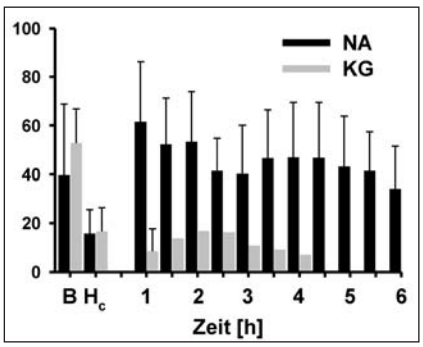


Abb. 2

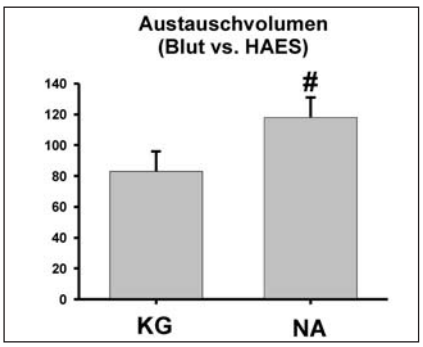


Abb. 3

© Anästh Intensivmed 2006;47:387-426 DIOmed Gesellschaft mit beschränkter Haftung

## Sevofluran führt nach intramuskulärer Injektion zu einer dosisabhängigen lokalen Stoffwechselsteigerung bei maligne-Hyperthermie-suszeptiblen Schweinen

**T. Metterlein, F. Schuster, M. Hager, A. Gardill, S. Negele, N. Roewer** und **M. Anetseder**
Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie, Universitätsklinikum Würzburg, Julius-Maximilians-Universität Würzburg

### Fragestellung

Im Rahmen der Entwicklung eines minimal-invasiven metabolischen Tests konnte eine gute Differenzierung zwischen MH-positiven (MHS) und MH-negativen (MHN) Individuen durch intramuskuläre Laktat- und Kohlendioxidpartialdruck-Messung ($pCO_2$) nach lokaler Applikation von Koffein und Halothan gezeigt werden [1]. Wir überprüften, ob das klinisch relevantere Sevofluran eine gute Differenzierung zwischen MH-suszeptiblen und gesunden MH-Schweinen erlaubt.

### Methodik

Mit Tierschutzgenehmigung wurden Pietrain-Schweine, homozygot für das „Porcine Stress Syndrome" (MHS) bzw. für den Wildtyp (MHN), mit Thiopental, Midazolam und Fentanyl anästhesiert, endotracheal intubiert und maschinell ventiliert. EKG, ABP, $SpO_2$, et-$CO_2$, BGA, Laktat i.S. und die Körpertemperatur wurden aufgezeichnet.
Bei je 9 MHS (27,8 [25,6 - 29,1] kg) und 6 MHN-Tieren (32,0 [30,7, 33,4] kg wurden Mikrodialysesonden mit je einem Zuspritzkatheter ultraschallgesteuert in der Adduktorengruppe platziert und mit Ringer-Lösung (1 µl $min^{-1}$) perfundiert. Nach 30 Minuten Äquilibrierungszeit wurde ein 100 µl Bolus Sevofluran mit 3; 7,5; 15 bzw. 28 Vol%, gelöst in Sojabohnenöl, an je eine Spitze einer Mikrodialysesonde appliziert. Im Dialysat wurde Laktat in 15-minütigen bzw. 7,5-minütigen Intervallen spektrometrisch bestimmt.
In weiteren Versuchsreihen wurde bei 9 MHS (30,3 [28,0 – 32,6] kg) und 6 MHN-Tieren (31,1 [29,2 – 31,6] kg) eine $pCO_2$-Sonde ultraschallgescheuert im M. triceps brachii platziert. Nach Äquilibrierung wurde ein Bolus von 100 µl Sevofluran mit 2,5; 5 und 7,5 Vol% in Sojabohnenöl sowie eine 100 µl Lösung mit Sevofluran 7,5 Vol% und Dantrolen 0,52 mmol $l^{-1}$ über einen Zuspritzkatheter an der Sondenspitze appliziert. Der $pCO_2$ wurde 1-minütlich gemessen und der maximale Anstieg pro Zeiteinheit berechnet. Mehrere Meßreihen wurden gleichzeitig durchgeführt, da gezeigt werden konnte, dass sich die Ergebnisse nicht gegenseitig beeinflussen. Die Daten sind als Median und Quartilen angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test mit $p < 0.05$ als signifikantem Unterschied.

### Ergebnisse

Intramuskulären Laktatwerte vor Triggerapplikation unterschieden sich nicht zwischen den Messreihen (MHS: 0,9 [0,7 – 1,1] mM; MHN: 0,8 [0,7 – 1,0] mM). Die Sevofluran-Injektion von 3; 7,5; 15 und 28 Vol% führte zu signifikant höheren Laktatwerten in der MHS-Gruppe mit 3,9; 7,7; 9,1 und 14,0 mM im Vergleich zur MHN-Gruppe mit 0,9; 0,9; 1,1 und 1,4 mM.
Die $pCO_2$-Werte vor Triggerapplikation unterschieden sich nicht zwischen den Messreihen (MHS: 51 [47 – 58] mmHg; MHN: 49 [41 – 56] mmHg). Die Sevofluran-Injektion von 2,5; 5 und 7,5 Vol% führte in der MHS-Gruppe im Vergleich zur MHN-Gruppe zu einem Anstieg des intramuskulären $pCO_2$ von maximal 100, 276 und 405 mmHg/h im Vergleich zur MHN-Gruppe mit 7, -7 und 43 mmHg/h. Die gemeinsame Injektion von Dantrolen und 7,5 Vol% Sevofluran hob den Unterschied des $pCO_2$-Anstiegs zwischen den Messgruppen auf (37 vs. -7 mmHg/h). Hämodynamische sowie metabolische Parameter unterschieden sich nicht zwischen den Gruppen.

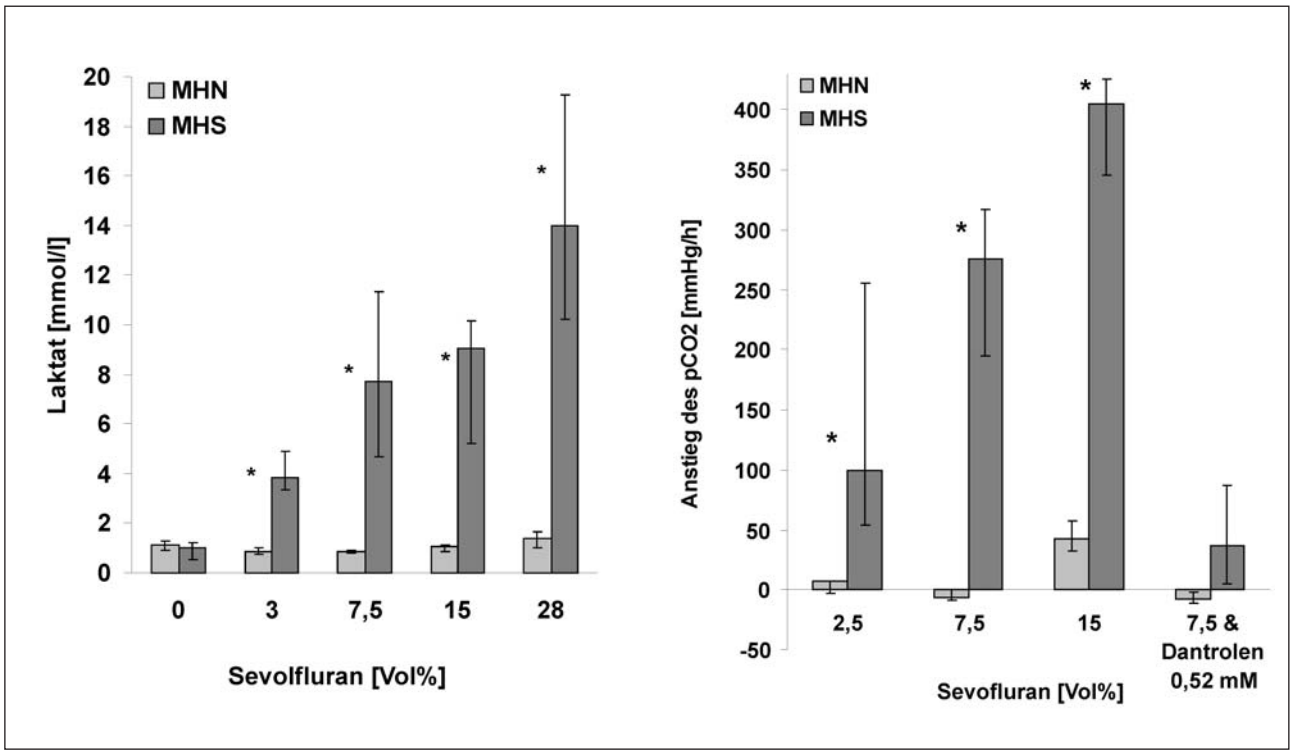


Abb. 1: Laktatkonzentration und Anstieg der $pCO_2$-Werte nach Sevofluran Injektion. *: $p < 0.05$ MHS vs. MHN.

### Interpretation

Intramuskulär injiziertes Sevofluran induziert bei MHS-Tieren eine stärkere lokale Stoffwechselsteigerung als bei MHN-Tieren. Die intramuskuläre Laktatkonzentration als auch der $pCO_2$-Anstieg nach Sevofluran-Injektion erlauben eine klare Unterscheidung der beiden Gruppen. Für die Weiterentwicklung eines minimal-invasiven Tests scheint somit Sevofluran gut geeignet zu sein. Ähnlich Halothan [2] , so besteht auch für Sevofluran eine Dosis-Wirkungs-Beziehung. Die Unterdrückung des $pCO_2$-Anstiegs durch Dantrolen spiegelt die pharmakologische Wirkung von Sevofluran am sarkoplasmatischen Retikulum und dessen Antagonismus durch Dantrolen wider.

### Literatur


1. **Anetseder M, Hager M, Müller CR, Roewer N.** Diagnosis of susceptibility to malignent hyperthermia by use of a metabolic test. Lancet 2002; 359:1579-1580.
2. **Schuster F, Schöll H, Hager M, Müller R, Roewer N, Anetseder M.** The Dose-Response Relationship and Regional Distribution of Lactate After Intramuscular Injection of Halothane and Caffeine in Malignant Hyperthermia-Susceptible Pigs. Anesth Analg 2006;102:468-72.


## In-vitro-Wirkung von Levosimendan auf die Ropivacain-induzierte myokardiale Depression an zwei isolierten Meerschweinchenpräparationen


**S.N. Stehr**[1], **T. Christ**[2], **B. Rasche**[1], **S. Rasche**[1], **E. Wettwer**[2], **A. Deussen**[3], **U. Ravens**[2], **T. Koch**[1] und **M. Hübler**[1]

[1] Klinik und Poliklinik für Anästhesie und Intensivtherapie, Universitätsklinikum Dresden

[2] Institut für Pharmakologie und Toxikologie,

[3] Institut für Physiologie,

Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus, Technische Universität Dresden


### Fragestellung

Die Blockade von $Ca^{2+}$-abhängigen Vorgängen im Myokard spielt im Rahmen der myokardialen Depression durch Lokalanästhetika eine wesentliche Rolle [1]. Levosimendan (Levo) wirkt als $Ca^{2+}$-Sensitizer positiv inotrop und vasodilatorisch [2]. Wir untersuchten die Wirkung von Levo auf die Ropivacain (Ropi)-induzierte myokardiale Depression an isolierten Meerschweinchenpapillarmuskeln und an isolierten Meerschweinchenherzen.

### Methodik

Die Versuche wurden nach Genehmigung durch die zuständige Tierschutzbehörde an weiblichen Dunkin-Hartley-Meerschweinchen durchgeführt. Zunächst wurde an isolierten Papillarmuskeln unter Stimulation mit 1 Hz und Erfassung von Ruhemembranpotential (RMP), Aufstrichgeschwindigkeit (dV/dt), Kontraktionskraft ($F_c$) und Aktionspotentialdauer bei 90 % der Repolarisation ($APD_{90}$) die Konzentrations-Wirkungsbeziehung von Ropi und Levo untersucht. In einem zweiten Schritt wurden die Effekte von Levo nach der Applikation von Ropi betrachtet. An druckkonstant-perfundierten, isolierten Herzen (nach Langendorff) wurden kontinuierlich Herzfrequenz (HR), linksventrikulärer Druck ($P_{sys}$), Druckanstiegsgeschwindigkeit (dP/dt), koronarer Fluss (flow), PR- und QRS-Zeit gemessen sowie intermittierend Per- und Effluatproben entnommen. Die isolierten Herzen wurden in vier Gruppen randomisiert: Kontrolle, Ropi, Kontrolle Levo, Ropi Levo. In den Ropi Gruppen wurde dem Perfusat nach 10 min 10 µM Ropi für 10 min zugefügt. Herzen der Gruppen Kontrolle Levo und Ropi Levo erhielten nach 15 min 10 µM Levo für 5 min. Gruppenvergleiche erfolgten mit ANOVA für Messwiederholungen und Bonferroni-Adjustierung.

### Ergebnisse

Isolierter Papillarmuskel: Levo erhöhte konzentrationsabhängig die $F_c$ ($-\log EC_{50}$ [M] = 6,85) von 80 ± 16 µN auf 120 ± 24 µN (MW ± SD, n = 6, $p < 0,05$). RMP (-87 ± 1 mV), dV/dt (221 ± 8 V/s) und $APD_{90}$ (172 ± 4 ms, n = 8) wurden nicht verändert. Unter Ropi

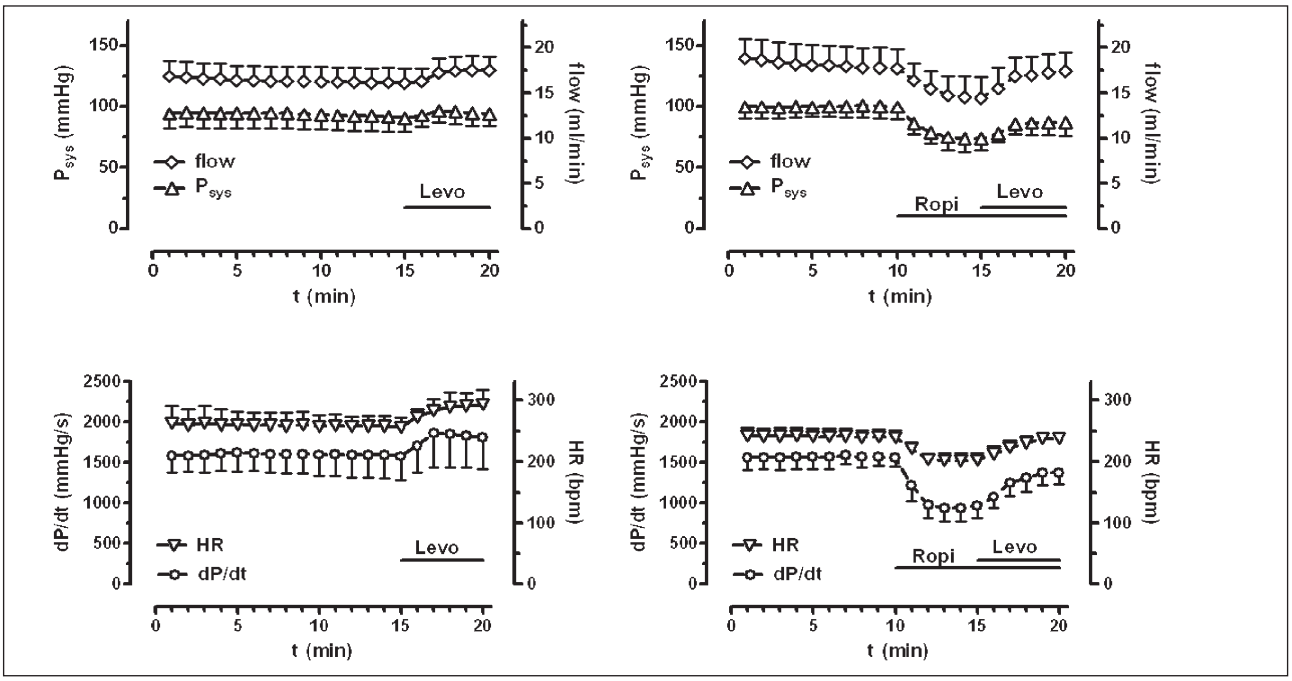


Abb. 1: Werte für Psys, flow, dP/dt und HR für die Gruppen Levo und Ropi Levo am isolierten Meerschweinchenherz.

nahm die $F_c$ von 92 ± 17 auf 62 ± 11 µN und die $APD_{20}$ von 93 ± 7 auf 66 ± 3 ms ab ($p < 0,05$, n = 7). Die Applikation von Levo nach Ropi normalisierte die $F_c$ (99 ± 28 mN). Die Sensitivität des Myokardiums auf Levo wurde durch Ropi nicht verändert (–$logEC_{50}$ [M] = 6,89).
Isoliertes Herz: Die Applikation von 10 µM Ropi führte zu einer signifikanten Abnahme von HR (von 248 ± 11 auf 207 ± 10 bpm, n = 6, MW ± SD, $p < 0,05$), $P_{sys}$ (90 ± 12 auf 76 ± 10 mmHg, $p < 0,05$), dP/dt (1450 ± 250 auf 980 ± 131 mmHg/s, $p < 0,05$) und koronarem Fluss (15,8 ± 2,6 auf 12,0 ± 1,3 ml/min, $p < 0,05$). Die Intervention mit Levo bei den mit Ropi behandelten Herzen führte nach 5 min zu einer signifikanten Zunahme von HR (202 ± 27 auf 238 ± 22 bpm, $p < 0,05$), $P_{sys}$ (73 ± 9 auf 87 ± 10 mmHg, $p < 0,05$) und dP/dt (983 ± 120 auf 1335 ± 155 mmHg/s, $p < 0,05$, siehe Abb. 1).

### Interpretation

Levo wirkt in der durch Ropi induzierten myokardialen Depression innerhalb kurzer Zeit positiv inotrop und positiv chronotrop.

### Literatur


1. **Komai H, Lokuta AJ.** Interaction of bupivacaine and tetracaine with the sarcoplasmic reticulum Ca2+ release channel of skeletal and cardiac muscles. Anesthesiology 1999;90:835-43.
2. **Haikala H, Levijoki J, Linden IB.** Troponin C-mediated calcium sensitization by levosimendan accelerates the proportional development of isometric tension. J Mol Cell Cardiol 1995;27:2155-65.


## Effekte von Drotrecogin alfa (aktiviert) auf die neurologische Leistungsfähigkeit und die inflammatorische Antwort nach experimentellem Herz-Kreislaufstillstand bei der Ratte


**P. Teschendorf, E. Popp, M. Albertsmeier, P. Vogel, R. Galmbacher** und **B.W. Böttiger**
Klinik für Anaesthesiologie, Universitätsklinikum Heidelberg, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg


### Fragestellung

Neuere Untersuchungen konnten zeigen, dass Patienten nach Herz-Kreislaufstillstand (HKS) ein sepsis-ähnliches Krankheitsbild zeigen [1]. Diese Patienten weisen zum einen eine Aktivierung der Gerinnungskaskade ohne adäquate kompensatorische fibrinolytische Aktivität und zum anderen einen signifikanten Anstieg proinflammatorischer Zytokine wie auch eine Komplementaktivierung auf. Drotrecogin alfa (aktiviert; rhAPC) ist die erste anerkannte adjuvante Therapie der schweren Sepsis. Die Wirkmechanismen liegen sowohl in den antiinflammatorischen, antikoagulatorischen, fibrinolytischen, wie auch antiapoptotischen Eigenschaften von Drotrecogin alfa (aktiviert). Auf dieser Basis sollten primär die Effekte von rhAPC auf die neurologische Leistungsfähigkeit und sekundär die Wirkung auf die Inflammation und Gerinnung nach HKS an der Ratte untersucht werden.

### Methodik

Nach Zustimmung der Tierschutzkommission wurden 108 männliche Wistar-Ratten (350 g) in einer geblindeten, randomisierten, plazebo-kontrollierten Studie untersucht. Zunächst wurden die Tiere in Narkose (Halothan/Lachgas) einem 6 min HKS mit konsekutiver kardiopulmonaler Reanimation (CPR) unterzogen [2]. Nach Wiederherstellung spontaner Kreislaufverhältnisse (ROSC) wurden die Tiere in die folgenden drei Gruppen (n=12) mit jeweils unterschiedlichen Reperfusionszeiträumen (6 h, 3 d, 7 d) randomisiert: A) Hochdosis (HD) rhAPC (2 mg/kg Bolus, 0,1 mg/kg/h für 6 h); B) Niedrigdosis (ND) rhAPC (0,5 mg/kg Bolus, 0,025 mg/kg/h für 6 h); C) Plazebo (volumenadaptiertes Rattenalbumin als Bolus und kontinuierliche Gabe). Die neurologische Leistungsfähigkeit wurde anhand zweier neurologischer Tests 1, 3 und 7 d nach ROSC bestimmt. Zum einen wurde der „Neurological Deficit Score“ (NDS) nach Katz angewandt, zum anderen ein modifizierter „Tape Removal Test“ nach Schallert [3]. Für den „Tape Removal Test“ wurde den Tieren ein Stück (10 x 12 mm) Kreppband auf beide Vorderläufe geklebt und die Zeit bis zum Abreißen des ersten Streifens gemessen (Abbruch nach 60 s). Der Test wurde bei allen Tieren an 3 Tagen (5x/d) vor der CPR, sowie 1, 3 und 7 d (3x/d) nach ROSC durchgeführt. Folgenden Variablen wurden jeweils vor dem HKS, 6 h und 3 d nach ROSC bestimmt: Interleukin-1b (IL), IL-6, IL-10, TNFa, sICAM-1, PMN – Elastase und Thrombin-Antithrombin (TAT)-Komplexe. Zum Vergleich der Gruppen wurde der Kruskal-Wallis-Test herangezogen. Ein $p<0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

### Ergebnisse

Der NDS zeigte am 1 d und 3 d nach ROSC in allen Gruppen ein klares neurologisches Defizit, welches sich bis zum 7 d nach

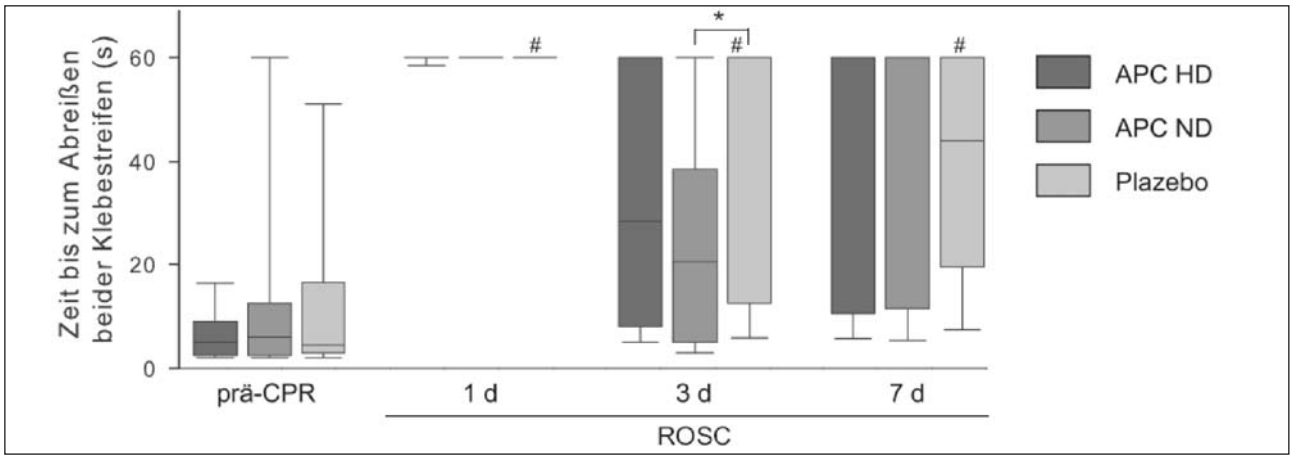


Abb. 1: Ergebnisse des Tape removal Tests. An allen Tagen nach ROSC lag ein neurologisches Defizit vor. Am 3d nach ROSC entfernten die Tiere der ND rhAPC Gruppe die Streifen signifikant schneller als die der Plazebogruppe. *p=0,013 ND rhAPC vs. Plazebo.

ROSC wieder normalisierte. In dem Tape-Removal-Test entfernten am 3 d nach ROSC die Tiere der ND rhAPC- Gruppe die Klebestreifen schneller als die Tiere der Plazebo-Gruppe. Dieser Effekt war nach 7 d ROSC nicht mehr zu sehen (Abb. 1). Alle Tiere, unabhängig von der Behandlungsgruppe, zeigten 6 h nach ROSC signifikant erhöhte proinflammatorische Zytokine (IL-1b, IL-6), Adhäsionsmoleküle (sICAM-1) sowie eine Aktivierung des Komplementsystems (PMN-Elastase). Abgesehen von der PMN-Elastase in der HD rhAPC-Gruppe wurden in allen Gruppen 3 d nach ROSC wieder die Ausgangswerte erreicht. Ca. 40% aller Tiere zeigten erhöhte TNF$\alpha$-Werte. Die TAT-Komplexe waren in allen Gruppen noch 3 d nach ROSC um den Faktor 300 - 400 signifikant erhöht. Das antiinflammatorische IL-10 war 3 d nach ROSC in den rhAPC Gruppen erhöht. Der Unterschied zwischen der ND rhAPC Gruppe und der Plazebo-Gruppe war nach 3 d ROSC signifikant.

### Interpretation

Diese Daten bestätigen damit das in der Klinik beobachtete Phänomen, dass es nach erfolgreicher CPR nach HKS zu einem Postreanimations-SIRS kommt. Weiterhin zeigt diese Studie zum ersten Mal die Effekte der Applikation von Drotrecogin alfa (aktiviert) auf die systemische inflammatorische Antwort und die neurologische Leistungsfähigkeit 3 d nach 6 min HKS. Dass diese Effekte nach 7 d nicht mehr nachweisbar sind, kann durch die Dauer und Dosierung der rhAPC Gabe zu erklären sein.

### Literatur


1. **Adrie Ch et al.** Circulation 2002;106:562-568.
2. **Böttiger BW et al.** J Cereb Blood Flow Metab 1998;18:1077-1087.
3. **Alberstmeier M et al.** J Neurosurg Anesthesiol 2005;17:226.


## Erhöhung der Clotfestigkeit durch Fibrinogen bei Thrombozytopenie


**T. Lang[1,2], D. Scheinichen[2], H. Metzler[3], S. Piepenbrock[2], E. Mahla[2], C. Solomon[2], K. Johanning[2], M. v. Depka[1] und A. Bornscheuer[2]**

[1] Werlhof-Institut für Hämostaseologie, Hannover
[2] Zentrum Anästhesiologie, Medizinische Hochschule Hannover
[3] Universitätsklinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin, Medizinische Universität Graz


### Fragestellung

Im Rahmen von traumatischen oder perioperativen Blutungen ist neben dem Verlust und dem Verbrauch von Gerinnungsfaktoren auch mit einer Thrombozytopenie zu rechnen. Diese führt unter anderem zu einer verminderten Festigkeit des Gerinnsels, welche mittels Thrombelastographie bzw. -metrie gut erfasst werden kann [1]. Neben einem thrombozytären Anteil wird die Gerinnselfestigkeit auch durch einen plasmatischen Anteil vornehmlich durch das Fibrinogen (Fgn) beeinflusst [2]. Ziel der Untersuchung war es zu überprüfen, ob eine hohe Konzentration von Fibrinogen eine thrombozytär bedingte verminderte Gerinnselfestigkeit kompensieren kann.

### Methodik

Aus Citratblut von jeweils 8 gesunden Blutspendern wurde Platelet Rich Plasma (PRP) hergestellt. Jedes PRP wurde aliquotiert und durch Zugabe von homologen Platelet Poor Plasma (PPP) auf eine Thrombozytenzahl (Tz) von 10.000, 50.000 und 100.000 /µl eingestellt. Anschließend wurden die Proben erneut aliquotiert und mit Fgn (Haemocomplettan®, ZLB Behring) um 550 mg/dl bzw. um 780 mg/dl aufgestockt. Als Kontrolle wurde physiologische Kochsalzlösung verwendet. Jedes Aliquot wurde anschließend auf dem Rotationsthrombelastometer (ROTEM) vermessen und die Gerinnselfestigkeit als Maximum Clot Firmness (MCF) angegeben. Um die praktische Relevanz der in vitro gewonnenen Ergebnisse zu überprüfen, führten wir eine retrospektive Analyse in einem unselektierten chirurgischen Patientenkollektiv durch. Hierbei wurden 904 Proben in einem Zeitraum von 1999 bis 2005 eingeschlossen, bei welchen unter Routinebedingungen ROTEM-Messungen durchgeführt wurden. Die Proben wurden entsprechend der Tz in zwei Gruppen unterteilt: Gruppe A (n = 107): Tz < 20.000/µl, Gruppe B (n = 797): Tz 20.000/µl bis 50.000/µl. Abhängig von dem Fgn-Wert erfolgte eine weitere Unterteilung in Subgruppen: 1) Fgn < 100 mg/dl, 2) Fgn 100 bis 200 mg/dl, 3) Fgn 200 bis 400 mg/dl, 4) Fgn 400 bis 600 mg/dl, 5) Fgn > 600 mg/dl. Durch die Verwendung eines extrinsischen Aktivators in der Thrombelastometrie kann der Einfluss von Heparin auf die Gerinnselfestigkeit vermieden werden.

### Ergebnisse

Die mittlere Fibrinogenkonzentration der gesunden Blutspender betrug 268±42 mg/dl. Die ermittelten Gerinnselfestigkeiten des In-vitro-Versuches sind in Tabelle 1 wiedergegeben.
Die Aufstockung mit Fgn führte in allen Proben zu einer signifikanten Erhöhung der Gerinnselfestigkeit. Die Ergebnisse der retrospektiven Analyse sind in Tabelle 2 wiedergegeben.

### Interpretation

Bei niedrigen Thrombozytenzahlen führt eine hohe Fibrinogen-

Tab. 1: n = 8, Klammer = Standardabweichung; * p < 0,001 vs. MCFKontrolle, #p < 0,001.

| Tz x $10^3$/µl | $MCF_{Kontrolle}$ (mm) | $MCF_{+550mg/dl\ Fgn}$ (mm) | $MCF_{+780mg/dl\ Fgn}$ (mm) |
|---|---|---|---|
| 10 | 40 (±3) | 66 (±2)* | 76 (±4)# |
| 50 | 53 (±4) | 73 (±3)* | 78 (±4)# |
| 100 | 62 (±4) | 77 (±3)* | 83 (±3)# |

Tab. 2: A = Gruppe A (Tz < 20 x 103/_l), B = Gruppe B (Tz 20 x 103/_l bis 50 x 103/_l) Klammer = Standardabweichung, *p < 0,001 vs. Fgn < 100mg/dl.

| | Fgn (mg/dl) | < 100 | 100-200 | 200-400 | 400-600 | >600 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| A | MCF (mm) | 19,6 (±4,5) | 27,7 (±9,6)* | 39,6 (±6,7)* | 42,7 (±5,8)* | 52,7 (±10)* |
| | N | 8 | 20 | 52 | 15 | 12 |
| B | MCF (mm) | 28,3 (±11) | 37,8 (±7,6)* | 46,5 (±6,5)* | 54,9 (±6,4)* | 58,9 (±7,0)* |
| | N | 52 | 234 | 358 | 91 | 62 |

konzentration zu einer Erhöhung der Gerinnselfestigkeit in vitro als auch in vivo. Entsprechend dem Postulat von Kettner et al. [3] können hohe Konzentrationen von Fibrinogen tatsächlich eine verminderte Gerinnselfestigkeit bedingt durch eine Thrombozytopenie kompensieren. Dies führt zu einer neuen therapeutischen Option im Rahmen einer perioperativen Thrombozytopenie auftretenden Blutung.

**Literatur**

1. **Luddington RJ.** Thrombelastography/thromboelastometry. Clin Lab Haematol 2005;27:81-90.
2. **Lang T, Toller W, Gutl M, Mahla E, Metzler H, Rehak P et al.** Different effects of abciximab and cytochalasin D on clot strength in thrombelastography. J Thromb Haemost 2004;2:147-53.
3. **Kettner SC, Panzer OP, Kozek SA, Seibt FA, Stoiser B, Kofler J et al.** Use of abciximab-modified thrombelastography in patients undergoing cardiac surgery. Anesth Analg 1999;89:580-584.

## Protektive Effekte einer perioperativen systemischen Administration von Lidocain bei kolonchirurgischen Patienten

**S. Herroeder**[1], **S. Pecher**[1], **G. Kaulitz**[1], **M. Schoenherr**[1], **B.W. Böttiger**[1], **E. Martin**[1] und **M.W. Hollmann**[1,2]

[1] Klinik für Anästhesiologie, Universitätsklinikum Heidelberg, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

[2] Kliniken für Anästhesiologie der Universitäten Amsterdam

### Fragestellung

Zahlreiche postoperative Komplikationen, wie z.B. Ileus oder SIRS, werden bereits perioperativ durch eine massive Stimulation der inflammatorischen Kaskade induziert. Da Lokalanästhetika (LA) sowohl in vitro als auch in vivo antiinflammatorische Eigenschaften besitzen [1], könnte ihr perioperativer Einsatz möglicherweise Auftreten und Schwere jener Erkrankungen vermindern und so chirurgisches Outcome verbessern. In ersten klinischen Studien zu den Effekten einer perioperativen systemischen Applikation von LA deutete sich bereits eine Reduktion postoperativen Schmerzes sowie eine schnellere Rückkehr gastrointestinaler Motilität, verbunden mit verkürzter Krankenhausverweildauer, an [2]. Vorliegende doppelblinde, randomisierte und plazebokontrollierte Studie diente der Verifikation der beschriebenen protektiven Effekte von Lidocain sowie der näheren Charakterisierung zugrundeliegender Wirkmechanismen.

### Methodik

Nach Zustimmung der zuständigen Ethikkommission wurden am Universitätsklinikum Heidelberg 63 ASA I-III Patienten zur elektiven Kolonchirurgie, die einen additiven Periduralkatheter entweder ablehnten oder Kontraindikationen zeigten, in vorliegende Studie eingeschlossen und mittels Blockbildung in Kontroll- oder Behandlungsgruppe randomisiert. Nach standardisiertem Protokoll wurde in beiden Gruppen die Anästhesie mittels Sevoflurane/Lachgas durchgeführt und Analgesie über eine kontinuierliche Remifentanil-Infusion erzielt. Patienten der Behandlungsgruppe erhielten vor Narkoseeinleitung 1,5 mg/kg KG Lidocain i.v. als Bolus und nach erfolgter endotrachealer Intubation eine kontinuierliche Lidocain-Infusion (2 mg/min) bis 4 Stunden nach Ende der Operation. Patienten der Kontrollgruppe wurden gleichermaßen mit NaCl 0,9 % behandelt. Krankenhausverweildauer, als primärer Endpunkt der Studie, wurde definiert als Zeitraum bis Patienten Entlassungskriterien erfüllten, um Verzögerungen durch soziale Faktoren auszuschließen. Zudem wurden Länge des Aufwachraum (AWR)-Aufenthaltes, Rückkehr der gastrointestinalen Motilität sowie Plasmaspiegel der Interleukine (IL) IL-1$\beta$, IL-6, IL-8, IL-10, IL-1RA, Komplement C3a und TNF-$\alpha$ prä-, intra- und postoperativ bestimmt. Daten sind als MW±SD angegeben. Statistik: RM-ANOVA mit post-hoc Bonferroni-Korrektur. $P<0,05$ galt als signifikant. Analyse der Gruppengröße ergab zum Nachweis eines signifikanten Unterschiedes hinsichtlich Krankenhausverweildauer eine erforderliche Anzahl von 28 Patienten pro Gruppe (Power 80%).

### Ergebnisse

Die Analyse der demographischen Daten zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen. Ebenfalls keine Unterschiede fanden sich hinsichtlich der Dauer des AWR-Aufenthaltes. Signifikant schneller erholte sich hingegen die Darmtätigkeit der Lidocainbehandelten Patienten: im Vergleich zur Kontrollgruppe traten Darmgeräusche und Flatus ca. 8 Stunden früher auf und die erste Defäkation erfolgte bereits 66,6 ± 26,4 Stunden (vs. 82,1 ± 33,8 Stunden) nach Ende der Operation. Auch die Inzidenz von Darmatonien bzw. Anastomoseninsuffizienzen war signifikant reduziert (8/3 Patienten der Kontroll- bzw. 2/0 Patienten der Lidocaingruppe). Die Krankenhausverweildauer (Abb. 1) der Lidocain-Patienten war zudem mit einem Median von 7 [6,8] Tagen signifikant verkürzt (vs. 8 [7,11] Tage). Die systemische Applikation von Lidocain verminderte des Weiteren signi-

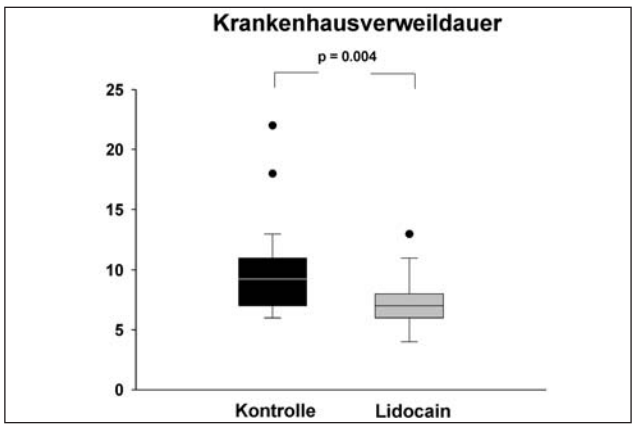


Abb. 1: Krankenhausverweildauer; Kontrolle: Median [25/75%-Perzentile] 8 [7,11]; Lidocain: 7 [6,8].

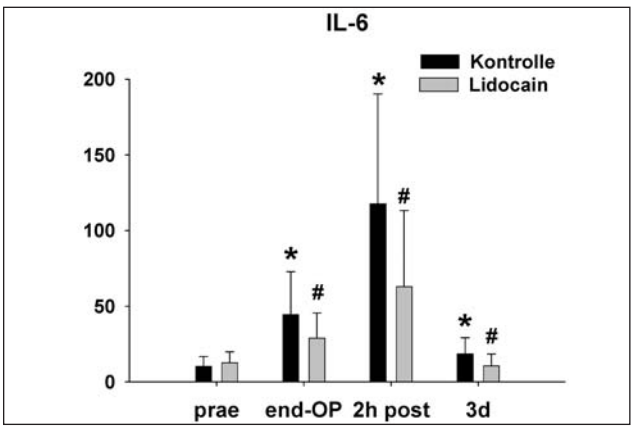


Abb. 2: IL-6 Plasmaspiegel präop., Op-Ende, 2h postop., 3 Tage postop., *p< vs. präop., # vs. Kontrolle.

fikant intra- und postoperative Plasmaspiegel von IL-6 (Abb. 2, Kontrolle: 118 ± 72 pg/ml, Lidocain: 63 ± 50 pg/ml 2 Stunden postoperativ) sowie den postoperativen Anstieg von C3a, IL-1β und IL-1RA. Keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Patientengruppen zeigten sich hingegen für IL-10 und TNF-α.

### Interpretation

Die Ergebnisse zeigen, dass eine perioperative systemische Applikation von Lidocain nicht nur die Rückkehr gastrointestinaler Motilität beschleunigt, sondern auch signifikant die Krankenhausverweildauer der Patienten verkürzt. Diese protektiven Effekte könnten zumindest zum Teil auf den antiinflammatorischen Eigenschaften der LA basieren. Zudem wäre es denkbar, dass auch die positiven Wirkungen der Epiduralanästhesie zumindest teilweise auf einer systemischen Resorption der LA beruhen.


### Literatur

1. **Hollmann MW, Durieux ME.** Anesthesiology 2000;93:858-875.
2. **Groudine SB et al.** Anesth Analg 1998;86:235-239.


## Der zeitliche Verlauf von IL-6, IL-8, TNF-α und Procalcitonin nach cardiopulmonaler Reanimation


**M. Fries**[1], **Ch. Stoppe**[1], **D. Brücken**[1], **St. Beckers**[2], **J. Bickenbach**[2], **R. Rossaint**[1] und **R. Kuhlen**[2]

[1] Klinik für Anästhesiologie,
[2] Fachübergreifende Klinik für operative Intensivmedizin Erwachsene,
Universitätsklinikum Achen, RWTH Aachen


### Fragestellung

Nach einer erfolgreichen cardiopulmonalen Reanimation (CPR) sind frühe Erhöhungen von Zytokinen und Adhäsionsmolekülen, der Nachweis von Plasmaendotoxin [1] und eine gestörte Koagulation [2] beschrieben. Darüber hinaus wurde eine signifikante Erhöhung von Procalcitonin (PCT) nach CPR dokumentiert [3]. Die vorliegende Arbeit untersucht die prognostische Signifikanz und den zeitlichen Zusammenhang von PCT-Erhöhungen und inflammatorischen Zytokinen nach erfolgreicher CPR.

### Methodik

42 Patienten mit atraumatischem Herzkreislaufstillstand und primär erfolgreicher CPR wurden nach positivem Votum der Ethikkommission eingeschlossen und CPR-assoziierte Variablen mittels des „Dortmunder Protokolls“ dokumentiert [4]. Klinische Variablen und Blutentnahmen zur Analyse von IL-6, IL-8, TNF-α und PCT wurden unmittelbar nach Aufnahme im Krankenhaus und nach 6, 12, 24, 72 und 120 h erfasst. Die Blutproben wurden nach 30 minütiger Gerinnung bei 3000 x g für 15 min zentrifugiert und das Serum bei -80° C bis zur Analyse mittels immunoluminometrischer Assays aufbewahrt. Nach 14 Tagen untersuchten wir das neurologische Ergebnis der Patienten mittels der „Cerebral Performance Categories“ (CPC1=völlige neurologische Genesung, CPC2=minimale neurologische Beeinträchtigung, CPC3=schwere neurologische Beeinträchtigung, CPC4=vegetativer Status, CPC5=Tod) und stuften Patienten mit CPC1 und 2 als solche mit gutem und Patienten mit CPC3-5 als solche mit schlechtem neurologischem Ergebnis ein. Statistische Vergleiche zwischen diesen Gruppen wurden für kategoriale Variablen mittels $\chi^2$-Test und für metrische Variablen mittels t-Test bzw. Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Cut-off-Werte, Sensitivität und Spezifität wurden mittels Receiver Operating Characteristic (ROC) Curves berechnet. Wir betrachteten $p<0,05$ als signifikant.

### Ergebnisse

CPR-bezogene Variablen ergaben, dass beide Gruppen, bis auf „Call-response-Interval“ und die Gesamtmenge an Adrenalin, vergleichbar waren (Tab. 1). In Patienten mit einem schlechtem Ergebnis waren IL-6, IL-8 und TNF-α Werte früh und signifikant erhöht (Abb. 1). Die PCT-Werte waren initial nicht verschieden, stiegen jedoch 6 h nach CPR signifikant in Patienten mit schlechtem Ergebnis an und blieben bis zu 72 h erhöht (Abb. 1). PCT zeigte von allen Parametern die beste diagnostische Performance. Nach 24 h lag der Cut-off-Wert für die Prädiktion eines schlechten Ergebnis mit einer Spezifität von 100% bei 1,9 ng/ml (Sensitivität 82,4%, AUC=0,98).

### Interpretation

Erhöhungen von PCT nach einer erfogreichen CPR finden sich zeitlich erst nach Erhöhungen von IL-6, IL-8 und TNF-α. Diese Verzögerung legt eine Induktion von PCT durch diese Mediatoren nahe. PCT-Serum-Werte haben eine hohe prognostische Relevanz bezüglich des neurologischen Ergebnis von Patienten nach primär erfolgreicher CPR.

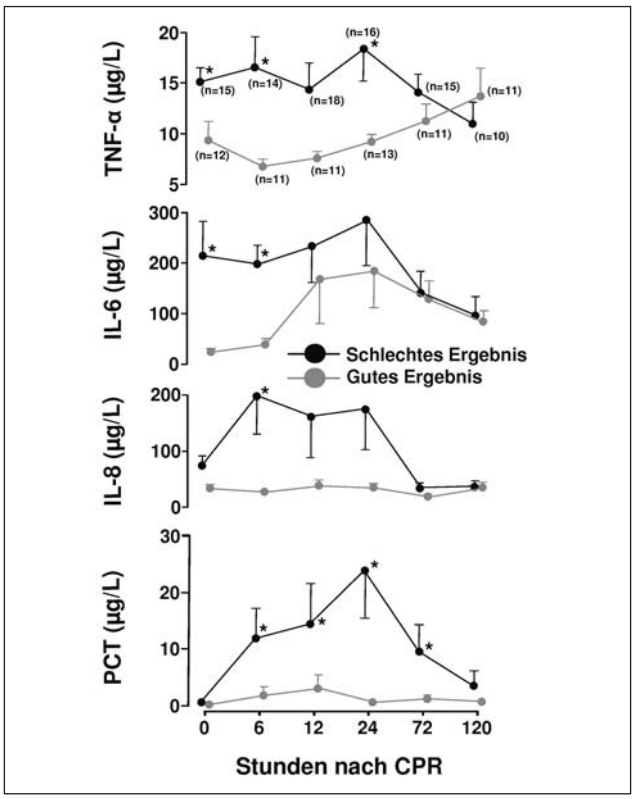


Abb. 1.

Tab. 1

| | Schlechtes Outcome | Gutes Outcome | P |
|---|---|---|---|
| N | 25 | 17 | |
| Alter (Jahre, MW±SD) | 69,2±13,3 | 60,6±18,3 | NS |
| Geschlecht, (männlich,%) | 52,0 | 48,0 | NS |
| Kardiale Genese (%) | 45,2 | 28,6 | NS |
| Stillstand beobachtet (%) | 41,2 | 35,9 | NS |
| Initialer Rhythmus VF/VT (%) | 34,1 | 26,8 | NS |
| Laien CPR (%) | 26,1 | 29,4 | NS |
| Schocks (N, MW±SD) | 3,3±5,5 | 2,7±3,9 | NS |
| Adrenalin (mg, MW±SD) | 5,1±4,7 | 2,4±2,7 | 0,04 |
| "Call-response-interval" (mm:ss, median±SD) | 04:00±02:15 | 02:00±02:15 | 0,02 |


Literatur

1. **Adrie C, Adib-Conquy M, Laurent I, Monchi M, Vinsonneau C, Fitting C, et al.** Successful cardiopulmonary resuscitation after cardiac arrest as a "sepsis-like" syndrome. Circulation 2002;106:562-8.
2. **Bottiger BW, Motsch J, Bohrer H, Boker T, Aulmann M, Nawroth PP, et al.** Activation of blood coagulation after cardiac arrest is not balanced adequately by activation of endogenous fibrinolysis. Circulation 1995;92: 2572-8.
3. **Fries M, Kunz D, Gressner AM, Rossaint R, Kuhlen R.** Procalcitonin serum levels after out-of-hospital cardiac arrest. Resuscitation 2003;59: 105-9.
4. **Gräsner JT, Fischer M, Altemeyer KH, Bahr J,Böttiger BW, Dörges V, Franz R, Gries A, Krieter H, Messelken M, Rosolski T, Ruppert M, Schlechtriemen T, Scholz J, Schüttler J, Wolke B, Zander JF.** Nationales –„"Reanimationsregister Strukturierte Reanimationsdatenerfassung - Der DGAI-Reanimationsdatensatz Erstversorgung. Anästh Intensivmed 2005; 1:42-45.


## Der neue wasserlösliche Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase-Inhibitor INO-1001 reduziert den Schaden an Leber und Darm nach hämorrhagischem Schock und Reperfusion. Untersuchungen am instrumentierten Hausschwein


**T. Iber**[1], **J.P. Roesner**[1], **C. Mutz**[1], **K. Zacharowski**[2], **T.W.L. Scheeren**[1], **G.F.E. Nöldge-Schomburg**[1] und **D.A. Vagts**[1]

[1] Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie, Universitätsklinikum Rostock, Universitäts Rostock

[2] Molecular Cardioprotection Group & Inflammation Group, Klinik für Anästhesiologie, Universitätsklinikum Düsseldorf, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf


### Fragestellung

Die Organe des Splanchnikusgebietes, v. a. Leber und Darm, sind besonders anfällig gegenüber Minderperfusion und anschließender Reperfusion. Dies hat eine besondere Bedeutung in der Entwicklung und Unterhaltung einer Sepsis und des Multiorganversagens. Ein möglicher Schädigungsmechanismus ist die Aktivierung der Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP), eines in eukaryotischen Zellen vorliegenden Reparaturenzyms. Dieses repariert geschädigte DNS und aktiviert Entzündungszellen mit konsekutiver Störung der Mikrozirkulation und nachfolgender Organschädigung [1]. Wir postulierten, dass eine PARP-Hemmung bei hämorrhagischem Schock vor Reperfusion sich protektiv auf die Organe des Splanchnikusgebietes auswirkt.

### Methodik

Nach Zustimmung der Tierschutzkommission wurde bei anästhesierten (Ketamin, Flunitrazepam, Rocuronium), beatmeten und instrumentierten männlichen deutschen Hausschweinen (27-32 kg) ein hämorrhagischer Schock durch kontrolliertes Ausbluten bis auf einen mittleren arteriellen Druck (MAP) von 40 mmHg für eine Stunde induziert. 2 Gruppen wurden untersucht: 1. Kontrolle (Schock, Kochsalz) und 2. wasserlöslicher PARP-Inhibitor INO-1001 (INO, 2 mg/kg iv-Bolus 5 min vor Reperfusion, anschließend 1 mg/kg/h iv). Zur Reperfusion wurden 60 % des entnommenen Blutes sowie die zweifache Menge (entnommenen Blutes) in Form von kristalloider Lösung infundiert. Zu den Zeitpunkten Ausgangswert (basal), Ende der Schockphase sowie 1 h und 5 h nach Reperfusion wurden die Blutflüsse in der Arteria hepatica und mesenterica sowie der Vena portae, die Gewebeoxygenierung ($tpO_2$) von Leber und Jejunum (Mukosa, Serosa), und die Differenz zwischen mukosalem (Jejunum) und arteriellem $pCO_2$ ($dpiaCO_2$) gemessen. Zusätzlich wurden Blutgasanalysen in den Gefäßen des Splanchnikusgebietes zur Bestimmung des regionalen Sauerstoffangebotes und -verbrauchs durchgeführt. Des Weiteren wurden im Serum Aspartat-Aminotransferase (ASAT) und Laktat bestimmt. Die Ergebnisse von 7 Versuchstieren pro Gruppe sind als Median mit 25/75% Quartilen dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels nicht-parametrischer Tests: innerhalb der Gruppen gegenüber dem Ausgangswert mittels Tukey-Kramer-Test, zwischen den Gruppen mittels Wilcoxon-Test; $p<0,05$ galt als signifikant.

### Ergebnisse

Während der Schockphase waren die regionale Durchblutung und das regionale Sauerstoffangebot deutlich verringert. Laktat und $dpiaCO_2$ stiegen an, die Gewebeoxygenierung von Leber und Dünndarm fiel ab. Während der Reperfusion erreichte die Oberflächenoxygenierung von Leber und Serosa initial wieder das Ausgangsniveau, fiel aber im Verlauf von 5 h Reperfusion deutlich ab. Die Oxygenierung der Mukosa blieb bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes unterhalb des Ausgangsniveaus. Bei den INO-1001 vorbehandelten Tieren war die Gewebeoxygenierung ($tpO_2$) von Leber, Serosa (Tab. 1) und Mukosa (Abb. 1a) signifikant höher als bei den unbehandelten Tieren. Das

Tab. 1

| | Schock (basal) | Schock (Schock) | Schock (Rep 5 h) | INO (basal) | INO (Schock) | INO (Rep 5 h) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| $tpO_2$-Leber (mmHg) | 75 (66/82) | 56 (36/65)# | 52 (47/56)# | 70 (65/76) | 50 (34/59)# | 66 (62/69) * |
| $tpO_2$-Serosa (mmHg) | 64 (57/69) | 39 (24/58)# | 42 (37/43)# | 64 (59/70) | 47 (39/50)# | 55 (52/66) * |
| $dpiaCO_2$ (kPa) | 1,7 (1/1,9) | 7,6(4/11)# | 3,9 (3,6/8,5)# | 2,1 (1/2,3) | 6,6 (4,4/8,1)# | 2,5 (1,9/3,4)* |
| Laktat (mmol/l) | 3,2 (2/6,4) | 10,5(9/11)# | 2,2 (1,6/3) | 3,7 (2,5/6,1) | 7,9 (6,6/11)# | 1,9 (1,5/3,6) |

Erläuterungen zu den Sympolen siehe unter Abbildung 1.

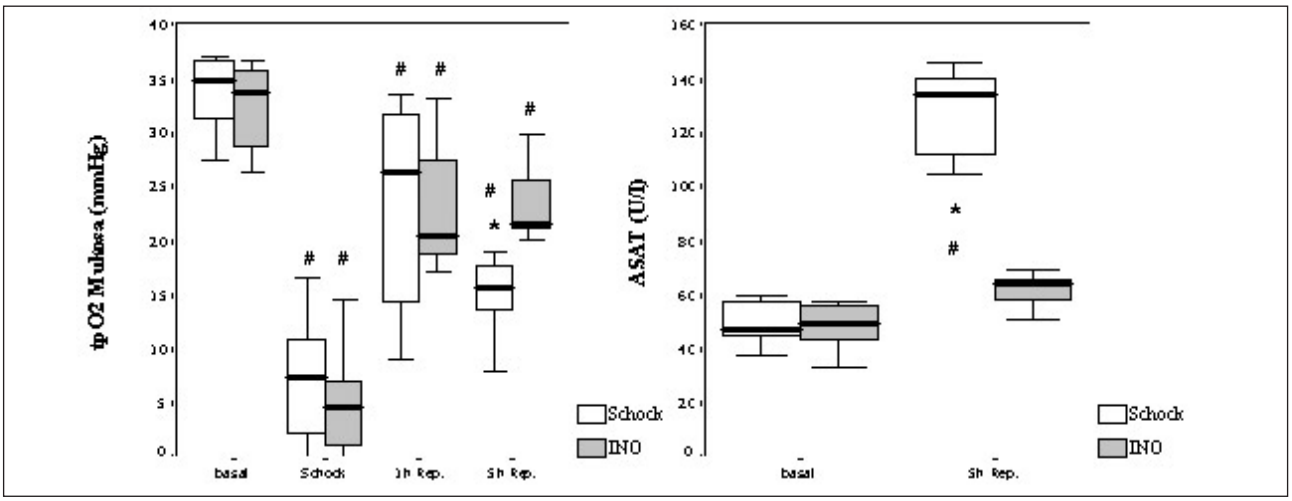


Abb. 1: a. Oberflächengewebeoxygenierung (tpO2) der Dünndarmmukosa;
b. Aspartat-Aminotransferase (ASAT) im Serum, # Vergleich innerhalb der Gruppe gegenüber dem Ausgangswert; * Vergleich zwischen den Gruppen; */#:p<0,05.

dpia$CO_2$ als Marker der Darmperfusion war nach PARP-Inhibition signifikant niedriger. Bei den unbehandelten Tieren stiegen die Leberenzyme (ASAT) im Serum im Gegensatz zu den INO-1001 behandelten Tieren an (Abb. 1b). Die Blutflüsse in den das Splanchnikusgebiet versorgenden Gefäßen wurden durch die PARP-Inhibition nicht verändert.

### Interpretation

Die Organe des Splanchnikusgebietes werden durch die Reperfusion nach hämorrhagischem Schock geschädigt. Die PARP-Inhibition mit dem neuen wasserlöslichen Inhibitor INO-1001 reduziert die Ausmaße des Reperfusionsschadens. Dies wird an einer verringerten Freisetzung zellulärer Schädigungsmarker und an einer verbesserten Gewebeoxygenierung deutlich.

### Literatur

**1. Erdelyi K, Bakondi E, Gergely P, et al.** Cell Mol Life Sci 2005;62:751-759.

## Vorbehandlung mit Häm-basierten Lösungen: Regulationsmechanismen der Leber-Mikrozirkulation nach hämorrhagischem Schock

**D. Kubulus, S. Pradarutti, A. Raddatz, D. Pavlidis, J. Heiser, L. Jellestad, I. Bauer** und **H. Rensing**
Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie, Universitätsklinikum des Saarlandes, Universität Homburg/Saar

### Fragestellung

Die Vorbehandlung mit hämoglobinbasierten Sauerstoffträgern (HBOC, z.B. Hämoglobinglutamer 200 (HbG)) oder mit Häm-Verbindungen (z.B. Häminarginat (HAR)) führt zu einer Induktion der Hämoxygenase-1 (HO-1) [1]. Obwohl die HO-1 durch den Abbau von Häm zu Kohlenmonoxid (CO, Vasodilatator) und Biliverdin (Antioxidans) gewebeprotektive Eigenschaften aufweist [2] zeigen HBOC-vorbehandelte Tiere eine höhere Letalität im Vergleich zu HAR-vorbehandelten Tieren nach hämorrhagischem Schock (HS) [1]. Mögliche Ursache dieser höheren Letalität könnte die vasokonstringierende Eigenschaft der HBOC-Lösungen sein. Die Mechanismen dieser Vasokonstriktion sind nicht klar, die Bindung von Stickstoffmonoxid (NO) und die Induktion der Endothelin (ET)-1-Expression [3] könnten eine wesentliche Rolle dabei spielen. Wir untersuchten daher die Bedeutung von NO und ET-1 nach Präkonditionierung mit HbG oder HAR für die Mikrozirkulation nach hämorrhagischem Schock.

### Methodik

Alle Untersuchungen wurden nach Genehmigung durch die Tierschutzbehörde an narkotisierten (Pentobarbital, 50 mg/kg i.p.), spontan atmenden Sprague-Dawley-Ratten durchgeführt. 24 h nach i.v. Präkonditionierung mit HbG (1 g/kg KG) bzw. Häminarginat (5 mg/kg KG) erfolgte ein 1-stündiger hämorrhagischer Schock (MAP: 35±5 mmHg). Anschließend erhielten die Tiere 60 % des entnommenen Blutes zurück sowie nachfolgend eine Ringer-Laktat-Volumentherapie mit 200 % der Menge des entnommenen Blutvolumens in der 1. Stunde und 100 % in der 2. Stunde. Tiere vorbehandelt mit 30 ml/kg Ringer-Laktat dienten als Kontrollen (Vehikel). Nach Volumentherapie wurde die Mikrozirkulation der Leber intravitalmikroskopisch untersucht. Die Bedeutung von NO wurde durch Zugabe des NO-Donors Molsidomin (10 mg/kg KG über Magensonde) und die Bedeutung von ET-1 durch Gabe des unspezifischen ET-Antagonisten Bosentan (10 mg/kg KG i.v.) untersucht. Zur Beurteilung der funktionellen Bedeutung der HO-1-Induktion wurde der HO-Stoffwechsel in Gegenwart oder Abwesenheit des CO-Donors Dichlormethan (DCM, 100 mg/kg KG über Magensonde) mit Zinn-Mesoporphyrin-IX (SnMP-IX, 10 µmol/kg KG i.v.) blockiert. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ANOVA und Student-Newman-Keuls-Test (je n=8/Gruppe).

### Ergebnisse

Die Präkonditionierung mit HbG und HAR resultierte in einer HO-1-Proteinexpression in der Leber. Die HbG-Präkonditionierung führte zu vergleichbaren Veränderungen der mikrozirkulatorischen Parameter wie in der Schock-Vehikel-Gruppe, d.h. es kam im Vergleich zu scheinoperierten Tieren (Sham) zu einer signifikanten Verschlechterung der sinusoidalen Perfusion (p<0,05). Die Zugabe des NO-Donors, insbesondere jedoch die Blockade der ET-Rezeptoren führte zu einer signifikanten Verbesserung der

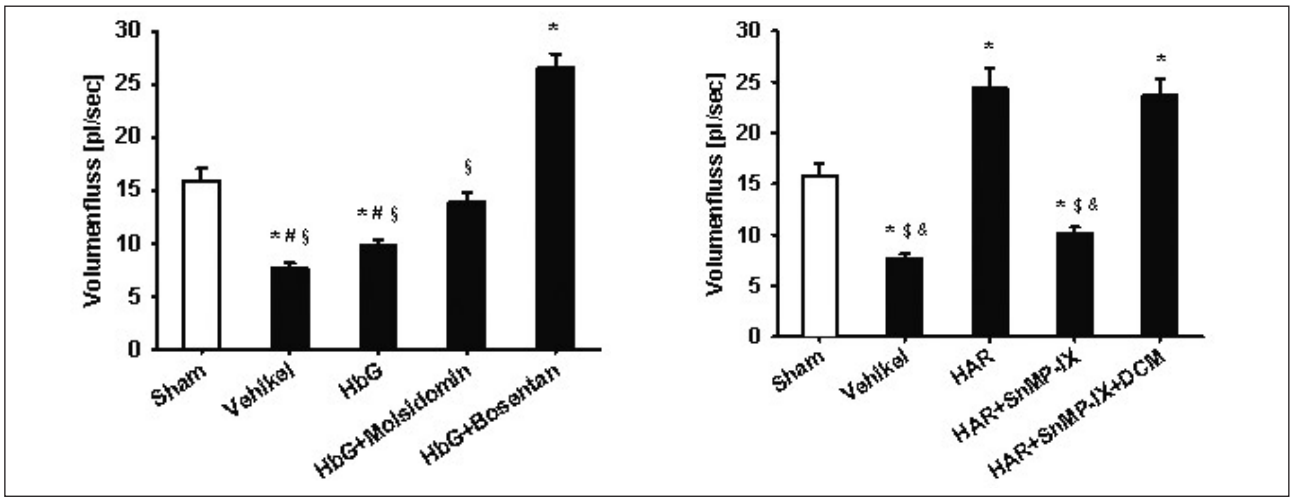


Abb. 1: Auswirkung der Präkonditionierung auf die Mikrozirkulation der Leber am Beispiel des Blutvolumenflusses nach hämorrhagischem Schock. * p<0,05 vs. Sham, # p<0,05 vs. HbG+Molsidomin, § p<0,05 vs. HbG+Bosentan, $ p<0,05 vs. HAR, & p<0,05 vs. HAR+SnMP-IX+DCM, ANOVA und Student-Newman-Keuls.

regionalen Gesamtperfusion (p<0,05 vs. HbG und Vehikel). Die HAR-präkonditionierten Tiere wiesen eine signifikante Verbesserung der Mikrozirkulation der Leber (p<0,05) im Vergleich zur Vehikel- sowie HbG-Gruppe auf. Die Blockade der HO-Aktivität nach HAR-Präkonditionierung mit SnMP-IX hob die beobachtete Verbesserung komplett auf (p<0,05 vs. HAR). Die zusätzliche Zufuhr von CO nach HO-Blockade führte zu einer Verbesserung der Perfusion ähnlich der nach HAR-Präkonditionierung allein (p<0,05 vs. HAR+SnMP-IX).

### Interpretation

Trotz der Induktion der HO-1 durch beide Substanzen führte die Präkonditionierung mit HbG zu einer Verschlechterung der Mikrozirkulation der Leber nach hämorrhagischem Schock. Entscheidend scheint hierbei insbesondere eine ET-1-vermittelte Konstriktion der Sinusoide zu sein. Im Gegensatz dazu wies die HAR-Präkonditionierung eine Verbesserung der Mikrozirkulation auf, die wesentlich durch eine CO-vermittelte Vasodilatation nach Induktion der HO-1 hervorgerufen wird.

### Literatur

1. **Kubulus D, Rensing H, et al.** Influence of heme solutions on stress protein expression and organ failure after hemorrhagic shock. Crit Care Med 2005;33:629-637.
2. **Rensing H, Bauer I, et al.** Differential expression pattern of heme oxygenase-1/heat shock protein 32 and nitric oxide synthase-II and their impact on liver injury in a rat model of hemorrhage and resuscitation. Crit Care Med 1999;27:2766-2775.
3. **Lin G, Macdonald RL, et al.** Hemoglobin increases endothelin-1 in endothelial cells by decreasing nitric oxide. Biochem.Biophys.Res.Commun 2001;280:824-830.

## Einfluss von Hypoxie auf die endotheliale ATP-Signalübertragung: Funktionelle Folgen der HIF-1-abhängigen Induktion des $P2Y_2$- Rezeptors

**Th. Weissmüller[1], T. Eckle[1], M. Faigle[1], A. Robinson[3], P. Rosenberger[1,3], V.A.J. Kempf[2], S.P. Colgan[3], K. Unertl[1] und H.K. Eltzschig[1,3]**

[1] Klinik für Anaesthesiologie und Intensivmedizin,
[2] Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene,
Universitätsklinikum Tübingen, Eberhard-Karls-Universität Tübingen
[3] Center for Experimental Therapeutics and Reperfusion Injury, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston

### Fragestellung

Bei verschiedenen Krankheitsbildern aus der Intensivmedizin (z. B. Sepsis, akutes Lungenversagen) spielt eine Minderversorgung mit Sauerstoff (Hypoxie) eine wichtige pathogenetische Rolle. Eine besondere Bedeutung kommt hierbei der transkriptionellen Adaption des vaskulären Endothels an die erniedrigte Sauerstoffversorgung zu [1,2]. Gleichzeitig weisen verschiedene Studien darauf hin, dass die extrazelluläre Adenosintriphosphat (ATP)-Konzentration unter hypoxischen Bedingungen erhöht ist [3]. Weil ATP als wichtiges extrazelluläres Signalübertragungsmolekül bekannt ist und gleichzeitig die vaskulären Endothelzellen (ECs) verschiedene ATP-Rezeptoren exprimieren [3], sind wir der Frage nachgegangen, ob Hypoxie zu einer transkriptionellen Modulation der vaskulären ATP-Signalübertragung führt.

### Methodik

Anhand von mRNA Analysen („real-time PCR") an normoxisch kultivierten Endothelzellen wurde zunächst untersucht, welche ATP Rezeptoren (so genannte P2Y- und P2X-Rezeptoren) auf ECs transkribiert werden. Anschließend wurden diese Untersuchungen auf hypoxisch vorbehandelte Endothelzellen (0 bis 24h bei 2% Sauerstoff) übertragen. Infolge wurden die PCR- Ergebnisse durch Westernblot- und Immunopräzipitations-Versuche auf Proteinebene überprüft. Funktionelle Folgen der ATP-Rezeptor Induktion wurden anhand von ATP-Stimulationsversuchen an ECs untersucht. Dies wurde in In-vitro-Modellen für die ATP-induzierte Modulation der Adhäsionsmolekül-Expression und der endothelialen Barrierefunktion untersucht. Um Spezifität zu demonstrieren, wurden diese Versuche anschließend nach „plasmid-based-small-interfering"-RNA (psiRNA)-Knockdown wiederholt. Um Ein-

blick in transkriptionelle Mechanismen zu erhalten, wurden Untersuchungen an ECs mit erhöhter oder verminderter Expression des Transkriptionsfaktors „hypoxia-inducible-factor“ (HIF)-1 durchgeführt. Zusätzlich wurden Versuche zum Nachweis der Chromatin-Bindung von HIF-1 an die Promotor-Region einzelner ATP-Rezeptoren durchgeführt (ChIP-Assay). Nach Genehmigung durch das Tübinger Regierungspräsidium wurde in einem murinen Ganzkörper-Hypoxie-Model sowie in einem murinen Model der Myokardischämie untersucht, ob die erhobenen Befunde sich auch in vivo bestätigen lassen. In letzterem Modell wurde die linke Koronararterie temporär für 15, 30, 45 bzw. 60 Minuten ligiert, gefolgt von einer zweistündigen Reperfusionsphase.

## Ergebnisse

Vaskuläre ECs exprimieren 3 P2X- und 5 P2Y-Rezeptoren. Von diesen Rezeptoren wird der $P2Y_2$-Rezeptor selektiv durch Hypoxie induziert (Abb.). Die Induktion dieses Rezeptors führt funktionell zu einer Verstärkung der $P2Y_2$-abhängigen Expression des „vascular cell adhesion molecule-1“ (VCAM-1) in post-hypoxischen ECs. Zusätzlich beobachteten wir nach In-vitro-Stimulation des $P2Y_2$-Rezeptors eine verstärkte Zunahme der endothelialen Permeabilität in posthypoxischen ECs. Diese Unterschiede zwischen normoxischen und posthypoxischen ECs waren nach spezifischem psiRNA-Knockdown des $P2Y_2$-Rezeptors nicht mehr nachweisbar. Untersuchungen an ECs mit psiRNA-Knockdown von HIF-1 sowie an HIF-1 überexprimierenden ECs zeigten, dass die Induktion des P2Y2-Rezeptors via HIF-1 reguliert wird. Zusätzlich konnte die direkte Bindung von HIF-1 an den $P2Y_2$-Promoter im ChIP-Assay nachgewiesen werden. Versuche an Mäusen, die über 4h bei 8% Sauerstoff gehalten wurden, bestätigten die Hypoxie-Induktion des $P2Y_2$-Rezeptor in vivo. Bei muriner Myokardischämie korreliert darüber hinaus die Infarktgröße mit dem Ausmaß der $P2Y_2$-Induktion.

### Interpretation

Diese Untersuchungen zeigen, dass der endotheliale P2Y2-Rezeptor selektiv durch Hypoxie induziert wird. Diese Adaptation wird auf transkriptioneller Ebene durch Bindung des Transkriptionsfaktors HIF-1 an den $P2Y_2$-Promoter vermittelt. Zellbiologisch führt die $P2Y_2$-Induktion zu einer ATP-getriggerten, pro-

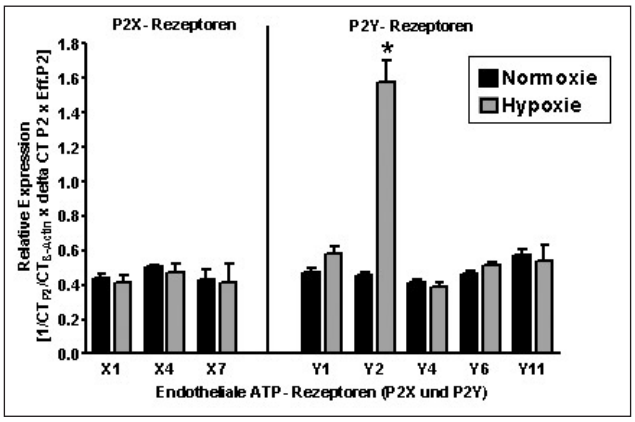


Abb. 1: Der endotheliale P2Y2- Rezetor wird durch Hypoxie induziert. Kultivierte Endothelzellen (HMEC-1) wurden unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen kultiviert (2% Sauerstoff für 24h) und die Gesamt- RNA isoliert. Durch “real-time”-PCR (iCycler; Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, California, USA) wurde die mRNA aller ATP- Rezeptoren (P2X, P2Y) amplifiziert und verglichen. Nur der P2Y2 Rezeptor wurde durch Hypoxie induziert (* $p<0.01$).

inflammatorischen Aktivierung von Endothelzellen. Weiterführende Untersuchungen werden zeigen, ob der $P2Y_2$-Rezeptor eine neue therapeutische Zielgröße zur Behandlung von Ischämie/Hypoxie-assoziierter Entzündung oder Barriere- Dysfunktion darstellt.


**Literatur**

**1.Eltzschig HK, Abdulla P, Hoffman E et al.** HIF-1-dependent repression of equilibrative nucleoside transporter (ENT) in hypoxia. J. Exp. Med. 2005;202:1493-505.

**2.Eltzschig HK, Ibla JC, Furuta GT et al.** Coordinated adenine nucleotide phosphohydrolysis and nucleoside signaling in posthypoxic endothelium: role of ectonucleotidases and adenosine A2B receptors. J Exp Med 2003;198:783-96.

**3.Weissmuller T, Eltzschig HK, Colgan SP.** Dynamic purine signaling and metabolism during neutrophil-endothelial interactions. Purinergic Signalling 2005;1:229-39.


## Glycin und nicht Remifentanil im Präparat Ultiva® verursacht eine NMDA-Rezeptoraktivierung in primären Nervenzellnetzwerken des Frontalkortex der Maus in vitro


**F. Kletzin**[1], **A. Gramowski**[2], **R. Hofmockel**[1], **D.G. Weiss**[2] und **G.F.E. Nöldge-Schomburg**[1]

[1] Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie, Universitätsklinikum Rostock, Universität Rostock

[2] Institut für Zellbiologie und Biosystemtechnik, Universität Rostock


### Problem

Die Wirkung von Remifentanil am NMDA-Rezeptor wird kontrovers diskutiert [1]. Es ist umstritten, ob die beschriebene NMDA-Aktivierung durch Remifentanil oder durch Glycinzusatz verursacht wird [2]. In dieser Studie wurden murine Nervenzellnetzwerke aus frontalem Cortex der Maus auf Multielektrodenchips untersucht, um die elektrophysiologischen Effekte von Remifentanil zu untersuchen.

### Materialien und Methoden

Es wurde die Multielektrodenchip-Technologie angewendet, bei der in einem Hybridsystem primäre Glia-Neuronen-Cokulturen von Mäusen auf Neurochips kultiviert werden [3]. Die Präparation erfolgte entsprechend dem Tierschutzgesetz. Nach mechanischer und enzymatischer Dissoziation mit Papain und DNaseI wurden Zellen des frontalen Kortex in Dulbecco`s Modified Eagles Medium (DMEM) 10/10 (10% Pferde- und 10% fetales Kälberserum), Mediumwechsel 3-mal wöchentlich, pH 7,4, 37°C, 10%ige $CO_2$-Atmosphäre, kultiviert und auf mit Poly-D-Lysin und Laminin beschichteten Neurochips inkubiert. Es kommt zu Interaktionen zwischen Elektroden und Nervenzellen, wobei Aktionspotentiale von bis zu 128 Nervenzellen parallel abgeleitet, über ein 64-Kanal-Verstärkersystem aufgezeichnet und ausgewertet werden können. Eine elektrische Spontanaktivität tritt erstmals nach 3 Tagen in vitro auf und ist über mehrere Monate langzeitstabil [3]. Die Substanztestung kann nach Stabilisierung der neuronalen Aktivität erfolgen. Die Aktionspotentiale wurden mit einem Matching-algorhythmus diskriminiert. Anhand der spezifischen Beeinflussung der Spontanaktivität des Netzwerkes wurden die elektrophysiologischen Effekte von Remifentanil bei steigender kumu-

lativer Dosierung analysiert (n=11), ferner wurden die Wirkung auf den NMDA-Rezeptor durch Rezeptorblockade (n=12) und die Effekte nach Vorbehandlung mit 3mM Glycin (n=6) entsprechend der Glycinkonzentration in Ultiva® untersucht. Dosis-Wirkungs–Kurven wurden berechnet.

### Ergebnisse

Remifentanil verursachte ab ≥ 0.01pM (SR: 98.3±0.7%, p=0.04) eine signifikante Reduktion der Spontanaktivität. Synchronität und Regelmäßigkeit des Aktivitätsmusters blieben zunächst unverändert. 20µM Remifentanil verursachten einen plötzlichen Aktivitätsanstieg (SR: 165.8±7.3%, p=0.003; BR: 151.0±6.0%, p=0.003), gefolgt von einem kompletten Aktivitätsverlust bei 100µM. Der plötzliche Aktivitätsanstieg war nach Blockade des NMDA-Rezeptors nicht mehr nachweisbar. Vorbehandlung des Netzwerkes mit 3mM Glycin verursachte einen Anstieg der Netzwerkaktivität (SR:163.0±16.5%, BR:198.0±6.3%). Zusätzliche Applikation von Remifentanil verursachte einen signifikanten Aktivitätsabfall ab 1pM (p=0.01). Steigende Remifentanildosen führten zu dosisabhängiger Aktivitätsreduktion (SR:11.7±3.0%, BR:7.0±0.5%) ohne kompletten Aktivitätsverlust. Ein Aktivitätsanstieg, vergleichbar dem durch Remifentanilapplikation auf die Spontanaktivität hervorgerufenen, trat nicht auf.

### Interpretation

Ultiva® wirkt in hohen Dosen als NMDA-Agonist bzw. potenziert die NMDA-Wirkung anderer Agonisten. Der Glycinzusatz ist für diesen Effekt verantwortlich, da 3mM Glycinvorbehandlung netzwerkaktivierend wirkt und eine NMDA-Aktvierung durch anschließende Ultiva®-Applikation unterbindet. Die erreichbare Glycinkonzentration (0,3µM) durch Ultivaapplikation (0,5µg/kg/min) liegt

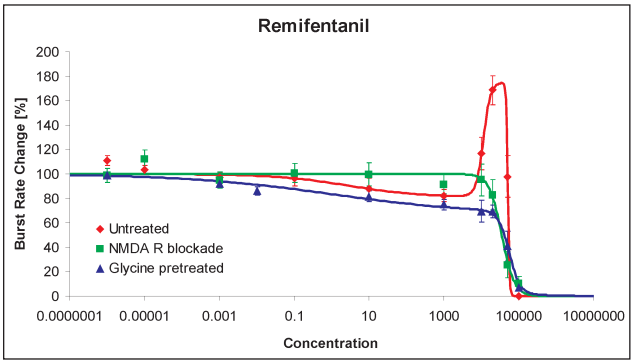


Abb. 1

jedoch deutlich unterhalb des physiologischen Glycinplasmaspiegels (0,1mM). Somit sollte der beschriebene Effekt keine klinische Relevanz für Hyperalgesie und Opioidtoleranz nach Ultiva®-Applikation haben. Von intrathekaler oder epiduraler Applikation von Ultiva® ist jedoch abzuraten.


### Literatur

**1. Hahnenkamp K, Nollet J, van Aken, HK.** Remifentanil directly activates human NMDA receptors expressed in Xenopus laevis oocytes. Anesthesiology 2004;100(6):1531-37.

**2. Guntz E, Dumont H, Roussel C, Gall D. et. al.** Effects of Remifentanil on N-methyl-D-aspartate Receptor. Anesthesiology 2005;102(6):1235-41.

**3. Gramowski A, Jügelt K, Weiss DG, Gross, G.W.:** Substance identification by quantitative characterization of oscillatory activity in murine spinal cord networks on microelectrode arrays. Eur J Neurosci 19: 2815-25 (2004).


## Monitoring der zerebralen Perfusion mittels Nahinfrarotspektroskopie im Vergleich zur transkraniellen Doppler-Sonographie bei schwerer Hämorrhagie


**P. Meybohm, E. Cavus, V. Dörges, M. Steinfath, J. Scholz** und **B. Bein**

Klinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel, Christian-Albrechts-Universität Kiel


### Fragestellung

Die transkranielle Doppler-Sonographie (TCD) stellt für die Messung der zerebralen Hämodynamik bei verschiedenen neurochirurgischen Krankheitsbildern ein anerkanntes Verfahren dar [1, 2]. Alternativ kann mit Hilfe der Nahinfrarotspektroskopie (NIRS) in Kombination mit dem iv-applizierbaren Farbstoff Indocyaningrün (ICG) der zerebrale Blood Flow Index (BFI) kalkuliert werden [3]. Ziel dieser Studie war die Gegenüberstellung von TCD und BFI hinsichtlich der Messung der zerebralen Perfusion während einer schweren Hämorrhagie.

### Methoden

Nach Zustimmung der Tierschutzkommission wurden 8 gesunde Schweine in Allgemeinnarkose [Propofol (8 mg/kg/h), Sufentanil (0,3 µg/kg/h), Pancuronium (0,1 mg/kg/h)] durch einen kontrollierten Leberschnitt einer schweren Hämorrhagie ausgesetzt. Sobald der mittlere Aortendruck auf < 25 mm Hg abfiel, oder sich die Herzfrequenz um > 20 % des maximalen Wertes verringerte, wurde dies als hämodynamische Dekompensation definiert, und alle Tiere erhielten eine Kombination von hypertoner-hyperonkotischer Hydroxyethylstärke Lösung (Hyperhaes®, HHS; 4 ml/kg) und Arginin Vasopressin (AVP; 0,2 IU/kg Bolus; 0,04 IU/kg/min kontinuierliche Infusion). Alle Tiere wurden für 60 min beobachtet. Zur Bestimmung des intrakraniellen Druckes (ICP) wurde eine fiberoptische Sonde (Ventrix, Integra NeuroSciences, Plainsboro, NJ, USA) über ein Mehr-Kanal-Führungsset (Licox IM3.STV, GMS, Kiel, Deutschland) epidural nach Setzen eines Bohrloches eingesetzt. Der zerebrale Perfusionsdruck (CPP) wurde aus der Differenz von MAP und ICP berechnet. Mittels TCD (DWL, Sipplingen, Deutschland) wurde die mittlere Blutflussgeschwindigkeit ($FV_{mean}$) der rechten A. cerebri media transtemporal nach Hautinzision und Fixierung der Sonde mittels elastische Binde in einer Tiefe von 28 bis 32 mm untersucht, die NIRS-Optoden (NIRO 300; Hamamatsu Photonics, Herrsching, Deutschland) wurden oberhalb der rechten Hemisphäre auf dem Schädelknochen platziert. ICG (Pulsion Medical Systems, Munich, Deutschland) wurde in einer Dosis von 0,1 mg/kg iv-appliziert. Sowohl $FV_{mean}$ als auch der BFI wurden zu den Zeitpunkten Ausgangswert (BL), hämodynamische Dekompensation (BL Th) sowie 10 und 40 min nach Therapiestart erhoben. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ANOVA für Messwiederholungen und Bonferroni-Adjustierung. Die Korrelation zwischen $FV_{mean}$ und BFI wurde mit Hilfe der Spearman's Rank Korrelation durchgeführt. Ein $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

### Ergebnisse

Alle Tiere überlebten den Versuch. Zum Zeitpunkt BL Th fielen CPP, $FV_{mean}$ und BFI im Vergleich zur BL (Mittelwert ± SEM; CPP 16 ± 2 mm Hg vs. 65 ± 5 mm Hg; $FV_{mean}$ 1 ± 1 cm/s vs. 25 ± 9 cm/s; BFI 36 ± 16 % vs. 100 %; p<0,001). Nach der Gabe von HHS und AVP stiegen CPP, $FV_{mean}$ and BFI wieder an (CPP 49 ± 6 mm

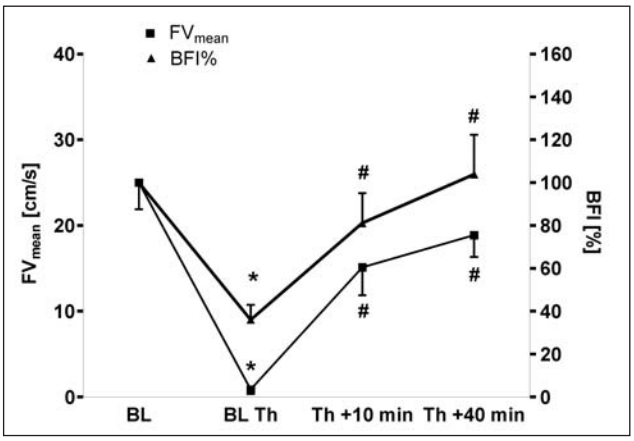


Abb. 1: Mittlere Blutflussgeschwindigkeit ($FV_{mean}$) und Blood Flow Index (BFI) zu verschiedenen Zeitpunkten. Mittelwerte ± SEM. BL = Ausgangswert; BL Th = hämodynamische Dekompensation; Th +10 min = 10 min nach Therapiestart; Th +40 min = 40 min nach Therapiestart. *p<0.001 versus BL; #p<0.001 versus BL Th.

Hg; FVmean 19 ± 3 cm/s; BFI 104 ± 18 %) (Abb. 1). $FV_{mean}$ and BFI korrelierten signifikant miteinander (r=0,57; p<0,01).

### Schlussfolgerungen

In diesem Modell einer schweren Hämorrhagie korrelierten $FV_{mean}$ und BFI signifikant. Beide Parameter spiegelten zum einen die zerebrale Minderperfusion während hämodynamischer Dekompensation und zum anderen die Wiederherstellung der zerebralen Hämodynamik unter der Therapie mit HHS und AVP wider.

### Literatur

1. **Werner C, Hoffman WE, Kochs E, Albrecht RF, Schulte am Esch J.** Transcranial Doppler sonography indicates critical brain perfusion during hemorrhagic hypotension in dogs. Anesth Analg 1995;81:1203-1207.
2. **Baumgartner RW, Mattle HP, Aaslid R.** Transcranial color-coded duplex sonography, magnetic resonance angiography, and computed tomography angiography: methods, applications, advantages, and limitations. J Clin Ultrasound 1995;23:89-111.
3. **Kuebler WM, Sckell A, Habler O, Kleen M, Kuhnle GE, Welte M, Messmer K, Goetz AE.** Noninvasive measurement of regional cerebral blood flow by near- infrared spectroscopy and indocyanine green. J Cereb Blood Flow Metab 1998;18:445-456.

## Sevofluran hemmt die Depolarisation von Ia-Afferenzen beim Menschen über präsynaptische Mechanismen

**J.H. Baars, F. von Dincklage, J. Reiche** und **B. Rehberg**
Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin, Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Mitte und Campus Virchow-Klinikum

### Fragestellung

In-vitro-Untersuchungen am lumbalen Rückenmark von Ratten weisen darauf hin, dass an der Unterdrückung motorischer Reaktionen auf Schmerzreize durch volatile Anästhetika präsynaptische inhibitorische Mechanismen beteiligt sind. Bisher wurden spezifische präsynatische Effekte von Sevofluran jedoch noch nicht in vivo nachgewiesen [1].
Wir nutzten dazu das Verfahren der heteronymen Ia-Fazilitation des M.-soleus-H-Reflexes durch Stimulation des N. femoralis [2]. Dieses Untersuchungsverfahren ermöglicht spezifische präsynaptische Effekte verschiedener Pharmaka am Menschen zu demonstrieren und wurde von uns zur Untersuchung der Effekte von Sevofluran angewendet.

### Methodik

Nach Genehmigung der Ethikkomission der Charité wurde die Studie an zehn Probanden im Alter zwischen 23 und 32 Jahren durchgeführt. Die Probanden atmeten 0.8 Vol.% Sevofluran über das Kreisteil eines Narkosegeräts. Die Messungen erfolgten nach einer 30-minütigen Äquilibrationszeit im Steady-state.
Der H-Reflex wurde alle 6 Sekunden durch Stimulation (Rechteckpuls 1ms Dauer) in der Kniekehle (N. tibialis) ausgelöst und über Klebeelektroden, die über dem dem M. soleus befestigt wurden, abgeleitet. Die Fazilitation des H-Reflexes wurde durch Stimulation des N. femoralis distal des Leistenbandes mittels einer monopolaren Kugelelektrode erreicht (Rechteckimpuls 1 ms). Der Zeitabstand zwischen den Reizen wurde so gewählt, dass er innerhalb des vor Beginn der Messungen ermittelten Bereiches ausschließlich monosynaptischer Fazilitation liegt. Dieser Bereich umfasst die ersten 0.5 ms nach dem individuellen Beginn der Fazilitation [2]. Konditionierte (Stimulation N. tibialis und N. femoralis) und unkonditionierte (Stimulation ausschl. N. tibialis) Reize erfolgten in zufälliger Reihenfolge.

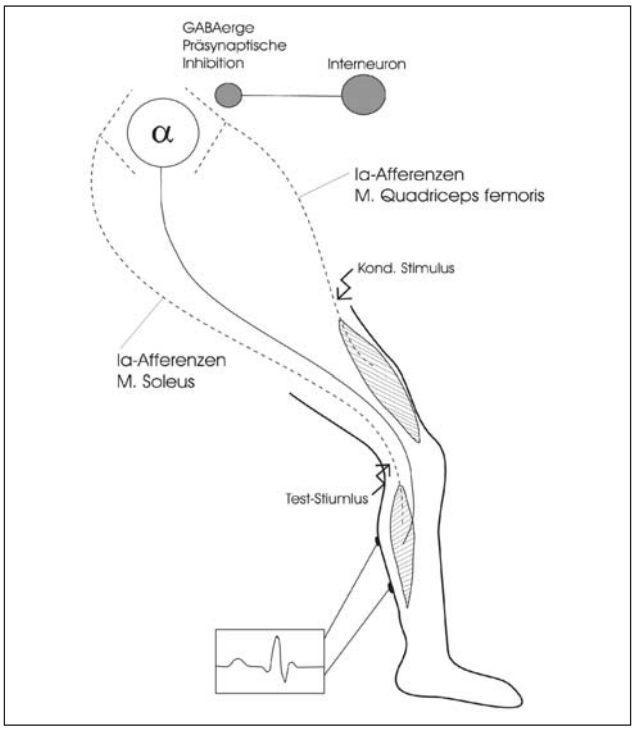


Abb. 1

Die Messungen wurden in drei Zuständen durchgeführt: a) vor, b) während und c) mindestens 35 Minuten nach Ende der Applikation des Anästhetikums (2. Kontrolle). Die Stimulationsstärke des H-Reflexes wurde so gewählt, dass die Reflexantwort des unkonditionierten Reflexes in den einzelnen Messungen jeweils ca. 15% der maximal elektrisch evozierten Muskelantwort betrug. In

jedem Zustand wurden jeweils mindestens 90 konditionierte und unkonditionierte Reize gemessen. Die Daten aus beiden Kontrollmessungen wurden zusammengelegt und mit den Anästhetikamessungen verglichen (T-test, Signifikanzniveau $p<0.05$).

### Ergebnisse

Abbildung 2 gibt die Ergebnisse aller Probanden wieder. Bei acht von zehn Probanden zeigte sich unter Sevofluran eine im Vergleich zu den Kontrollwerten signifikante Unterdrückung der H-Reflex-Fazilitation. Die maximal evozierbare H-Reflexamplitude war durchschnittlich um 34,9% unterdrückt.

### Interpretation

Die Ergebnisse zeigen, dass Sevofluran zu einer deutlichen Reduktion der hetoronymen Ia-Fazilitation führt. Da die postsynaptischen Einflüsse durch die Anpassung der unkonditionierten H-Reflexantwort konstant gehalten wurden, kann die Änderung überwiegend auf eine Zunahme präsynaptischer Inhibition zurückgeführt werden. Ursächlich kann für diesen Effekt eine Bindung von Sevofluran an $GABA_A$-Rezeptoren, die als Vermittler präsynaptischer Inhibition von Ia Afferenzen unter physiologischen Bedingungen identifiziert wurden [3], angenommen werden. Zur Festigung dieser Hypothese wurden die gleichen Messungen vorläufig an 6 Probanden unter 45% Lachgas durchgeführt. Dabei zeigte sich keine Änderung (<1%) der Ia-Fazilitation, obwohl die maximal evozierbare H-Reflexamplitude um 38,6% reduziert war. Diese Untersuchung verdeutlicht, dass afferente Information durch Sevofluran schon bei der ersten Verschaltung im Rückenmark gehemmt wird.

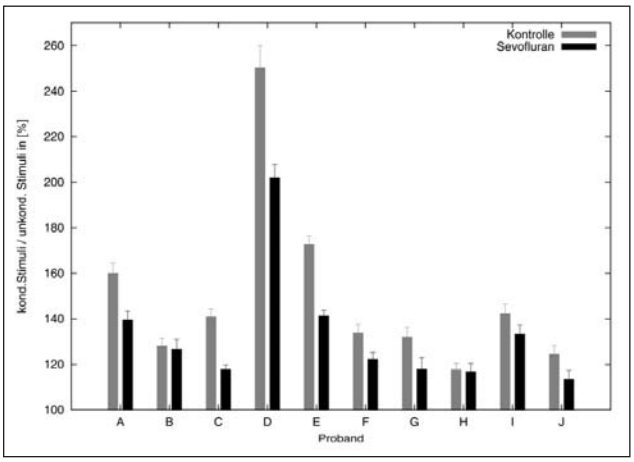


Abb. 2


### Literatur

1. **Haseneder R, Kurz J, Dodt HU, et al.** Isoflurane reduces glutamatergic transmission in neurons in the spinal cord superficial dorsal horn: evidence for a presynaptic site of an analgesic action. Anesth Analg 2004;98:1718-23.
2. **Hultborn H, Meunier S, Morin C, Pierrot-Deseilligny E.** Assessing changes in pre-synaptic inhibition of I a fibres: a study in man and the cat. J Physiol 1987;389:729-56.
3. **Todd AJ, Maxwell DJ.** GABA in the Mammalian Spinal Cord. In: Martin DL, Olsen RW (eds). GABA the View at Fifty Years. Philadelphia: Lippincott Williams &Wilkins;2000:439-57.


## Verbesserung der somatosensorischen Diskrimination bei kontralateraler Plexus-brachialis-Anästhesie


**E. Gaser**[1], **M. Rahming**[1], **Ch. Gaser**[2], **Th. Weiss**[3] und **W. Meissner**[1]

[1] Klinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie,
[2] Klinik für Psychiatrie,
Universitätsklinikum Jena, Friedrich-Schiller-Universität Jena
[3] Lehrstuhl für Biologische und Klinische Psychologie, Institut für Psychologie, Friedrich-Schiller-Universität Jena


### Fragestellung

Aus der Phantomschmerzforschung ist bekannt, dass der Verlust sensibler Afferenzen zu kortikalen Reorganisationsphänomenen führt. Solche Phänomene können jedoch auch nach temporären Deafferenzierungen – z.B. im Rahmen von Nervenblockaden – beobachtet werden. Relativ neu sind Erkenntnisse, dass es dabei auch zu funktionellen Veränderungen kommt. So konnte nach experimenteller sensibler Deafferenzierung eine Verbesserung der räumlichen Diskriminationsfähigkeit auf der ipsilateralen Körperregionen gezeigt werden [1,2]. In einer weiteren Arbeit wurden auch kontralaterale Veränderungen der Sensibilität beobachtet, allerdings erfolgte hier keine Regionalanästhesie, sondern eine ischämische Nervenblockade [3]. Bisher ist jedoch weder ein zeitlicher Verlauf dieser Effekte bekannt, noch wurde das Auftreten in der klinischen Praxis untersucht. Ziel dieser Arbeit war daher zu untersuchen, ob eine Regionalanästhesie des Plexus brachialis die Diskriminationsfähigkeit der kontralateralen Hand anders beeinflusst als eine Allgemeinanästhesie.

### Methodik

Wir untersuchten zehn handchirurgische Patienten mit einer Anästhesie des Plexus brachialis und sieben Patienten mit Allgemeinanästhesie einen Tag vor Operation (Tag 0), am Abend des Operationstages (Tag 1) und am ersten postoperativen Tag (Tag 2). Außerdem wurden sieben Probanden zu vergleichbaren Zeitpunkten untersucht, um Habituationseffekte erkennen zu können.

Die Grenzen der räumlichen Auflösung wurden mittels des „Grating Orientation Task“ (GOT) an der kontralateralen Hand gemessen. Dazu werden Stempel mit abnehmenden Rillenabständen in randomisierter Ausrichtung auf die Haut aufgesetzt. Der geringste Rillenabstand, der noch zu mindestens 75% korrekt erkannt wird, gilt als Diskriminationsschwelle [3].

### Ergebnisse

Bei allen zehn Patienten mit Plexus-brachialis-Anästhesie kam es zu einer Verbesserung der kontralateralen Diskriminationsfähigkeit am Abend des Operationstages ($p<0.00001$). Diese Verbesserung war auch im Vergleich zur Allgemeinanästhesie ($p<0.01$) und zu den Kontrollen ($p<0.001$) signifikant. Dagegen konnte weder bei den in Allgemeinanästhesie operierten Patienten noch bei den Probanden eine Veränderung beobachtet werden (Abb. 1).

### Interpretation

Es konnte erstmals gezeigt werden, dass die klinische Anwendung von Regionalanästhesie zu funktionellen Veränderungen der Diskriminationsfähigkeit außerhalb des deafferenzierten Bereiches führt. Das verwendete Versuchsdesign macht es wahrscheinlich, dass diese Beobachtung eine spezifische Folge zentraler Reorganisationsprozesse der Regionalanästhesie ist. Vor-

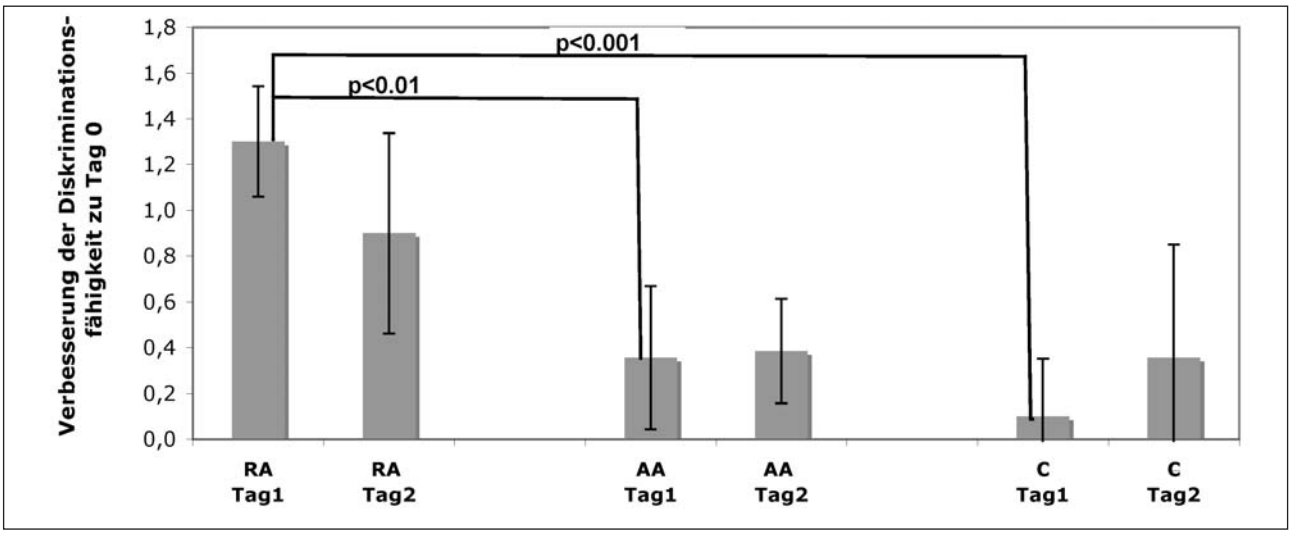


Abb. 1: Verbesserung der Diskriminationsfähigkeit an der kontralateralen Hand (in mm). Die Werte für Tag1 bzw. Tag2 sind jeweils als Differenz zu Tag0 angegeben. Von links nach rechts sind die Diskriminationsdifferenzen für Regionalanästhesie (RA), Allgemeinanästhesie (AA) und für die Kontrollgruppe (C) dargestellt. Es wurde eine Bonferronikorrektur vorgenommen.

stellbar wäre eine klinische Nutzung im Rahmen von Rehabilitationsprozessen.

### Literatur

1. **Weiss T, Miltner WH, Liepert J, Meissner W, Taub E.** Rapid functional plasticity in the primary somatomotor cortex and perceptual changes after nerve block. Eur J Neurosci 2004;20:3413-3423
2. **Bjorkman A, Rosen B, Lundborg G.** Acute improvement of hand sensibility after selective ipsilateral cutaneous forearm anaesthesia. Eur J Neurosci 2004; 20:2733-2736
3. **Werhahn KJ, Mortensen J, Van Boven RW, Zeuner KE, Cohen LG.** Enhanced tactile spatial acuity and cortical processing during acute hand deafferentation. Nat Neurosci 2002;5:936-938.

## Analgetische und antihyperalgetische Effekte von Tramadol und Paracetamol in einem experimentellen Schmerzmodell am Menschen

**J. Filitz, A. Tröster, W. Günther, H. Ihmsen** und **W. Koppert**
Anästhesiologische Klinik, Universitätsklinikum Erlangen, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

### Fragestellung

Die Kombination von Analgetika mit unterschiedlichen pharmakologischen Wirkansätzen ergibt oft eine höhere analgetische Effizienz bei gleichzeitig geringer ausgeprägten Nebenwirkungen [1]. Ziel dieser Studie war es, das schwach wirksame Opioid Tramadol und das Nichtopioid Paracetamol auf eine mögliche Additivität bezüglich der analgetischen und antihyperalgetischen Eigenschaften beider Substanzen in einem experimentellen Schmerzmodell am Menschen zu untersuchen [2].

### Methodik

Nach Zustimmung durch die Ethikkommission der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg wurden 20 gesunde Probanden (Alter: 27,2 ± 7,1 Jahre) in die Placebo-kontrollierte Doppelblindstudie im Crossover-Design eingeschlossen. Eine transkutane elektrische Stimulation mit hoher Stromdichte (29,6 ± 16,2 mA) induzierte einen Spontanschmerz, der auf einen Wert von 6 auf einer Skala von 0 bis 10 (Numerische Rating-Skala – NRS, 0 = kein Schmerz, 10 = stärkster vorstellbarer Schmerz) eingeregelt wurde. Gleichzeitig wurden dadurch stabile Hyperalgesieareale gegen mechanische Reize um die Stimulationsstelle herum erzeugt („Pinprick"-Hyperalgesie). Schmerzwerte und Hyperalgesieareale wurden vor, während und nach einer fünfzehnminütigen Infusion von Paracetamol (650 mg), Tramadol (75mg), einer Kombination beider Substanzen (325 mg Paracetamol + 37,5 mg Tramadol), oder 0,9%iger Kochsalzlösung (Placebo) über insgesamt 180 Minuten wiederholt bestimmt. Analgetische und antihyperalgetische Effekte wurden mittels ANOVA für Wiederholungsmessungen und Bonferroni-korrigierten Post-hoc-Testungen statistisch ausgewertet, ein Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ wurde als signifikant festgelegt.

### Ergebnisse

Tramadol führte zu einer maximalen Schmerzreduktion um 12% (NRS 3,7±0,3 vs. 4,3±0,2,MW±SEM) im Vergleich zur Placebo-Behandlung (Abb. 1A). Antihyperalgetische Effekte wurden nicht beobachtet (Abb. 1B). Im Gegensatz dazu führte Paracetamol zu einer geringeren Schmerzreduktion (8%; NRS 3,3±0,3 vs. 3,6±0,3, MW±SEM) bei deutlichen antihyperalgetischen Effekten (31%). Die Kombination beider Analgetika in jeweils halbierter Dosierung führte zu einer maximalen Schmerzreduktion von 14% (NRS 3,1±0,2 vs. 3,6±0,3 , MW±SEM; Abb. 1A) sowie zu einer Verstärkung der antihyperalgetischen Effekte von Paracetamol (Abb. 1B).

### Interpretation

Wir konnten in der vorliegenden Studie erstmals einen supra-additiven analgetischen Effekt von Tramadol und Paracetamol in einem experimentellen Schmerzmodell am Menschen nachweisen (Abb. 2). Die Schmerzreduktion fiel mit 14% für die untersuchten Dosierungen allerdings gering aus. Von größerer klinischer Relevanz erscheint die antihyperalgetische Wirkung der Kombination beider Analgetika, welche trotz fehlender Wirkung von Tramadol die antihyperalgetischen Effekte von Paracetamol verstärkt. Die Ergebnisse können daher als Rationale für den klinischen Einsatz der Kombination beider Medikamente dienen.

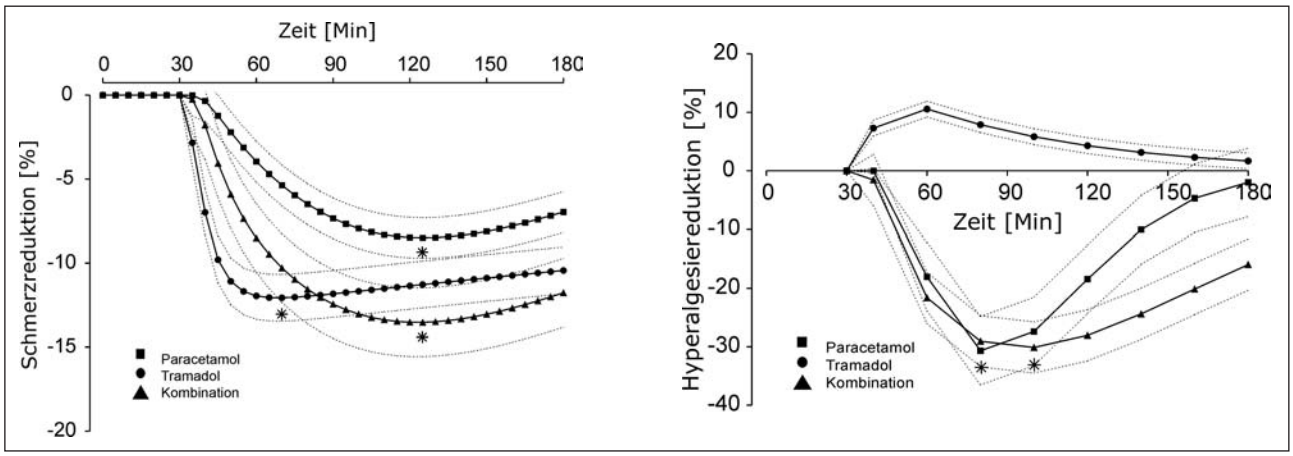


Abb. 1: Analgetische (A) und antihyperalgetische (B) Effekte von 650mg Paracetamol, 75mg Tramadol bzw. der Kombination aus 325mg Paracetamol + 37,5mg Tramadol (MW±SEM; *: signifikante maximale Reduktion versus Placebo, $p < 0,05$).

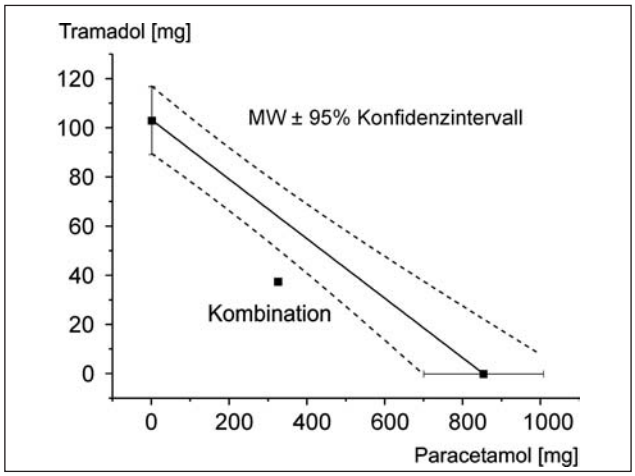


Abb. 2: Isobole für eine 14%ige Schmerzreduktion gegenüber Placebo.

**Literatur**

**1. Desmeules J, Rollason V, Piguet V, Dayer P.** Clinical pharmacology and rationale of analgesic combinations. European Journal of Anaesthesiology 2003;20 (Suppl 28):7-12.

**2. Koppert W, Dern SK, Sittl R, Albrecht S, Schüttler J, Schmelz M.** A New Model of Electrically Evoked Pain and Hyperalgesia in Human Skin. Anesthesiology 2001;95:395-402.

## Chemokininduzierte Antinozizeption durch Opioidfreisetzung aus polymorpho-nukleären Zellen bei Ratten: Intrazelluläre Lokalisation und Signalübertragungswege von in vitro zu in vivo

**H.L. Rittner***, **S. Mousa, D. Labuz, M. Schäfer, C. Stein** und **A. Brack**

Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin, Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin

### Fragestellung

In der frühen Entzündungsphase (z. B. nach Injektion von komplettem Freunds Adjuvans [CFA] in die Rattenpfote) wandern opioidhaltige polymorphonukleäre Zellen (PMN) in das Gewebe ein und sezernieren nach Stimulation Opioidpeptide [1]. Opioidpeptide wie β-Endorphin (END) und Met-Enkephalin (ENK) binden an Opioidrezeptoren auf peripheren sensorischen Neuronen und erzeugen eine lokale Antinozizeption. PMN-spezifische Chemokine wie CXCL2/3 (macrophage inflammatory protein-2) binden an den CXCR2-Rezeptor und regulieren die Einwanderung von opioidhaltigen PMN [2]. Die Rolle von Chemokinen in Schmerzentstehung bzw. -inhibition wird kontrovers diskutiert: Injektion von CXCL12 oder CXCL1 in nichtentzündetes Gewebe wirkt hyperalgetisch [3]. Dagegen führt die lokale Injektion von CXCL2/3 in CFA-entzündetes Gewebe zu einer opioidabhängigen Antinozizeption. In dieser Studie untersuchten wir: i) die intrazelluläre Lokalisation von Opioidpeptiden in Granula von PMN, ii) die Mechanismen der Signalübertragung bei CXCL2/3-induzierter Opioidpeptidsekretion in vitro und iii) PMN- und kalziumabhängige Antinozizeption nach Transfer allogener PMN in PMN-depletierte Ratten in vivo.

### Methodik

Peritoneale Ratten-PMN wurden 4 h nach intraperitonealer Injektion von 1% Glykogen gewonnen. Die intrazelluläre Lokalisation in Granula wurde durch konfokale Doppelimmunfluoreszenz nach Färbung mit granulaspezifischen Antikörpern kombiniert mit Anti-Opioidpeptidantikörpern analysiert. Für Sekretionsexperimente wurden PMN mit Kinase- oder Kalziuminhibitoren vorinkubiert, dann mit CXCL2/3 stimuliert und nach 7 min der Gehalt von END und ENK im Überstand mittels Radioimmunoassay gemessen. In vivo wurden PMN durch systemische Behandlung mit Anti-PMN-Serum (aPMN) depletiert und durch intraplantare (i.pl.) Injektion mit peritonealen PMN von allogenen Ratten rekonstituiert. Anschließend wurden mit dem Pfotendrucktest (PPT)

* Preisträgerin des Fresenius-Stipendiums 2006

Hyperalgesie und Antinozizeption gemessen. In einigen Experimenten wurden die allogenen PMN ex vivo mit einem intrazellulären Kalziumchelator 1,2-Bis(o-Aminophenoxy)Ethan-N,N,N´,N´-Tetraessigsäure Acetoxymethylester (BAPTA/AM) inkubiert.

**Ergebnisse**

Opioidpeptide wurden in primären azurophilen Granula von PMN detektiert. In sekundären, tertiären oder sekretorischen Granula waren keine Opioidpeptide nachweisbar. Sekretion von ENK und END nach Inkubation mit 1 mM CXCL2/3 ließ sich durch intrazelluläre Kalziumchelierung mit BAPTA/AM (Abb. A, CXCL2/3=karierter Balken, BAPTA + CXCL2/3=diagonal gestreifter Balken. *p<0,05, repeated measurement ANOVA, n=6-9, Mittelwert ±Standardfehler), nicht aber durch extrazelluläre Kalziumchelierung mit EDTA komplett hemmen. Blockade der Phosphoinositol-3-kinase mit LY294002 hemmte die CXCL2/3-induzierte Opioidpeptidfreisetzung partiell. Depletion von PMN führte zu einem Verlust der CXCL2/3-induzierten Antinozizeption (Abb. B, n=6, *p<0,05 ANOVA. Weißer Balken=basale Hyperalgesie, CXCL2/3 i.pl.=karierter Balken, graue Balken=Behandlung mit anti-PMN Serum. Mittelwert±Standardfehler). Diese ließ sich dosisabhängig durch i.pl. Injektion von allogenen PMN wiederherstellen (= quergestreifter Balken). Ex-vivo-Behandlung der allogenen PMN mit BAPTA/AM blockierte die CXCL2/3-induzierte Antinozizeption nach Zelltransfer (=diagonalgestreifter Balken).

**Interpretation**

Unter Entzündungsbedingungen wirken CXCR2-Liganden über eine Sekretion von Opioidpeptiden aus primären Granula von PMN antinozizeptiv. Die Sekretion ist ausschließlich abhängig von einer intrazellulären Kalziumfreisetzung und wird unterstützt durch Aktivierung der Phosphoinositol-3-kinase entsprechend den notwendigen Signalen für die Freisetzung primärer Granula. In vivo lässt sich der antinozizeptive Effekt in PMN-depletierten Ratten durch Injektion allogener PMN rekonstituieren, sofern intrazelluläres Kalzium mobilisiert werden kann. Unser Modell der Rekonstitution mit allogenen PMN erlaubt die Untersuchung von Signalwegen der Opioidpeptidfreisetzung aus Leukozyten ohne die Signalwege in anderen Zellen, z.B. sensorischen Neuronen, zu beeinflussen.

Gefördert durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (Klinische Forschergruppe 100/2).

**Literatur**

1. **Stein C, Schäfer M, Machelska H.** Attacking pain at its source: new perspectives on opioids. Nat Med 2003;9:1003-1008.
2. **Brack A, Rittner HL, Machelska H, Leder K, Mousa SA, Schäfer M, Stein C.** Control of inflammatory pain by chemokine-mediated recruitment of opioid-containing polymorphonuclear cells. Pain 2004;112:229-238.
3. **Rittner HL, Machelska H, Stein C.** Leukocytes in the regulation of pain and analgesia. J Leukoc Biol 2005;79:1215-1222.

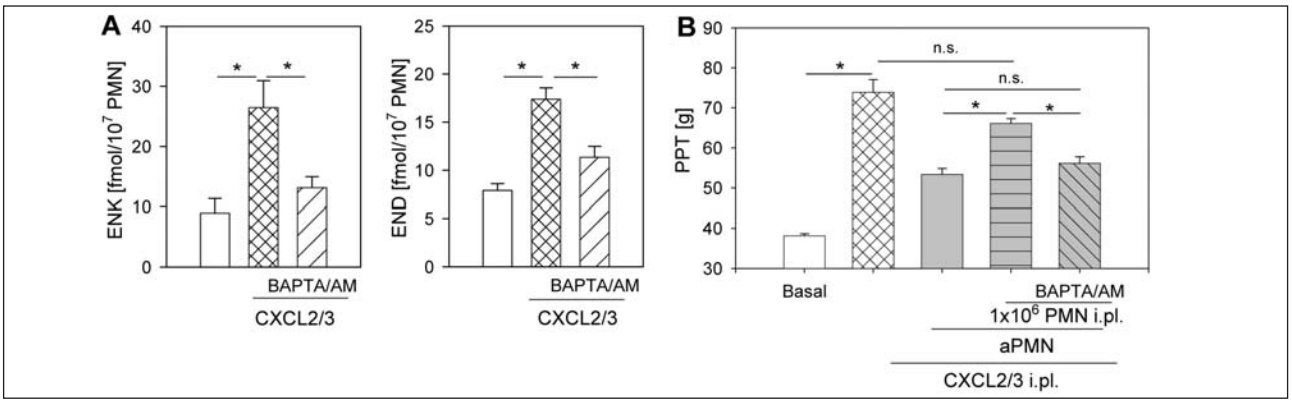


Abb. 1

## Kohlenmonoxid reduziert die Entzündungsantwort und die Caspase-Aktivität in der Lunge während des kardiopulmonalen Bypasses bei Schweinen

**U. Göbel**[1], **M. Siepe**[2], **P. Stein**[1], **R. Schmidt**[1], **H.L. Pahl**[1], **K. Geiger**[1], **C. Schlensak**[2] und **T. Loop**[1]
[1] Anaesthesiologische Universitätsklinik,
[2] Chirurgische Universitätsklinik, Abt. Herz- und Gefäßchirurgie, Universitätsklinikum Freiburg, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Br.

**Fragestellung**

Durch den kardiopulmonalen Bypass (CPB) wird eine systemische Entzündungsreaktion ausgelöst, die zu schweren Funktionsstörungen der Lunge führen kann und u.a. durch erhöhte Zytokinspiegel und Apoptose gekennzeichnet ist [1]. Da Kohlenmonoxid (CO) neben vasodilatativen Eigenschaften auch antiinflammatorische und antiapoptotische Wirkungen besitzt [2,3] wurde in dieser Studie der Einfluss einer Inhalation von CO auf die Bildung von Zytokinen und die Apoptose in der Lunge während des CPB beim Schwein in vivo untersucht.

**Methodik**

Nach Genehmigung des Regierungspräsidiums wurden Schweine der Deutschen Landrasse (30±1,5 kg) mit Fentanyl und Propofol anästhesiert, mit Cis-Atracurium relaxiert, kontrolliert beatmet ($FiO_2$ = 50%, PEEP = 5 cm $H_2O$, VT = 8 ml/kg, f = 14/min) und hämodynamisch überwacht (u.a. Swan-Ganz-Katheter). Die Tiere wurden in zwei Gruppen randomisiert: Kardiopulmonaler Bypass: CPB (n=7); kardiopulmonaler Bypass und Inhalation von CO: CPB+CO (n=7). Beide CPB Gruppen wurden 2 h an die Herz-/Lungenmaschine (Stöckert, München) angeschlossen und weitere 2 h beobachtet. In Gruppe CPB+CO erfolgte nach Intubation die Inhalation von CO (250 ppm) für eine Stunde vor Beginn der EKZ. Zu den Messzeitpunkten (Ausgangswert, 10 min + 120 min CPB, 15, 60 + 120 min post CPB) wurden neben Blutgasanalysen Gewebeproben der Lunge entnommen. Die Analyse des nukleären Faktors κB (NF-κB) und des Aktivator Protein-1 (AP-1) erfolgte mittels „Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)“. Die mRNA- und Proteinexpression der Zytokine IL-1, IL-6, IL-10 und TNF-α wurde durch Northern Blot – Technik und „Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)“ ermittelt. Die Caspase-3-Aktivität wurde mit einem fluorogenen Assay quantifiziert (Ac-DEVD-AMC-Substrat). Die Ergebnisse wurden durch Varianzanalyse

(ANOVA mit Holm-Sidak-Post-Hoc-Test, Signifikanzniveau p<0,05; Mittelwert±SD) verglichen.

### Ergebnisse

Die Parameter der Hämodynamik (MAD, HF, mPAD und HZV) und der Blutgasanalysen ($PaO_2$, $PaCO_2$ und pH) zeigten geringe Unterschiede zwischen den Gruppen. CO aktivierte NF-κB und AP-1 (Abb. 1). Die mRNA-Expression von IL-1, IL-6 und TNF-α war in der CPB+CO Gruppe niedriger, die von IL-10 höher als in der CPB Gruppe (Abb. 1). Die Proteinexpression der proinflammatorischen Zytokine in der CPB-Gruppe war zu verschiedenen Messzeitpunkten sowohl während des CPB (TNF-α, IL-6) als auch nach deren Beendigung (IL-1, IL-6) im Vergleich zur CPB+CO Gruppe erhöht. Die Expression von IL-10 war in der CPB+CO Gruppe in der Post-CPB-Zeit höher als in der CPB-Gruppe, während die Caspase-3-Aktivität in der CPB+CO-Gruppe niedriger war (Tab. 1).

### Interpretation

Die durch den CPB induzierte proinflammatorische Aktivierung und Apoptose in der Lunge wird durch die Inhalation von CO unterdrückt. Aufgrund der bekannten antiapoptotischen Rolle von NF-κB und AP-1 und der verminderten Caspase-Aktivität könnte der möglicherweise protektive Effekt von CO über diesen Signaltransduktionsweg vermittelt sein [2].


### Literatur

1. **Brix-Christensen V et al.** Acta Anaesthesiol Scand 2001;45:671-679.
2. **Otterbein LE et al.** Nat Med 2000;6:422-428
3. **Lavitrano M et al.** FASEB J 2004;18(10):1093-1095.


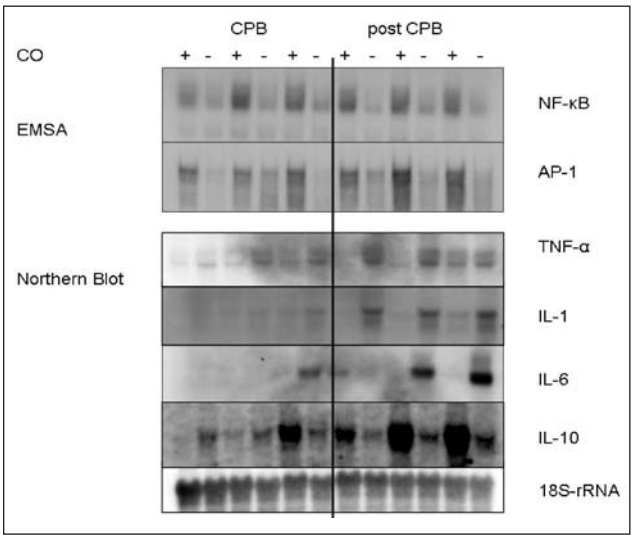


Abb. 1: Abb. 1: NF-κB und AP-1 EMSA sowie Northern Blot von TNF-α, IL-1, IL-6 und IL-10.

Dieses Projekt wird durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft unterstützt (Sachbeihilfe SCHL 604/1-1).

Tab. 1: Proteinexpression von TNF-α, IL-1, IL-6, IL-10 [pg/ml] und Caspase Aktivität [RFU]

| | Prä CPB | | 10 min CPB | | 120 min CPB | | 15 min post CPB | | 60 min post CPB | | 120 min post CPB | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | CO | CPB | CO | CPB | CO | CPB | CO | CPB | CO | CPB | CO | CPB |
| TNF-α | 298±27 | 289±78 | 316±45 | 482±66* | 438±163 | 647±119 | 475±130 | 657±176 | 366±119 | 673±134* | 474±82 | 868±94* |
| IL-1 | 249±87 | 147±88 | 238±65 | 188±68 | 212±34 | 152±70 | 254±30 | 263±276 | 340±70 | 488±276 | 278±75 | 1591±90* |
| IL-6 | 121±27 | 125±37 | 98±19 | 180±40 | 118±19 | 1072±72* | 122±49 | 378±90* | 151±47 | 360±63 | 279±156 | 898±61* |
| IL-10 | 95±32 | 54±70 | 146±22 | 66±22 | 131±90 | 58±23 | 188±100 | 64±27 | 313±57* | 61±73 | 594±143* | 69±18 |
| Caspase | 400±80 | 420±160 | 400±90 | 440±130 | 460±80 | 550±140 | 460±90 | 760±140* | 330±60 | 720±140* | 380±140 | 810±170* |

* = p<0,05 im Vergleich der Gruppen.

## Intraalveoläre Proteasomaktivität und Albuminabbau bei Patienten mit ARDS

**S.U. Sixt**[1], **M. Adamzik**[1], **J. Hakenbeck**[1], **D. Spyrka**[1], **B. Saul**[1], **M. Beiderlinden**[1], **H.P. Jennissen**[2] und **J. Peters**[1]

[1] Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin,
[2] Institut für Physiologische Chemie,
Universitätsklinikum Essen, Universität Duisburg-Essen

### Fragestellung

Im Mittelpunkt der Pathophysiologie des acute respiratory distress syndrom (ARDS) [1] stehen primär oder sekundär geschädigte Alveolen, die am Gasaustausch nicht oder nur eingeschränkt teilnehmen und durch hyaline Membranen obstruiert sind. Demgegenüber finden sich bei Überlebenden nach Ablauf eines Jahres vergleichsweise geringe histologische und lungenfunktionsanalytische pathologische Veränderungen [2]. Demzufolge gibt es also wirksame, bislang weitgehend unbekannte pulmonale Reparaturmechanismen, die die Reversibilität des ARDS vermitteln. Eigene Ergebnisse bei Lungengesunden lassen vermuten, dass extrazelluläres, biologisch aktives 20S-Proteasom am Abbau intraalveolärer Proteine beteiligt ist. Wir testeten daher die These, dass das Proteasom-System [3] im Alveolarraum bei Patienten mit ARDS biologisch aktiv und am Proteinabbau beteiligt ist.

### Methodik

Nach Billigung der Ethikkommission wurde bei 48 ARDS-Patienten (lung injury score: 3.25±0.6, $PaO_2/FiO_2$: 153±82, PEEP: 17±5 mbar) eine bronchoalveoläre Lavage (BAL) (Proteingehalt im BAL-Überstand: 1.63±1.89 mg/ml, LDH im BAL-Überstand: 748±844 U/l) gewonnen. Lungengesunde dienten als Kontrollpopulation (n=8). BAL-Überstand und Zellpellet wurden mittels radioaktiv markiertem $I^{125}$ Albumin und fluorogener Peptidsubstrate [BZ-VGR-AMC (tryptische Aktivität), Suc-LLVY-AMC (chymotryptische Aktivität) sowie Suc-LLE-AMC (Caspase-ähnliche Aktivität)], entsprechend den drei bekannten Proteasom-Einzelaktivitäten, ohne und mit spezifischem Proteasominhibitor (Epoxomicin) auf Proteasomaktivität getestet (Spektralphotometrie). Mittels Western-Blot und 20S-Proteasom-Antikörpern wurde zudem auf das Vorhandensein von Proteasom-Antigen getestet. Eine Molekulargewichtsanalyse erfolgte mittels Gelfiltration. Statistik: Mittelwert ± σ, box-plots, t-Test für unverbundene Stichproben.

Ergebnisse: Bei allen ARDS-Patienten konnten die drei proteasom-spezifischen Enzymaktivitäten für das 20S Proteasom nachgewiesen und durch Epoxomicin signifikant inhibiert werden (Abb. 1). Die Hauptenzymaktivität fand sich im BAL-Überstand und korrelierte nicht mit Markern für Zellschaden. ARDS-Patienten zeigten jedoch im Vergleich zu Lungengesunden hoch signifikant (p=0.0014) erniedrigte Enzymaktivitäten. Vergleicht man die Gruppe der Überlebenden mit der der Verstorbenen, so zeigen Verstorbene signifikant erniedrigte Enzymaktivitäten für die tryptische (p=0.021) und caspaseähnliche Enzymaktivität (p=0.019). Des Weiteren ist der Albuminabbau im BAL-Überstand bei ARDS-Patienten (0.42±0.42 U/mg) im Gegensatz zu Lungengesunden (2.76±10.64 U/mg) signifikant herabgesetzt (p=0.0017). Die Hauptproteinbanden des Proteasoms (20kDa-30kDa) konnten im Western-Blot bei allen ARDS-Patienten im BAL-Überstand nachgewiesen werden. Das native Molekulargewicht betrug 660 kDa, entsprechend dem Molekulargewicht von 20S-Proteasom (700 kDa).

### Interpretation

Unsere Untersuchungen weisen erstmals im Alveolaraum von ARDS-Patienten sowohl proteasom-spezifische Proteolyseaktivität als auch das Proteasom selbst nach. Hierbei handelt es sich um das 20S-Proteasom. Da sowohl die Enzymaktivitäten als auch die Proteolyseaktivität für Albumin in vitro im Vergleich zu Lungengesunden signifikant vermindert ist, scheint der alveoläre Proteinabbau bei ARDS jedenfalls in der Akutphase vermindert. Da das Proteasom maßgeblich am Abbau von Albumin alveolär beteiligt ist, könnte deshalb auch der intraalveoläre onkotische Druck bei ARDS erhöht sein. Alle Faktoren mögen Einfluß auf das Überleben von ARDS-Patienten nehmen.

### Literatur


1. **Ware LB, et al.** The acute respiratory distress syndrome. N Engl J Med 2000;342:1334-1349.
2. **Rubenfeld GD, et al.** Incidence and outcomes of acute lung injury. N Engl J Med 2005;353:1685-1693.
3. **Ciechanover A, et al.** The ubiquitin system: from basic mechanisms to the patient bed. IUBMB Life 2004;56:193-201.


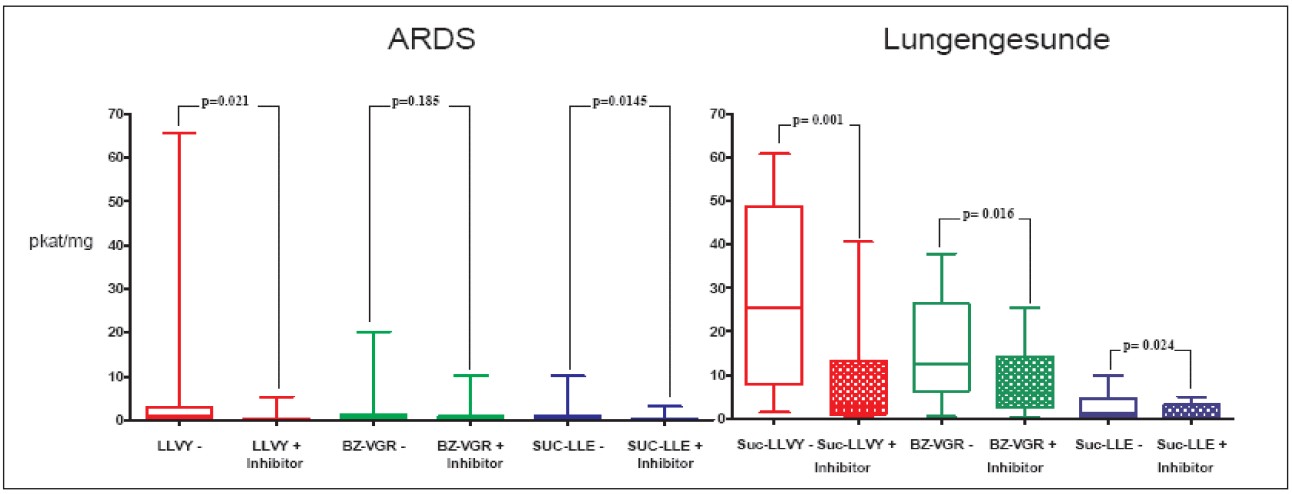


Abb. 1: Enzymaktivitäten bei Lungengesunden und ARDS-Patienten im BAL-Überstand.

## Intravital-Videoendoskopie alveolären Lungengewebes: Ein neuartiges Verfahren zur Visualisierung des dynamischen Verhaltens der Alveolen unter Beatmung


**C.A. Stahl[1], S. Schumann[1], H. Knorpp[1], M. Schneider[1], K. Möller[2], K. Geiger[1] und J. Guttmann[1]**

[1] Anaesthesiologische Universitätsklinik, Universitätsklinikum Freiburg, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Br.

[2] Biomedical Engineering, Hochschule Furtwangen, Campus Villingen-Schwenningen


### Fragestellung

Aus computertomographischen Untersuchungen ist bekannt, dass die pathologischen Veränderungen beim akuten Lungenversagen inhomogen über die Lunge verteilt sind. Atelektasen, Rekrutierung und alveoläre Überdehnung finden in der Lunge zwar simultan, aber räumlich getrennt statt. Im Sinne einer individuellen lungenprotektiven Beatmung bietet die Analyse der dynamischen Atemmechanik viel versprechende Ansätze [Guttmann 1994,Stahl 2006]. Das respiratorische Monitoring erfasst jedoch nur globale Eigenschaften des respiratorischen Systems, während eine räumliche Zuordnung nicht möglich ist. Ziel dieses Projektes war die Entwicklung eines experimentellen Verfahrens, mit dem das dynamische Alveolarverhalten unter Beatmung mit modernen atemmechanischen Analyseverfahren in Beziehung gesetzt werden kann.

Methodik: Gemeinsam mit der Firma Schölly GmbH (Denzlingen) entwickelten wir ein starres Endoskop (Durchmesser incl. Lichtleiter 2,7 mm) zur endoskopischen Alveolarmikroskopie. Um zu verhindern, dass die beobachteten Alveolen durch die Spitze des Endoskops deformiert werden, entwickelten wir einen Saug-Spül-Katheter, der einen dünnen Flüssigkeitsfilm zwischen Endoskopspitze und den subpleuralen Alveolen im Focus des Endoskops erzeugt und aufrecht erhält, ohne den lokalen Pleuradruck zu verändern. Durch den geringen Durchmesser des Endoskops gelingt das Einführen im Rahmen einer minimal invasiven Thorakotomie sogar beim Kleintier ohne Eröffnung des Thorax. Das System wurde in Verbindung mit der Analyse der dynamischen Atemmechanik (SLICE-Methode) an Ratten nach pulmonaler Lavage evaluiert.

### Ergebnisse

Abbildung 1 zeigt einen Ausschnitt des Lungengewebes nach Lavage mit NaCl von etwa 0,8 mm Durchmesser. Jedes vierte Bild der Filmsequenz ist dargestellt (obere Reihe: Inspiration; unte-

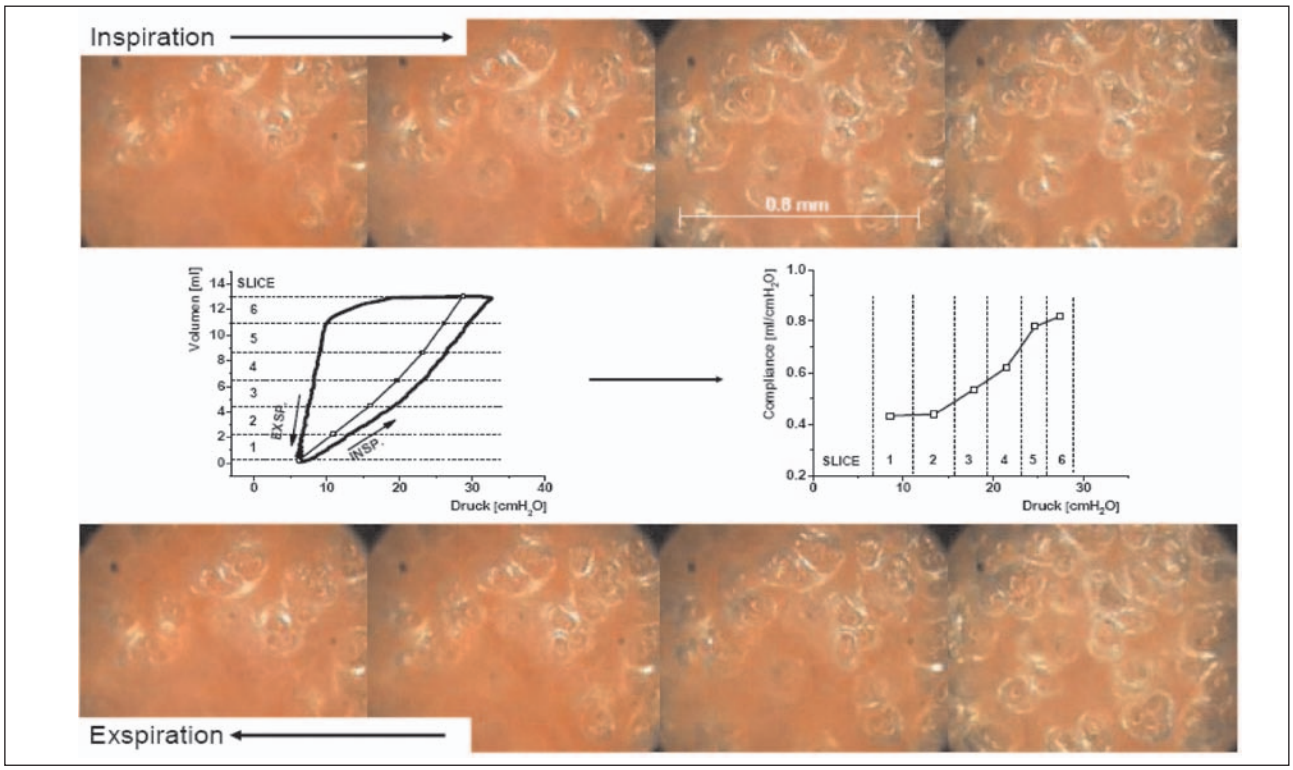


Abb. 1: Endoskopisch gewonnene Intravital-Videoendoskopie-Sequenz. Oben: Inspiration; unten: Exspiration; Mitte: dynamische Druck-Volumen-Schleife und Analyse der intratidalen Compliance.

re Reihe: Exspiration). Zwischen den in- und exspiratorischen Bild-Sequenzen ist die dynamische Druck-Volumen-Beziehung des analysierten Atemzugs dargestellt.

### Interpretation

Die vorgestellte Technik ermöglicht - Im Gegensatz zu herkömmlichen Methoden [Steinberg 2004] - mikroskopische Filmaufnahmen subpleuraler Alveolen auf minimal invasivem Weg ohne großflächige Eröffnung des Thorax. Durch die gleichzeitige Analyse von dynamischem Alveolarverhalten und dynamischer Atemmechanik ist es nun möglich, die Kopplung zwischen globalen mechanischen Eigenschaften (im Rahmen des respiratorischen Monitorings) und dem lokalen Verhalten einzelner Alveolen in vivo zu erforschen.

### Literatur

1. **Guttmann, J., L. Eberhard, B. Fabry, D. Zappe, H. Bernhard, L. Lichtwarck-Aschoff, M. Adolph, and G. Wolff.** Determination of volume-dependent respiratory system mechanics in mechanically ventilated patients using the new SLICE method. Technol and Health Care 1994;2: 175-91.
2. **Stahl, C.A., K. Möller, S. Schumann, R. Kuhlen, M. Sydow, C. Putensen, and J. Guttmann.** Dynamic versus Static Respiratory Mechanics in Acute Lung Injury and Acute Respiratory Distress Syndrome. Crit Care Med in revision.
3. **Steinberg, J.M., H.J. Schiller, J.M. Halter, L.A. Gatto, H.M. Lee, L.A. Pavone, and G.F. Nieman.** Alveolar instability causes early ventilator-induced lung injury independent of neutrophils. Am J Respir Crit Care Med 2004;169(1):57-63.

## Quantifizierung von Ventilation und Alveolarrekrutierung mittels $^3$Helium-MRT im Tierexperiment

**A. Herweling**[1], **K. Gast**[2], **J. Schmiedeskamp**[3], **B. Eberle**[1] und **K. Markstaller**[1]
[1] Klinik für Anästhesiologie,
[2] Klinik und Poliklinik für diagnostische und interventionelle Radiologie,
Klinikum der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
[3] Institut für Physik,
Klinikum der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

### Fragestellung

Die Magnetresonanztomographie der Lunge mit laserpolarisiertem $^3$Helium ($^3$He-MRT) ermöglicht eine hochauflösende Ventilationsanalyse und eine dreidimensionale Rekonstruktion des Lungenvolumens [1]. Bisher wurde sie zur Detektion regionaler Ventilationsdefekte bei verschiedenen Krankheitsbildern (COPD, Asthma) angewandt [2], allerdings nicht beim akuten Lungenversagen. Bei akutem Lungenversagen ist derzeit umstritten, ob eine Minderbelüftung auf einen atemzyklischen Alveolarkollaps oder auf Flüssigkeitsverschiebungen im Lungenparenchym zurückzuführen ist.

Da die $^3$He-MRT in der Lage ist, ventilierte Alveolargebiete mit hoher Zeit- und Ortsauflösung darzustellen, soll mit Hilfe dieser Technik eine komplette Derekrutierung und Rekrutierung der Lunge bei unterschiedlichen PEEP-Niveaus im Sinne eines kompletten Alveolarkollapses nachgewiesen werden.

### Methodik

Zum Vergleich von nativem mit geschädigtem Lungenparenchym wurde mit Genehmigung der örtlichen Tierschutzkommission

in 7 anästhesierten Schweinen (15-16kg) eine einseitige Lungenschädigung durch repetitive Lavagen der rechten Lunge induziert. Die einseitige Lungenschädigung wurde anschliessend mittels Protonen-MRT und Spiral-CT verifiziert. Mittels der $^3$He-MRT-Technik (Inhalation von 4 ml/kg Bolus von 60% polarisierten $^3$He und zweidimensionaler FLASH-Sequenz während inspiratorischem Atemanhalt) wurde das totale ventilierte Lungenvolumen bei einem PEEP von 0 mbar und, nach einem Rekrutierungsmanöver, von 10 mbar bestimmt. Anhand einer dreidimensionalen Rekonstruktion der $^3$He-Bilder wurde die Auswertung jeweils für die native und die geschädigte Lunge vorgenommen. Die anteilmässige Zunahme des belüfteten Volumens der nativen und der geschädigten Lunge durch die PEEP-Erhöhung wurde statistisch verglichen (Median [min, max]; nichtparametrischer Test, Signifikanzniveau $p < 0{,}05$).

### Ergebnisse

Konventionelles Protonen-MRT und Spiral-CT zeigten Atelektasen hauptsächlich in basalen Lungenbereichen. Die Ventilation konnte mit hoher regionaler Auflösung in den dreidimensionalen $^3$He-Bildern visualisiert werden. Die Ventilationsdefekte der lavagierten Lunge stimmten mit der regionalen Verteilung der Atelektasen im Protonen-MRT und der CT überein. Nach Rekrutierung und PEEP-Erhöhung nahm der belüftete Alveolarbereich in beiden Lungen signifikant zu (native Lungen: von 415 [270-445] ml auf 481 [347-523] ml ($p = 0{,}016$); geschädigte Lungen: von 264 [71-424] ml auf 424 [129-520] ml ($p = 0{,}016$)). Die anteilmässige Volumenzunahme in den geschädigten Lungen war signifikant höher als in den nativen Lungen (nativ: 17 [11-38] % vs. Lavage: 42 [14-90] % ($p < 0{,}05$)).

### Interpretation

Erstmalig konnten mittels der $^3$He-MRT regionale Ventilationsdefekte bei akutem Lungenversagen gezeigt und eine Lungenrekrutierung regional quantifiziert werden. Diese Ergebnisse zeigen einen kompletten Alveolarkollaps bei induziertem Surfactantmangel. Weitere Studien sind notwendig, um den Nutzen der $^3$He-MRT zur frühzeitigen Diagnostik eines Surfactantmangels oder einer Surfactantstörung abzuschätzen.

### Literatur


1. **Markstaller K, Kauczor HU, Puderbach M, Mayer E, Viallon M, Gast K, Weiler N, Thelen M, Eberle B.** $^3$He-MRI-based vs. conventional determination of lung volumes in patients after unilateral lung transplantation: a new approach to regional spirometry. Acta Anaesthesiol Scand 2002;46:845-52.
2. **Kauczor HU, Chen XJ, van Beek EJ, Schreiber WG.** Pulmonary ventilation imaged by magnetic resonance: at the doorstep of clinical application. Eur Respir J 2001;17:1008-23.


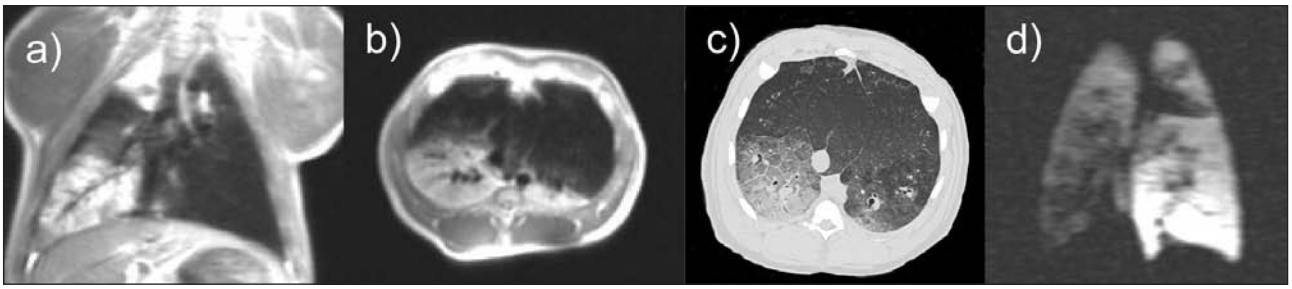


Abb. 1: Beispiel: Native (links) und geschädigte (rechts) Lunge: (a,b) im konventionellen Protonen-MRT zeigen sich die geschädigten Lungenbereiche durch ein hyperdenses Signal; (c) in der CT zeigen sich die geschädigten Lungenbereiche durch eine Dichtezunahme; (d) Die $^3$He-MR Bilder zeigen ein wesentlich stärkeres Signal in der nativen Lunge im Vergleich zu geschädigten Lungenbereichen. Die native Lunge erscheint homogen, in der geschädigten Lunge zeigen sich komplette Ventilationsdefekte vornehmlich in den basalen Lungenregionen.

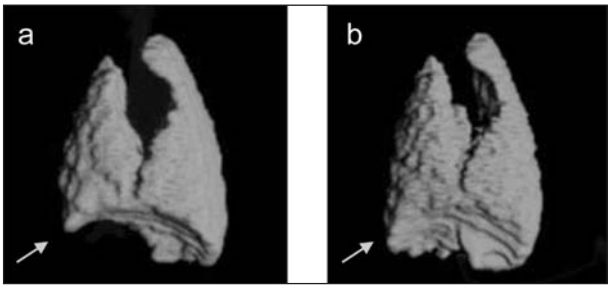


Abb. 2: $^3$He-MR-basierte 3D-Rekonstruktion von ventiliertem Lungengewebe: (a) PEEP von 0 mbar: Komplette Ventilationsdefekte in den rechten posterobasalen Bereichen; (b) PEEP von 10 mbar: Die Rekrutierung der Atelektasen zeigt sich durch einen Signalanstieg im selben Bereich (siehe Pfeil).

© Anästh Intensivmed 2006;47:387-426 DIOmed Gesellschaft mit beschränkter Haftung

## Endothelin-1 reduziert die alveoläre Flüssigkeitsrückresorption und beschleunigt die Bildung von Lungenödemen unter Normoxie und Hypoxie bei der Ratte

**M.M. Berger**[1,2], **C. Schieber**[2], **M. Dehler**[2], **S. Rozendahl**[2], **H.J. Bardenheuer**[1], **P. Bärtsch**[2] und **H. Mairbäurl**[2]
[1] Klinik für Anaesthesiologie,
[2] Abteilung Innere Medizin VII, Sportmedizin,
Universitätsklinikum Heidelberg, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

### Fragestellung

Endothelin-1 (ET-1) ist für die Regelung des pulmonalen Vasotonus von Bedeutung und wird als wichtiger pathogenetischer Faktor für die Bildung von Lungenödemen diskutiert. Da ET-1-Plasmaspiegel in Hypoxie erhöht sind, könnte ET-1 auch eine zentrale Position bei der Bildung Hypoxie-induzierter Lungenödeme einnehmen. In dieser Studie wurde untersucht, welche Mechanismen (pulmonaler Kapillardruck, alveoläre Permeabilität, alveoläre Flüssigkeitsrückresorption) der ET-1-induzierten Lungenödembildung zugrunde liegen und ob Hypoxie die Effekte von ET-1 auf die Lungenödementstehung beeinflusst.

### Methodik

Effekte von ET-1 ($10^{-7}$ M) auf die alveoläre Flüssigkeitsrückresorption wurden an männlichen Sprague-Dawley-Ratten (Gewicht 220 - 250 g, Thiopentalnarkose) nach intratrachealer Flüssigkeitsinstillation (2,5 ml) in situ untersucht. Um Effekte auf den transepithelialen Natrium (Na) - Transport zu erfassen, wurde dem Instillat Amilorid ($10^{-4}$ M) hinzugefügt. Nach 30 Minuten wurde die Albumin-Konzentration im Instillat als Marker der alveolären Flüssigkeitsverschiebung bestimmt. Um zugrunde liegende Mechanismen zu differenzieren, wurden an der isoliert ventilierten und perfundierten Rattenlunge die Versuche zur alveolären Flüssigkeitsrückresorption (mit 4 µg/ml FITC-Dextran als alveolären Marker) in Normoxie und Hypoxie (1,5% $O_2$) wiederholt und durch Messungen des Kapillardrucks (Double-Okklusion-Methode) und der alveolären Permeabilität (Übertritt von Albumin aus dem Perfusat in den Alveolarraum; Nachweis mittels Bradford-Assay nach bronchoalveolärer Lavage) ergänzt. Weiterhin wurde mittels kontinuierlicher Gewichtsmessung untersucht, ob ET-1 (0,3nM) und Hypoxie die Ödembildung in der isolierten, druckkonstant perfundierten und ventilierten Lunge beschleunigen und die Lebensdauer verkürzen. Um direkte von indirekten ET-1-Effekten auf den transepithelialen Na- und Wasser-Transport zu unterscheiden, wurde an kultivierten, primären Typ-II-Alveolarepithelzellen in der Ussing-Kammer der Einfluss von ET-1 ($10^{-11}$ - $10^{-5}$ M) auf den Kurzschlussstrom bestimmt. Sämtliche Versuche erfolgten nach Zustimmung der örtlichen Tierschutzkommission. Statistik: One Way ANOVA mit Student-Newman-Keul-Post-Hoc Test. Signifikanzniveau: $P < 0,05$. Ergebnisse sind als MW ± SE angegeben.

### Ergebnisse

Die Rate der alveolären Flüssigkeitsrückresorption betrug in Nomoxie 18% (in situ; Abb. 1) bzw. 20,1±7,7% (isolierte Lunge). Sowohl ET-1 als auch Amilorid führten zu einer Reduktion der alveolären Flüssigkeitsresorption ($P<0,05$; Abb. 1). In der isolierten Lunge beschleunigten ET-1 und Hypoxie die Ödembildung ($P<0,001$; Abb. 2) und verkürzten die durchschnittliche Lebensdauer ($P<0,001$ bzw. $P=0,002$; Abb. 3). Beide Effekte wurden durch die Kombination von ET-1 und Hypoxie verstärkt ($P<0,001$). ET-1 reduzierte den Perfusionsfluss und erhöhte den Kapillardruck (P jeweils <0,001; Abb. 4) in Normoxie und Hypoxie etwa gleichstark.

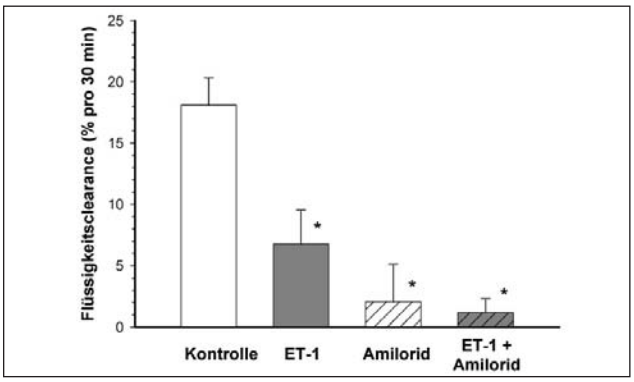


Abb. 1: Alveoläre Flüssigkeitsresorption in Normoxie (n = 6-11).

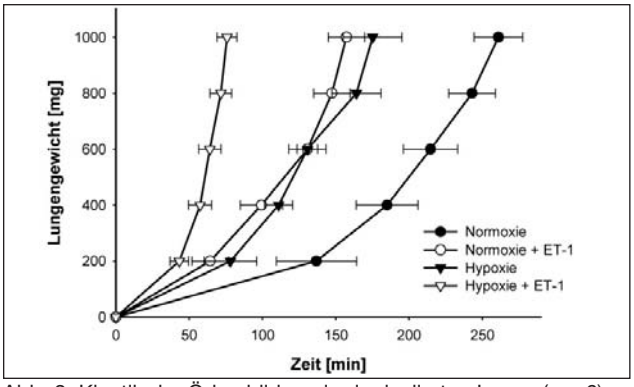


Abb. 2: Kinetik der Ödembildung in der isolierten Lunge (n = 6).

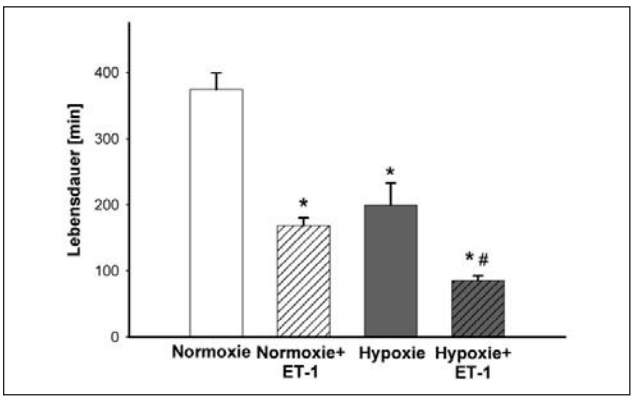


Abb. 3: Lebensdauer der isolierten Lunge (n = 6).

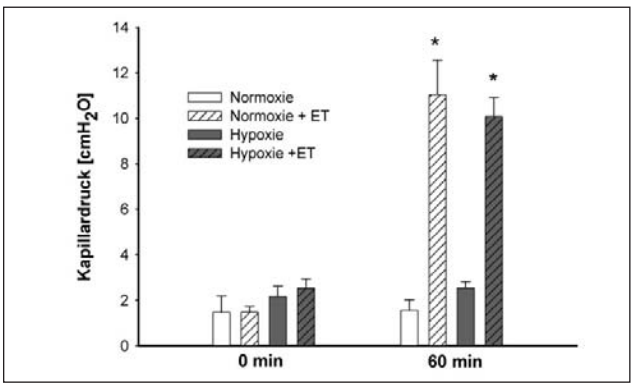


Abb. 4: Kapillardrücke zu Beginn (0 min) und nach 60 min (n = 4-6).

Die Albumin-Konzentration im Instillat wurde in der isolierten Lunge durch ET-1 bzw. Hypoxie nicht verändert. Die Kombination beider Faktoren führte zu einer 5-fachen Erhöhung der Albumin-Konzentration ($p<0,05$). Die Ussingkammer-Experimente zeigten, dass ET-1 auf den transepithelialen Ionentransport kultivierter Typ-II-Alveolarzellen keinen Einfluss hatte.

### Interpretation

Die Ergebnisse zeigen erstmals, dass ET-1 über indirekte Mechanismen zu einer Hemmung der alveolären Na- und Flüssigkeitsrückresorption führt. Die beschleunigte Ödembildung unter ET-1 dürfte weiterhin auf eine Erhöhung des pulmonalen Kapillardruckes und, zumindest in Kombination mit Hypoxie, auf eine erhöhte alveoläre Permeabilität für Makromoleküle zurückzuführen sein. ■

## Charakterisierung des humanen Gq-Promotors und Auswirkung veränderter Expression auf das kardiovaskuläre System

**U.H. Frey**[1,2], **D. Savidou**[2], **J. Nürnberger**[3], **M. Adamzik**[1], **H. Jakob**[4], **I. Manthey**[2], **J. Peters**[1] und **W. Siffert**[2]

[1] Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin,
[2] Institut für Pharmakogenetik,
[3] Zentrum für Innere Medizin,
[4] Klinik für Thorax- und Kardiovaskuläre Chirurgie,
Universitätsklinikum Essen, Universität Duisburg-Essen

### Fragestellung

G-Proteine sind wichtige Vermittler der intrazellulären Signaltransduktion. Zu den an Gq-Untereinheiten koppelnden Rezeptoren zählen AT1-, $\alpha$1- und $ET_A$-Rezeptoren, deren Stimulation zur Aktivierung der Phospholipase C und damit zu einem Anstieg der intrazellulären $Ca^{2+}$-Konzentration führt [1]. Bei transgenen Mäusen führt Gq-Überexpression zu kardialer Hypertrophie, Apoptose und Herzinsuffizienz [2]. Beim Menschen liegen bislang keine Daten über die Auswirkungen veränderter endogener Gq-Expression vor. Da diese zum einen durch Transaktivierung essentieller Promotorlemente reguliert wird, zum anderen durch funktionelle Promotor-Polymorphismen beeinflusst werden kann, war das Ziel unserer Arbeit: 1. Klonierung des Gq-Promotors zur Untersuchung der transkriptionellen Kontrolle, 2. Sequenzierung des Promotors zur Identifikation von Polymorphismen, welche potentiell die endogene Gq-Expression beeinflussen, 3. Untersuchung funktioneller Auswirkungen veränderter Gq-Expression beim Menschen.

### Methodik

Der extrem GC-reiche Promotor (83.3%) wurde mit Hilfe der Slowdown-PCR-Technik amplifiziert und sequenziert [3]. Genotypen des GC(-694/695)TT Polymorphismus wurden durch Restriktionsanalyse bestimmt. Nach Zustimmung der Ethikkomission wurde intrazelluläres Calcium ($[Ca^{2+}]_i$) in kultivierten Hautfibroblasten von 13 verschiedenen Individuen spektrofluorometrisch bestimmt. Für Western-Blot-Untersuchungen wurden Zellmembranen rechter Herzohren von 38 Patienten mit koronarer Herzkrankheit präpariert und die Gq-Expression densitometrisch quantifiziert. Die relative mRNA-Quantifizierung wurde mittels Real-time PCR durchgeführt. Electrophoretic mobility shift Assays (EMSA) wurden an nukleären Extrakten von HEK293- und Herzmuskelzellen durchgeführt. Schließlich wurden an 58 jungen, männlichen, gesunden Probanden systolischer Blutdruck, Herzfrequenz, Schlagvolumen und Herzzeitvolumen mittels Impedanzkardiographie bestimmt.

### Ergebnisse

Der Transkriptionsstartpunkt wurde mittels 5´-RACE in humaner Herz cDNA ermittelt und ermöglichte uns, den 5´-untranskribierten Bereich zu klonieren. Der Promotor wurde daraufhin mit Reporter Assays definiert. An 5´-Deletionskonstrukten konnten im Bereich -511 bis -798 essentielle cis-Elemente identifiziert werden, die eine hohe Transkription von Gq-bewirkten. Stimulation von HEK293-Zellen führte nach 6 Stunden im Vergleich zur Basalaktivität zu einem Anstieg der Gq Transkription (10% Serum: 297±67%; 10 nM Angiotensin II 203±37%; $p<0.001$). Mittels Sequenzierung des kompletten Promotors identifizierten wir im Bereich hoher Aktivität einen häufigen (Allelfrequenz: 47.3%) Polymorphismus an Position -694/695. Dieser ist durch einem gemeinsamen Austausch von zwei Nukleotiden (GC>TT) charakterisiert. GC-Allel Konstrukte zeigten im EMSA eine stärkere Bindung des ubiquitären Transkriptionsfaktors SP-1 im Vergleich zu TT-Allelen und führten zu einer erhöhten Promotoraktivität nach Stimulation mit 10% Serum (GC: 385±64%; TT: 212±34%; $p<0.05$) oder 10 nM Angiotensin II (GC: 213±32%; TT: 128±22%; $p<0.01$), konsistent mit in vivo Experimenten. GC/GC homozygote Träger zeigten nämlich im menschlichen Herzen die höchste Gq-mRNA-Konzentration (Gq/$\beta$-Actin Ratio, GC/GC: 0.015±0.001; GC/TT: 0.013±0.001; TT/TT: 0.011±0.002; $p<0.05$) und Gq-Proteingehalt (Gq/G$\beta$ Ratio, GC/GC: 5.3±0.4; GC/TT: 3.8±0.6; TT/TT: 3.5±0.3; $p<0.01$). Stimulation von menschlichen Fibroblasten mit Bradykinin (Gq-vermittelt) führte zum stärksten Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ bei GC/GC-Trägern (GC/GC: 843±49 nM; GC/TT: 665±101 nM: TT/TT, 550±117 nM; $p<0.01$), vereinbar mit einem Gen-Dosis-Effekt. Eine funktionelle Studie bei Probanden zeigte ein erhöhtes Schlagvolumen und Herzzeitvolumen bei GC-homozygoten Trägern im Vergleich zu GC/TT- und TT/TT-Genotypen. (Tab. 1).

### Interpretation

Durch Charakterisierung des humanen Gq-Promotors konnten wir erstmals zeigen, dass Serum sowie hypertroph wirksames Angiotensin II eine vermehrte Gq-Transkription bewirken. Des

Tab. 1

| Genotyp | GC/GC (n = 22) | GC/TT (n = 26) | TT/TT (n = 10) | p-Wert |
|---|---|---|---|---|
| Schlagvolumen (ml) | 105.7 ± 5.8 | 92.7 ± 4.9 | 79.2 ± 5.2 | 0.008 |
| Herzzeitvolumen (l/min) | 5.61 ± 0.26 | 5.19 ± 0.24 | 4.42 ± 0.17 | 0.025 |
| Puls (min-1) | 54.5 ± 1.8 | 56.8 ± 1.5 | 58.0 ± 4.4 | 0.325 |
| Syst. Blutdruck (mmHg) | 120.8 ± 1.8 | 121.9 ± 1.7 | 119.1 ± 2.8 | 0.609 |
| Alter (Jahre) | 27.1 ± 0.72 | 27.7 ± 0.71 | 28.2 ± 1.26 | 0.425 |
| BMI (kg x m-2 ) | 23.7 ± 0.47 | 24.1 ± 0.36 | 24.6 ± 0.82 | 0.270 |

© Anästh Intensivmed 2006;47:387-426 DIOmed Gesellschaft mit beschränkter Haftung

Weiteren zeigen homozygote GC-Patienten im GC(-694/695)TT-Polymorphismus eine vermehrte endogene Gq-Expression, einen stärkeren Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ und ein erhöhtes Schlagvolumen im Vergleich zu GC/TT- und TT/TT-Patienten. Diese Daten unterstreichen daher die Bedeutung von Gq im kardiovaskulären System und schaffen ein Modellsystem zur funktionellen Untersuchung Gq-vermittelter Signalwege.

**Literatur**
**1. Wettschurek N, Offermanns S.** Mammalian G proteins and their cell type specific functions. Physiol Rev 2005;85:1159-204.
**2. Mende U, Kagen A, Cohen A, Aramburu J, Schoen FJ, Neer EJ** Transient cardiac expression of constitutively active Gq leads to hypertrophy and dilated cardiomyopathy by calcineurin-dependent and independent pathways. Proc Natl Acad Sci USA 95:13893-13898.
**3. Bachmann HS, Siffert W, Frey UH** Successful amplification of extremely GC-rich promoter regions using a novel 'slowdown PCR' technique. Pharmacogenetics 2003;13:759-766.

## Nutzung des Urokinase-Rezeptor (u-PAR) – Signaltransduktionswegs zur Verbesserung der myokardialen Wundheilung nach Myokardischämie bei Mäusen

**J. Larmann**[1], **Ch. Herzog**[2], **M. Schmitz**[2], **D. Seidler**[3], **H. Van Aken**[1] und **G. Theilmeier**[1,2]
[1] Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin, Universitätsklinikum Münster
[2] Institut für Anatomie,
[3] Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie,
Westfälische Wilhelms-Universität Münster

### Fragestellung

Myokardischämien bestimmen maßgeblich die perioperative Morbidität und Mortalität. Das Ausmaß des Myokardschadens ist abhängig von Ischämie, Reperfusionssyndrom sowie von der sich anschließenden Narbenbildung. Eine Möglichkeit, das Reperfusionssyndrom nach stattgehabter Myokardischämie direkt und kausal zu behandeln, wäre für das Management perioperativer Myokardischämien wünschenswert. Der Urokinase-Rezeptor (u-PAR), ein Integrin-Partnermolekül [1] spielt eine Schlüsselrolle für die Rekrutierung von Leukozyten und stellt damit ein mögliches Target für die Entzündungsmodulation dar. Wir konnten in vorausgehenden Untersuchungen zeigen, dass u-PAR-defiziente (u-PAR$^{-/-}$) Mäuse nach Myokardischämie und Reperfusion (MI/R) 42% kleinere Infarkte als Wildtyp (WT) Tiere entwickeln und weniger Leukozyten in das post-ischämische Areal rekrutieren. Wir haben untersucht, ob der u-PAR-Effekt leukozytenabhängig ist, ob die genetische Inhibition des u-PAR-Signals eine Verbesserung der myokardialen Wundheilung verursacht, ob diese Strategie pharmakologisch oder gentherapeutisch nutzbar ist und welche der drei u-PAR-Domänen diesen Effekt bewirken.

### Methodik

Mit Genehmigung der zuständigen Tierschutzkommission wurden 12 Wochen alte u-PAR$^{-/-}$- oder WT-Mäuse durch Ligatur des Ramus interventricularis anterior der linken Koronararterie einer 30minütigen MI/R unterzogen. 3 Tage nach MI/R wurden die Tiere mittels 2D-geführter M-Mode-Echokardiographie untersucht und die regionale Wanddickenzunahme (WTF) im Ischämiegebiet sowie die Verkürzungsfraktion des linken Ventrikels bestimmt. An Tag 3 und 7 wurde für biochemische Untersuchungen aus ischämischem und nicht-ischämischem Gewebe Protein bzw. mRNA aufgereinigt. Die MMP-9-Aktivierung wurde zymographisch als kollagenolytische Aktivität bestimmt. Die Genexpression von Kollagen wurde an Tag 3 mittels RT-PCR gemessen. Nach 7 Tagen wurde die Kollagendeposition in SDS-PAGE-Untersuchungen quantifiziert. Um das therapeutische Potential des Urokinase-Rezeptors zu untersuchen, wurde die Gabe des in Pichia exprimierten rekombinanten Proteins, mit einer gentherapeutischen Überexpression von unterschiedlichen Fragmenten löslichen u-PARs durch eine hydrodynamische Transfektion (HDTF) verglichen [2]. 24 Stunden vor MI/R erfolgte eine IV-Injektion nackter Plasmid-DNA von u-PAR$_{24-306}$ (Domäne 1-3), u-PAR$_{24-151}$ (Domäne 1 bis zur Hälfte von Domöne 2), u-PAR$_{24-118}$ (Domäne 1) oder eines Kontrollplasmids. Infarktgröße und „area-at-risk“ (AAR) wurden 24h nach MI/R morphometrisch in TTC-Färbungen gemessen. Die AAR wurde durch Coomassieblau bestimmt.

### Ergebnisse

Die Induktion einer Panleukozytopenie durch Hydroxyharnstoff (2mg/g für 48 h prä-OP) reduziert die Infarktgröße in WT-Mäusen auf 25±3% der AAR, hat aber in u-PAR$^{-/-}$-Mäusen keinen additiven Effekt. In u-PAR$^{-/-}$-Mäusen findet sich 24h nach MI/R eine 1,2-fache Erhöhung der MMP-9-Aktivität im Vergleich zu einer 2,5fachen Steigerung in WT-Mäusen. 72 Stunden nach MI/R haben u-PAR$^{-/-}$-Mäuse eine bessere regionale und globale linksventrikuläre Funktion als WT-Mäuse (WTF 50±7% vs. 41±6%, u-PA$^{R-/-}$ vs. WT). 72 Stunden nach MI/R fand sich in u-PAR$^{-/-}$-Infarkten eine 15fache Erhöhung der Kollagen-1-mRNA-Kopien im Vergleich zum nicht-infarzierten Myokard, während WT-Mäuse einen 25fachen Anstieg zeigten (n=5, $p<0,05$), was in der biochemischen Quantifizierung der Kollagen 1-alpha-Kette nach einer Woche in einer signifikant reduzierten Kollagendeposition resultierte (1,65±0,5 vs. 2,19±0,9, Ratio Infarkt/Non-Infarkt, u-PAR$^{-/-}$ vs. WT, n=5, $p<0,05$). Die Infarkte waren in WT-Mäusen, die mit 100 µg rekombinantem u-PAR$_{24-306}$ IV nach der Ischämie behandelt wurden, signifikant reduziert (27±4,7% vs. 48±3% Infarkt/AAR, rec-u-PAR vs. Kontrolle, n=6, $p<0,01$). Eine HDTF mit u-PAR$_{24-306}$ oder u-PAR24-151 reduzierte die Infarktgröße im Vergleich zu Kontrollplasmid- oder PAR$_{24-118}$-behandelten Tieren (25±3,5 bzw. 26±1,5 vs. 47±1,3 vs. 53±2,3; n=6-8; $p<0,01$).

### Interpretation

Die Unterbrechung des u-PAR-Signales moduliert die postischämische Entzündung und führt zu einer verbesserten Narbe. Die pharmakologische oder gentherapeutische Intervention im u-PAR-Signaltransduktionsweg verkleinert den Infarkt nach Myokardischämie. Untersuchungen zum Effekt auf die Narbenkomposition stehen noch aus. Der Effekt von u-PAR ist am ehesten auf den Linker zwischen Domäne 1 und -2 zu lokalisieren. Diese Befunde machen die Entzündungsmodulation durch Unterbrechung der u-PAR-vermittelten Signaltransduktion zu einer äußerst viel versprechenden therapeutischen Option in der Behandlung des Reperfusionssyndroms nach Myokardischämien.

**Literatur**
**1. Wei Y, Lukashev M, Simon DI, Bodary SC, Rosenberg S, Doyle MV, and Chapman HA.** Science 1996;273:1551-1555.
**2. Vorup-Jensen T, Jensen UB, Liu H, Kawasaki T, Uemura K, Thiel S, Dagnæs-Hansen F and Jensen TG.** Mol Ther 2001;3:867-874.

## Genexpressionsanalyse der proinflammatorischen Regulation bei polytraumatisierten Patienten

**S. Little**[1], **H. Hossain**[2], **K. Weismüller**[1], **J. Focke**[1], **S. Tchatalbachev**[2], **J. Stricker**[1], **T. Langefeld**[2], **T. Colaris**[1], **F. Martens**[1], **G. Hempelmann**[2], **T. Chakraborty**[2] und **T. Menges**[1]

[1] Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie,

[2] Institut für Medizinische Mikrobiologie,

Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen

### Einleitung

Schwere Mehrfachverletzungen führen häufig zu einer unkontrollierten Immunantwort, die sequentiell über septisch toxische Komplikationen zu einem Multiorganversagen (MOV) führen kann. Dieser Prozess ist zu Beginn gekennzeichnet durch eine überschießende Immunantwort, bei der proinflammatorischen Mediatoren eine maßgebliche Beteiligung zugesprochen wird [1]. Serielle Genexpressionsanalysen bei polytraumatisierten Patienten liefern eine molekulare Signatur der Prozesse, die zu einem Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS), einer Sepsis und einem MOV führen können [2].

### Methoden

In einer von der Ethikkommmission der Justus-Liebig-Universität Giessen genehmigten Studie wurden 96 polytraumatisierte Patienten mit einem Injury Severity Score (ISS) von mindestens 12 Punkten innerhalb von 4 Stunden nach dem Trauma prospektiv untersucht. 2,5ml Vollblut wurde jeweils über den Beobachtungszeitraum von 28 Tagen an 9 Abnahmezeitpunkten entnommen und in PaxGene®-Röhrchen (Qiagen) zur Stabilisierung der RNA überführt. Die Sepsisdiagnose basierte auf den Kriterien der ACCP/SCCM-Konsensuskonferenz (Bone-Kriterien). Von 96 Patienten wurden 20 repräsentative Patienten ausgewählt, Matched-pairs gebildet, (Gruppe 1, septisch, n=9; Gruppe 2, nicht septisch, n=11) der Microarray-Analyse zugeführt und das Probenmaterial zu festgelegten Zeitpunkten (Aufnahme auf der Operativen Intensivstation [ZP0], 24h nach Aufnahme [ZP1], 24h vor diagnostizierter Sepsis [ZPvS], zum Zeitpunkt der Sepsis [ZPS] und 24h nach Sepsisdiagnose [ZPnS]) analysiert. Die Microarray-Analyse erfolgte mittels des CodeLink UniSet Human I Bioarrays, der 9.877 humane Gene umfasst (Amersham Bioscience). Zur Datenauswertung fanden die Programme ImaGene5 (Amersham Bioscience), dChip (www.dchip.org), SAM (www.cse.ucsc.edu) und Genesis (www.genome.tugraz.at) Anwendung. Zur statistischen Bewertung der Patientendaten wurden deskriptive Methoden (Mann-Whitney-U-Test), zur Analyse der Microarrays ein Rangtest (rank products) und eine hierarchische Clusteranalyse mit Farbkartierung (Heatmap) herangezogen. Eine Validierung der einzelnen Microarray-Ergebnisse erfolgte durch Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR).

### Ergebnisse

Ein Vergleich der morphometrischen Daten beider Patientengruppen (Gr.1, n=9; Gr.2, n=11) zeigte weder einen signifikanten Gruppenunterschied noch eine signifikante Differenz zur Patientengrundgesamtheit. Von den 20 mittels Microarray-Analyse erfassten Patienten entwickelten neun zwischen dem dritten und achten Tag nach Aufnahme eine Sepsis, vier Patienten entwickelten ein MOV und zwei verstarben. Bei einer False Discovery Rate (FDR) von 1.1 [3] ergab der Gruppenvergleich der neun septischen zu den elf nicht septischen Patienten für die Microarray-Analyse insgesamt 692 signifikant regulierte Gene zum Zeitpunkt ZP0. Die Rangtestanalyse und anschließende hierarchische Clusteranalyse der über-exprimierten Gene (exemplarisch angeführt Interleukin1 receptor associated kinase 4 (IRAK4), Interleukin1 receptor 2 (IL1R2), Interleukin18 receptor accessory protein (IL18RAP) und Toll-like receptor 2 (TLR2) als Induktoren der nuclear factor kappa B (NFκB)-Synthese und somit in synergistischer Wirkung ursächlich für eine gesteigerte Freisetzung proinflammatorischer Plasmaproteine), ergab ein unterscheidbares Genexpressionsprofil für Patienten der Gruppe 1 und 2 bereits unmittelbar nach Aufnahme [ZP0 und ZP1] (Abb. 1). Dabei waren das Expressionssignal und der Expressionsfaktor (Fold Change (Fc)) bei einer FDR von 30% für IRAK4 [ZP0: Gr.1: 7.8, Gr.2: 4.2, Fc 1.7; ZP1: Gr.1: 8.2, Gr.2: 3.9, Fc 1.9], für IL1r2 [ZP0: Gr.1: 42.3, Gr.2: 14.1, Fc 2.6; ZP1: Gr.1: 25.6, Gr.2: 13.5, Fc 1.8], für IL18RAP [ZP0: Gr.1: 120.7, Gr.2: 70.4, Fc 1.8; ZP1: Gr.1: 96.6, Gr.2: 59.9, Fc 1.8] und für TLR2 [ZP0: Gr.1: 80.1, Gr.2: 45.1, Fc 1.75; ZP1: Gr.1: 65.1, Gr.2: 42.5, Fc 1.5].

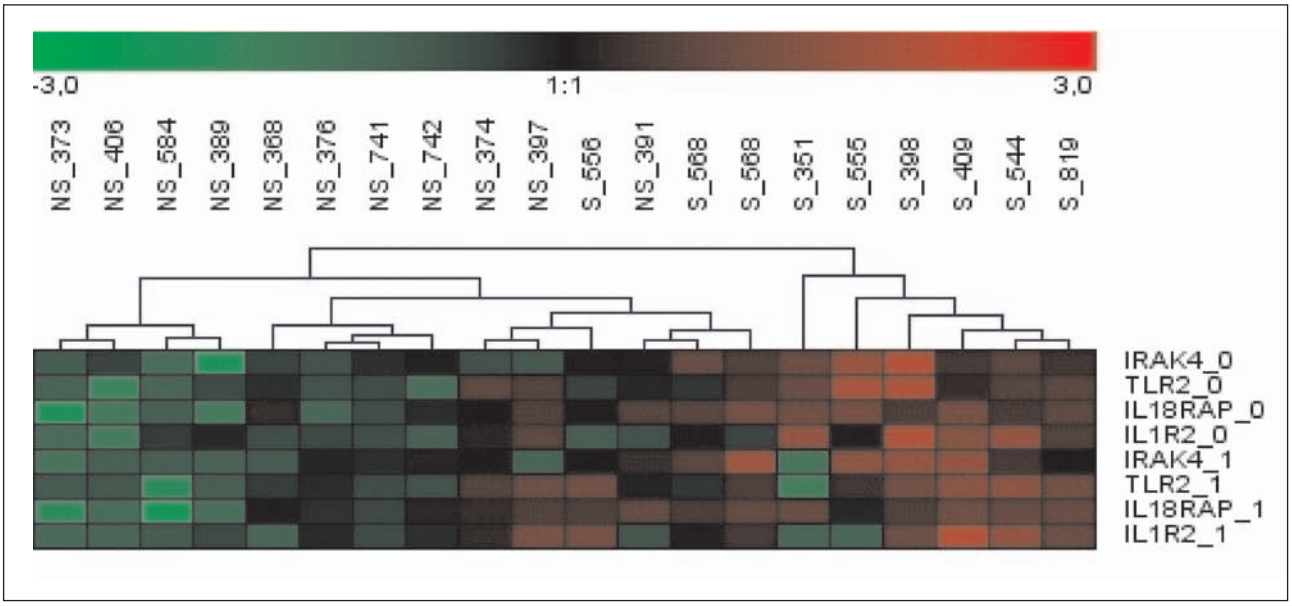


Abb. 1: Heatmap der proinflammatorischen Genregulation zum ZP0 und ZP1.

### Schlussfolgerungen

Genexpressionsanalysen aus Vollblut polytraumatisierter Patienten ermöglichen bereits zum Zeitpunkt der Aufnahme auf der Intensivstation eine eindeutige Differenzierung in Patienten mit und ohne komplizierten Krankheitsverlauf (Sepsis, MOV). Microarray-Analysen können die komplexen Abläufe dieser pathophysiologischen Prozesse und deren Komplikationen erklären und sie klinischen Symptomen und deren Diagnosen zeitlich zuordnen. Diese Technologie eröffnet die Option einer sehr frühzeitigen präzisen Labordiagnostik der komplexen Prozesse von Sepsis und Organfunktionsstörungen auf Transkriptions- und Proteinbiosyntheseebene und gewährleistet ein schnelles und multifaktorielles Abbild der Entzündungsreaktion des gesamten Organismus.


#### Literatur

**1. Menges T, Engel J, Welters I, et al.** Changes in blood lymphocyte populations after multiple trauma: association with posttraumatic complications. Crit Care Med 1999;27:733-40.
**2. Prucha M, Ruryk A, Boriss H, et al.** Expression Profiling: Toward an application in sepsis diagnostics. Shock 2004;22:29-33.
**3. Storey J, Tibshirani R.** Statistical significance for genomewide studies. PNAS 2003;100:9440-5.


## Der ACE I/D, aber nicht der AGT (-6)A/G-Promotor-Polymorphismus ist ein unabhängiger Faktor für Überleben bei Acute Respiratory Distress Syndrome


**M. Adamzik[1,2], U. Frey[2], S. Sixt[2], L. Knemeyer[1], M. Beiderlinden[2], W. Siffert[1] und J. Peters[2]**
[1] Institut für Pharmakogenetik
[2] Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin
Universitätsklinikum Essen, Universität Duisburg-Essen


### Fragestellung

Der Insertions/Deletions Polymorphismus im Angiotensin Conversions Enzym (ACE) ist sowohl mit der Entstehung als auch mit dem Verlauf des Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) assoziiert [1]. Da jedoch das ACE nicht nur Angiotensin I zu Angiotensin II spaltet, sondern auch Kinine inaktiviert, ist es unklar, inwieweit sich Angiotensin-II-(AT-II)-Regulation bzw. Kinin-Inaktivierung für die Beeinflussung verantwortlich zeichnen. Da das A Allel des Angiotensinogen-(AGT)-Promotor-Polymorphismus (-6)A/G ebenfalls mit erhöhten AGT und AT-II-Konzentrationen assoziiert ist [2], testeten wir die These, dass sowohl die Gegenwart des D-Allels des ACE I/D-Polymorphismus als auch das A-Allel des Angiotensinogen-(AGT)-Promotor-Polymorphismus (-6)A/G das 30-Tage-Überleben im ARDS beeinflusst.

### Methodik

Nach Zustimmung der Ethikkommission wurden 84 Patienten mit ARDS (weiße, deutsche Kaukasier, Alter: 43 ± 16 Jahre (Mittelwert ± Standardabweichung)) als auch 200 gesunde, weiße, deutsche kaukasische Blutspendern genotypisiert, und zwar sowohl im Hinblick auf den ACE I/D-Polymorphismus als auch auf den Angiotensinogen-(AGT)-Promotor-Polymorphismus (-6)A/G (Tab. 1).

### Statistik

Kaplan-Meier-Analyse und Log-Rank-Tests untersuchten den Einfluss des Genotyps auf das 30-Tage-Überleben. Der Einfluss von Geschlecht, SAPS, SOFA, Lung Injury Score (LIS), Alter, Body Mass Index (BMI), positiv endexpiratorischem Druck (PEEP), Horowitz-Quotient ($PaO_2/FiO_2$), ACE- und AGT-Genotypen als prognostischen Faktoren für das klinische „Outcome“ wurden mittels schrittweiser multivariater Cox-Regressions-Analyse untersucht.

### Ergebnisse

Der ACE DD-Genotyp zeigte im Vergleich zum ACE-II-Genotyp eine signifikant erhöhte 30-Tage-Mortalität (p = 0.011) (Abb. 1). Der ACE I/D Polymorphismus war ein unabhängiger Faktor für das 30-Tage-Überleben. Patienten mit einem homozygoten DD-Genotyp hatten das größte Risiko (Hazard Ratio (HR) 5.7; 95% CI 1.7-19.2; p = 0.005) im Vergleich zum II-Genotyp. Der AGT-(-6)A/G-Polymorphismus beeinflusste weder Entwicklung noch Verlauf der Erkrankung.

### Interpretation

Das D-Allel des ACE I/D-Polymorphismus ist ein starker unabhängiger Faktor für das 30-Tage-Überleben im ADRS. Da der AGT (-6)A/G-Polymorphismus keinen Einfluss auf das 30-Tage-Überleben hat, scheint die Regulation der Kinin-Inaktivierung starken Einfluß auf den Verlauf des ARDS zu haben.


#### Literatur

**1. Marshall RP, Webb S, Bellingan GJ, et al:** Angiotensin converting enzyme insertion/deletion polymorphism is associated with susceptibility and outcome in acute respiratory distress syndrome. Am J Respir Crit Care Med 2002;166:646-50.
**2. Inoue I, Nakajima T, Williams CS, et al:** A nucleotide substitution in the promoter of human angiotensinogen is associated with essential hypertension and affects basal transcription in vitro. J Clin Invest 1997;99:1786-97.


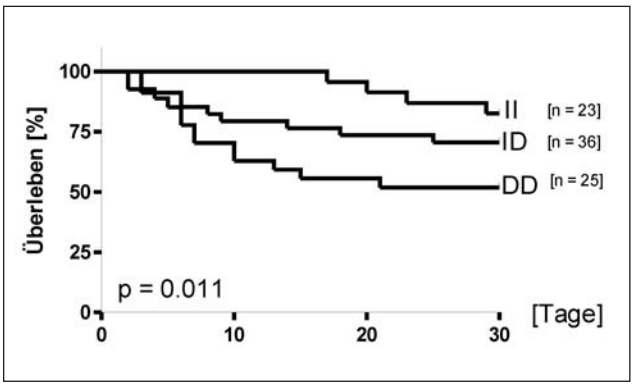


Abb. 1: 30-Tage-Überleben in Abhängigkeit vom ACE I/D-Polymorphismus.

Tab. 1

| Geschlecht (m/f) | Pneumonie Sepsis Trauma | Lung Injury Score | BMI (kg/m²) | $PaO_2/FiO_2$ (mmHg) | PEEP ($cmH_2O$) | SAPS | SOFA |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 43/41 | 56, 20, 8 | 3.2 ± 0.4 | 26 ± 6 | 116 ± 65 | 16 ± 4 | 50 ± 17 | 12 ± 4 |

## p21-aktivierte Kinase reguliert die LPS-induzierte Migration neutrophiler Granulozyten in die Lunge

**J. Reutershan***[1,3], **R. Stockton**[1], **M. Schwartz**[1,2] und **K. Ley**[1,2]
[1] Robert M. Berne Cardiovascular Research Center,
[2] Department of Biomedical Engineering,
University of Virginia, Charlottesville, VA
[3] Klinik für Anaesthesiologie und Intensivmedizin, Universitätsklinikum Tübingen, Eberhard-Karls-Universität Tübingen

### Fragestellung

Im Rahmen der akuten respiratorischen Insuffizienz (ALI/ARDS) kommt es zur Transmigration neutrophiler Granulozyten (polymorphkernige Leukozyten, PMN) in die Lunge. Dieser Prozess setzt strukturelle Veränderungen des Zytoskeletts von Endothelzellen und PMN voraus und wird von so genannten „small GTPases“ wie Rac oder Cdc42 reguliert. Nach ihrer Aktivierung binden Rac und Cdc42 an die Familie der p21-aktivierten Kinasen (PAK 1, 2 und 3), die wiederum die Polymerisierung von Aktin und die Phosphorylierung von Myosin regulieren und damit unmittelbar die Motilität der Zelle regulieren [1]. Wir untersuchten den Effekt eines PAK-Inhibitors auf die Transmigration von PMN in vivo und in vitro.

### Methodik

Nach Genehmigung durch die örtliche Tierschutzkommission wurde in C57Bl6-wildtyp-Mäusen eine akute pulmonale Inflammation mittels Inhalation von LPS (S. enteritidis) induziert. 30 Minuten vor LPS-Exposition erhielt eine Versuchsgruppe ein PAK-blockierendes Peptid (1mg, intraperitoneal), die andere Gruppe erhielt ein Kontrollpeptid. Nach 12 Stunden wurde die Migration von PMN in die verschiedenen Kompartimente der Lunge sowie die mikrovaskuläre Permeabilität mittels Evans-blue-Extravasation bestimmt [2]. In einer separaten Versuchsreihe wurde die Aufnahme von fluoreszenzmarkiertem PAK-Peptid in PMN untersucht und die Anzahl PAK-positiver PMN in Blut, Lunge und Bronchiallavage (BAL) durchflusszytometrisch bestimmt. Der Effekt auf die PMN-Migration wurde außerdem in einem In-vitro-Chemotaxisassay mit zwei verschiedenen Endothelzellarten (Aortenendothel des Rindes und Lungenendothel der Maus) untersucht. Die Aktivierung von PAK in PMN wurde schließlich molekularbiologisch mittels Western-Blot geprüft.

### Ergebnisse

Die Inhalation von LPS führte zu einer signifikanten Migration von PMN in das Lungeninterstitium und in den Alveolarraum. Die Blockierung von PAK reduzierte die transendotheliale und transepitheliale PMN Migration um ~60% ($p < 0,05$) (Abb. 1). Darüber hinaus wurde die LPS-induzierte Steigerung der mikrovaskulären Permeabilität in der Lunge durch das PAK-Peptid signifikant reduziert (EB Index 1,3 ± 1,5 vs. 2.1 ± 1.7, $p < 0,05$). Die Injektion von fluoreszierendem PAK-Peptid demonstrierte eine Aufnahme des Peptids durch PMN. PAK-positive PMN waren im Blut und in geringer Anzahl in der Lunge, nicht jedoch in der BAL zu finden. Die Hemmung der Transmigration wurde in den In-vitro-Chemotaxisassays bestätigt. Hier zeigte sich eine signifikante Reduktion der Migration, wenn entweder PMN, Endothel oder beide Kompartimente mit dem PAK-Peptid vorbehandelt wurden (alle $p < 0,05$). In allen Versuchen zeigte das Kontrollpeptid keinen Effekt. Die Aktivierung von PMN mit dem für die akute Lungeninflammation kritischen CXCR2-Liganden CXCL2/3 (MIP-2) führte darüber hinaus zu einer zeitabhängigen Phosphorylierung von PAK.

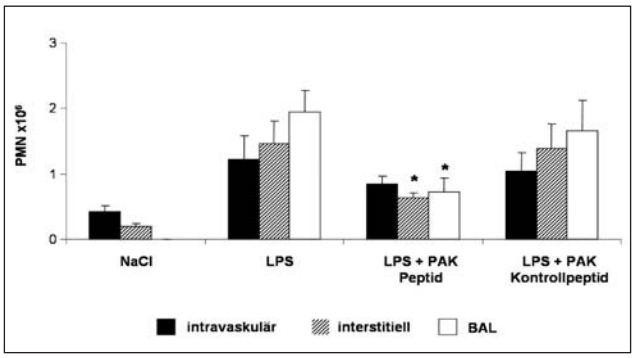


Abb. 1: PAK-abhängige PMN Migration in die verschiedenen Kompartimente der Lunge. * $p < 0,05$ versus LPS-Kontrolle.

### Interpretation

Die Infiltration von PMN in der Lunge ist eines der kritischsten Ereignisse im Rahmen der akuten respiratorischen Insuffizienz. Dennoch sind die zugrunde liegenden Mechanismen kaum verstanden. Die Beteiligung von Adhäsionsmolekülen ist etabliert, ihre Blockierung scheint aber aufgrund ihrer immunsupprimierenden Effekte nicht wünschenswert. Die Bedeutung des Chemokinrezeptors CXCR2 auf PMN und Endothelzellen wurde in vielen ARDS-Modellen demonstriert [3]. Die hier gezeigte Aktivierung von PAK durch den CXCR2-Liganden CXCL2/3 impliziert, dass die beobachteten CXCR2-Effekte möglicherweise PAK-abhängig sind. Jedoch ist die Beteiligung weiterer Signalwege wahrscheinlich. Die Blockierung von PAK als direktem Effektor der Motilität von PMN und Endothelzellen scheint deshalb eine attraktive therapeutische Option im Rahmen PMN-abhängiger Inflammationen zu sein.

### Literatur

1. **Stockton RA, Schaefer E, and Schwartz MA.** p21-activated kinase regulates endothelial permeability through modulation of contractility. J Bio Chem 2004;279:46621-46630.
2. **Reutershan J, Basit A, Galkina EV, and Ley K.** Sequential recruitment of neutrophils into lung and bronchoalveolar lavage fluid in LPS-induced acute lung injury. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2005;289:L807-L815.
3. **Reutershan J, Morris MA, Burcin TL, Smith DF, Chang D, Saprito MS, et al.** Critical role of endothelial CXCR2 in LPS-induced neutrophil migration into the lung. J Clin Invest 2005 In press.

* Preisträger des Fresenius-Stipendiums 2006

## Die Rolle endothelialer Progenitorzellen in der Sepsis

**G.Ch. Beck**[1], **N. Rafat**[2], **Ch. Hanusch**[1], **P. Brinkkoetter**[2], **J. Schulte**[2], **F.J. van der Woude**[2], **K. van Ackern**[1] und **B.A. Yard**[2]
[1] Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin,
[2] V. Medizinische Klinik,
Universitätsklinikum Mannheim gGmbH, Fakultät für Klinische Medizin Mannheim, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

### Fragestellung

Das Ausmaß der mikrovaskulären Schädigung spielt eine zentrale Rolle in der Pathogenese der Sepsis und wird durch Veränderungen der Endothelzellfunktion und des endothelialen Phänotypes wie Schwellung, Deformierung und Apoptose mit teilweisem Ablösen der Endothelzellen von der Basalmembran bestimmt. Es kann klinisch durch den Nachweis vermehrt zirkulierender Endothelzellen sowie endothelialer Mikropartikel im Blut von Sepsispatienten quantifiziert werden [1]. Eine Reparatur dieses geschädigten Endothels könnte somit einen vorteilhaften Einfluß auf den Verlauf einer Sepsis haben.

Es gibt zunehmend Hinweise, dass zirkulierende endotheliale Vorläuferzellen (EPC), welche durch eine Reihe von Mediatoren („vascular endothelial growth factor“ (VEGF), „granulocyte-macrophage colony-stimulating-factor“ (GM-CSF) und Erythropoetin (EPO)) vermehrt aus dem Knochenmark freigesetzt werden, eine Re-endothelialisierung bewirken können. Dieser Effekt konnte unter verschiedenen Bedingungen endothelialer Schädigung, insbesondere akute kardiovaskuläre Ereignisse und Dialyse, aber auch beim akuten Lungenversagen (2) bereits nachgewiesen werden.

Mittels dieser Studie sollte untersucht werden, ob auch bei Patienten mit einer Sepsis eine erhöhte Anzahl cEPCs im Blut nachzuweisen ist und ob diese Zahl mit der Mediatorproduktion, der Schwere und der Mortalität der Sepsis korreliert.

### Methodik

Die cEPC-Konzentration wurde bei 32 Sepsispatienten, 15 Intensivpatienten ohne Sepsis und 15 gesunden Probanden bestimmt. Aus dem Vollblut wurden periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC) über die Ficoll-Dichtezentrifugation isoliert, mit Antikörpern gegen EPC-Oberflächenmarker CD133, CD34 und VEGF-R2 [3] inkubiert und mittels FACS-Analyse ausgezählt. Die Serumkonzentrationen von VEGF, GM-CSF und EPO wurden mittels ELISA bestimmt. Der Schweregrad der Sepsis wurde mittels APACHE-II-Score definiert.

### Ergebnisse

Die Konzentration der cEPC war bei Patienten mit Sepsis über mehrere Tage signifikant (0,162 ± 0,1%) gegenüber nicht-septischen (0,087 ± 0,04%) und gesunden Kontrollen (0,039 ± 0,002%) erhöht ($p<0,01$). An der Sepsis Verstorbene (n=8), definiert als Tod innerhalb von 28 Tagen nach Diagnosestellung, hatten im Vergleich zu Überlebenden (n=24) signifikant weniger cEPC's (0,06 ± 0,028 vs 0,170 ± 0,06) mobilisiert. Diese cEPC-Konzentrationen fanden wir in umgekehrter Korrelation zu den APACHE-II-Scores und zur Mortalität.

Eine weitere Korrelation zeigte sich zwischen der Produktion der für die EPC-Freisetzung verantwortlichen Mediatoren und der cEPC-Konzentration. Die VEGF-Konzentration war bei gesunden Kontrollen niedrig (56,1 ± 29,8 ng/ml), bei Patienten ohne Sepsis schon signifikant erhöht (495 ± 275) und bei Patienten mit Sepsis ungefähr um das 30-fache erhöht (1351 ± 733) ($p<0,01$). Ähnliche signifikant erhöhte Konzentrationen wurden auch für GM-CSF und EPO bei Patienten mit Sepsis, verglichen zu Patienten ohne Sepsis und gesunden Kontrollen, gefunden (GMCSF: 3,3 ± 2,2 vs 0,9 ± 0,7 vs 0,049 ±0,3 ng/ml; Epo: 100,6 ± 75 vs 19,9 ± 12 vs 5,7 ± 3 mIU/ml).

### Interpretation

Die Daten dieser Studie unterstützen die Hypothese, dass direkt mit Beginn einer Sepsis endotheliale Reparaturmechanismen in Form der Mediator-induzierten vermehrten Freisetzung endothelialer Vorläuferzellen aus dem Knochenmark initiiert werden. Die mittels Facs-Analyse gemessenen cEPC-Konzentrationen könnten als diagnostischer oder prognostischer Parameter des Gefäßschadens und der Schwere der Sepsis dienen. Die klinische Funktion dieser vermehrten Mobilisierung wird derzeit untersucht.

### Literatur

1. **Mutunga M, Fulton B, Bullock R, et al.** Circulating endothelial cells in patients with septic shock. Am J Respir Crit Care Med 2001;163:195-200.
2. **Burnham EL, Taylor WR, Quyyumi AA, et al.** Increased circulating endothelial progenitor cells are associated with survival in acute lung injury. Am J Respir Crit Care Med 2005;172:854-60.
3. **Hristov M, Weber C.** Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance. J Cell Mol Med 2004;8:498-508.

## Modulation der rezeptorunabhängigen und -abhängigen pulmonalen Vasokonstriktion durch kontinuierliche Bupivacain-Applikation in den thorakalen Epiduralraum bei experimenteller polymikrobieller Sepsis

**S. Lauer, H. Freise, A. Sielenkämper, H. Van Aken** und **L.G. Fischer**
Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin, Universitätsklinikum Münster, Westfälische Wilhelms-Universität Münster

### Fragestellung

Die Entwicklung eines „Acute Respiratory Distress Syndromes“ (ARDS) im Rahmen einer schweren Sepsis kann mit morphologischen und funktionellen pulmonalen Veränderungen einhergehen. Schädigungen des Gefäßendothels und Störungen vasoregulatorischer Mechanismen wie der hypoxisch pulmonalen Vasokonstriktion (HPV) sind im Rahmen dieses Krankheitsbildes Ursachen für Oxygenierungsstörungen und für die Ausbildung intrapulmonaler Shuntphänomene.

Durch den experimentellen Einsatz der thorakalen Periduralanästhesie konnte eine Verbesserung des intestinalen mukosalen Blutflusses und der intestinalen Barrierefunktion nachgewiesen werden [1]. Ziel der vorliegenden Studie war die Untersuchung des Einflusses einer kontinuierlichen thorakalen epiduralen Gabe des Lokalanästhetikums Bupivacain auf die pulmonale endotheliale Dysfunktion bei polymikrobieller Sepsis anhand etablierter Modelle der kontinuierlichen thorakalen Periduralanästhesie und der isoliert perfundierten Lunge (IPL) in der Ratte [2, 3].

### Methodik

Nach Genehmigung des Vorhabens durch die Bezirksregierung Münster wurden 34 Sprague-Dawley-Ratten mit einem thorakalen Periduralkatheter (PDK) und einem zentralen Venenkatheter instrumentiert. Danach wurde eine polymikrobielle Sepsis durch Laparotomie und zökale Ligatur und Perforation (CLP) induziert oder eine Sham-Operation (SHAM) durchgeführt. Nach Randomisierung und Blindung erhielten die Tiere eine epidurale

Applikation von NaCl 0,9% oder Bupivacain 0,5% (+TEA) mit einer Laufrate von 15µl/h. Nach 6h (CLP 6h, CLP 6h +TEA) bzw. 24h (CLP 24 h, CLP 24h + TEA, SHAM, SHAM + TEA) wurden die Ratten anästhesiert, tracheotomiert ($FiO_2$= 21%) und anschließend das exhalierte NO (ppb) gemessen. Nach Etablierung der IPL erfolgte zunächst die Gabe von Angiotensin II (AT II) in den Lungenkreislauf, um die Vasokonstriktion der pulmonalen Strombahn zu messen, gefolgt von der Induktion einer HPV durch Beatmung mit einer $FiO_2$ von 3%. Nach erneuter Ventilation mit einer $FiO_2$ von 21% wurde eine rezeptorabhängige Vasokonstriktion durch Bradykinin (1, 3 und 6 µg) als Maß für einen Gefäßendothelschaden ausgelöst. Veränderungen des Perfusionsdruckes durch AT II, HPV oder Bradykinin wurden als Druckunterschied (Δp) in mmHg dargestellt. Statistik: einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) und Student-Newman-Keuls-Post-hoc-Test ($p < 0.05$, Mittelwerte ± Standardfehler), für nicht parametrische Daten Kruskal-Wallis ANOVA on Ranks, gefolgt von Dunn's Test ($p < 0.05$).

### Ergebnisse

Nach Etablierung des isoliert perfundierten Lungenkreislaufes zeigten die Tiere der verschiedenen Gruppen die gleiche Vasokonstriktion nach AT II-Applikation (Daten nicht dargestellt). Die Hauptergebnisse der Studie sind in den Abbildungen A-C (Abb. 1) gezeigt.

### Interpretation

Exhaliertes NO als Maß der NOS-Aktivität wurde sowohl in der Früh-(6h) als auch in der Spätphase (24h) der Sepsis durch kontinuierliche epidurale Bupivacain-Gabe supprimiert. Im Gegensatz dazu zeigte die HPV sowie die Bradykinin-induzierte Vasokonstriktion bei septischen Tieren, die Bupivacain epidural erhielten, eine zeitabhängige Modulation; im gesunden Tier zeigte sich eine Reduktion der HPV durch epidurale Bupivacain-Gabe.
Die vorliegende Studie demonstrierte eine zeitabhängige Wirkung epiduraler Lokalanästhetika auf den pulmonalen Endothelschaden, die in der Frühphase der Sepsis protektiv zu sein scheint. Weiterführende Studien zum Einfluss der epiduralen Lokalanästhetika-Gabe auf pulmonale Vasoregulationsmechanismen im gesunden und septischen Tier sind notwendig.

### Literatur


1. **Sielenkamper AW, Eicker K, Van Aken H.** Thoracic epidural anesthesia increases mucosal perfusion in ileum of rats. Anesthesiology 2000;93(3):844-51.
2. **Fischer LG, Freise H, Hilpert JH, Wendholt D, Lauer S, Van Aken H, Sielenkamper AW.** Modulation of hypoxic pulmonary vasoconstriction is time and nitric oxide dependent in a peritonitis model of sepsis. Intensive Care Med 2004;30(9):1821-8.
3. **Freise H, Anthonsen S, Fischer LG, Van Aken HK, Sielenkamper AW.** Continuous thoracic epidural anesthesia induces segmental sympathetic block in the awake rat. Anesth Analg 2005;100(1):255-62.


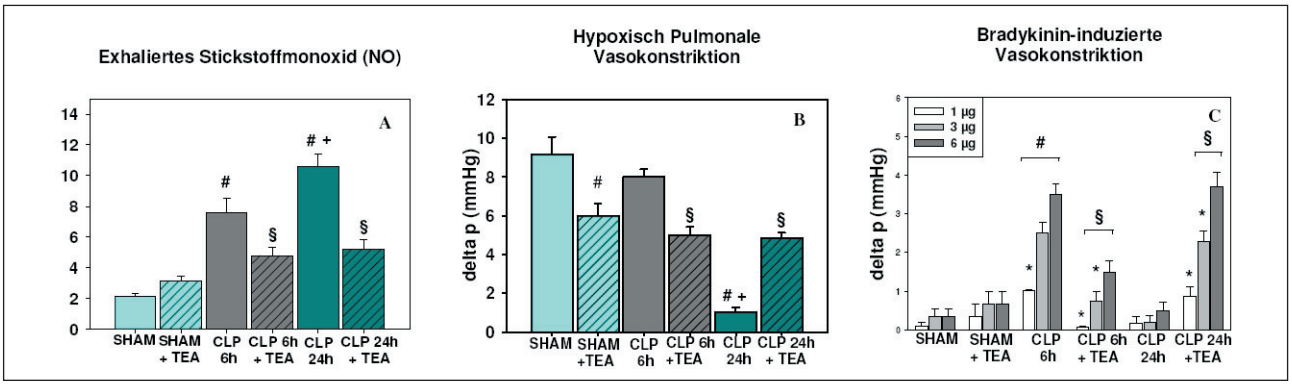


Abb. 1: A-C: # = $p < 0.05$ vs. SHAM, § = $p < 0.05$ vs. CLP 6h / CLP 24h, + = $p < 0.05$ vs. CLP 6h, * = $p < 0.05$ vs. BK 6 innerhalb der Gruppe.

## Effektivität einer hyperthermen Präkonditionierung und LL-37-Therapie im Sepsismodell der Ratte


**T. Vassiliou[1], E. Gurschi[1], A. Bauhofer[2], R. Bals[3], H. Wulf[3] und A. Torossian[3]**

[1] Klinik für Anästhesie und Intensivtherapie,
[2] Institut für Theoretische Chirurgie,
[3] Klinik für Pulmonologie,
Universitätsklinikum Gießen und Marburg wGmbH,
Standort Marburg


### Fragestellung

Antimikrobielle Peptide (AMP) gehören zum sog. innaten Immunsystem [1]. Das rekombinante AMP LL-37 bindet Lipopolysaccharid und blockiert so die biologischen Eigenschaften von Endotoxin [2]. - Eine hypertherme Präkonditionierung soll gleichfalls über eine Freisetzung von „Heat shock"-Proteinen (HSP) die Immunabwehr verbessern [3]. In dieser Studie testeten wir die Hypothese, dass durch eine hypertherme Präkonditionierung in Kombination mit einer LL-37-Therapie in septischen Ratten die Mortalität gesenkt, HSP gebildet und die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine reduziert wird.

### Methodik

Mit Genehmigung durch das örtliche Regierungspräsidium untersuchten wir 72 männliche Wistarratten. Nach Randomisierung wurden alle Tiere in Fentanyl/DHB-Analgesie nach i.v. Antibiotikaprophylaxe laparotomiert und mit einer standardisierten humanen Stuhlsuspension infiziert (PCI). Sie erhielten in Gruppe I: nur eine PCI (Kontrolle), in Gruppe II: eine hypertherme Präkonditionierung (41°C über 1 h, 24 h vor PCI), in Gruppe III: eine Therapie mit 0,5 mg/kg LL-37 eine Stunde nach PCI, oder in Gruppe IV: eine LL-37-Therapie in Kombination mit einer hyperthermen Präkonditionierung. Der primäre Endpunkt war die 120-Stunden-Überlebensrate. Sekundäre Endpunkte waren die Plasmazytokinspiegel von HSP-70, TNF-α, MIP 2 und IL-6 1 h nach PCI.

### Ergebnisse

Von den Kontrolltieren überlebten 44% eine PCI, mit LL-37-Therapie waren es 61% und nach hyperthermer Präkonditionierung 63%. Die Kombination von hyperthermer Präkonditionierung mit LL-37-Therapie verbesserte die Überlebensrate signifikant auf 83% ($p<0{,}02$, Abb. 1). Eine Freisetzung von HSP-70 konnten wir in keiner Versuchsgruppe nachweisen, jedoch waren die Plasmaspiegel aller proinflammatorischen Zytokine am niedrigsten in der Gruppe IV, die eine Kombination von hyperthermer Präkonditionierung mit LL-37-Therapie erhielt. Dabei war hier die Reduktion von MIP 2 und IL-6 im Vergleich mit der Kontrollgruppe signifikant (1,5±1,5 zu 11±6 pg/ml, $p< 0{,}02$ und 13±8 zu 86±31 pg/ml, $p< 0{,}02$, Abb. 2).

### Interpretation

Die Überlebensrate nach intraabdomineller Sepsis ist in unserem Modell nach hyperthermer Präkonditionierung in Kombination mit antimikrobieller (LL-37)-Therapie erhöht. Eine Erklärung hierfür könnte die Erniedrigung von proinflammatorischen Zytokinen (IL-6 und TNF-$\alpha$) sowie des Chemokins MIP-2 sein.


### Literatur

1. **Koczulla AR, Bals R.** Antimicrobial peptides: current status and therapeutic potential. Drugs 2003;63:389-406.
2. **Hirata M, Zhong J, Wright SC, Larrick JW.** Structure and functions of endotoxin-binding peptides derived from CAP18. Progress in Clinical & Biological Research 1995;392:317-326.
3. **Villar J, Ribeiro SP, Mullen JB, Kuliszewski M, Post M, Slutsky AS.** Induction of the heat shock response reduces mortality rate and organ damage in a sepsis-induced acute lung injury model. Crit Care Med 1994; 22:914-921.


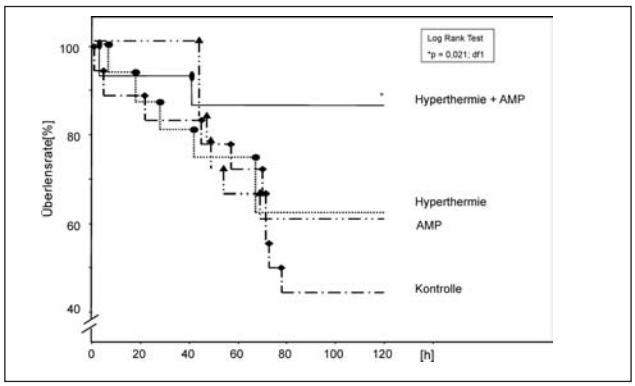


Abb. 1

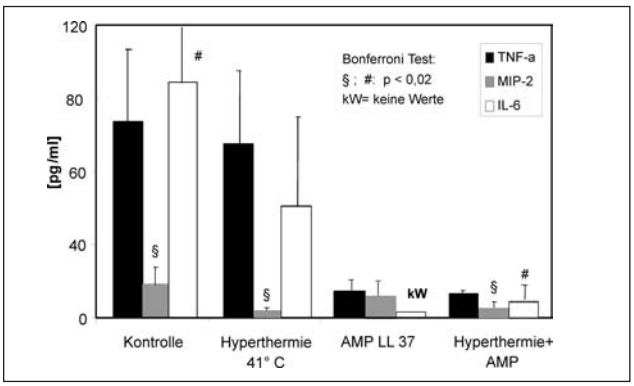


Abb. 2

## Antiinflammatorische Effekte von Sevoflurane und von milder Hypothermie auf die systemische und pulmonale Entzündungsreaktion während experimenteller Endotoxinämie bei der Ratte


**Ch. Hofstetter, M. Flondor, K.A. Boost** und **B. Zwißler**

Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main


### Fragestellung

Die präemptive Applikation von Sevoflurane (1 MAC) sowie die von tiefer Hypothermie (<27°C) zeigen antiinflammatorisches Wirkprofil bei experimenteller Ischämie-Reperfusion (Sevoflurane) [1] bzw. Endotoxinämie (Hypothermie) [2]. Mit der vorliegenden Untersuchung sollte geklärt werden, ob die therapeutische Applikation von Sevoflurane bzw. von milder Hypothermie (33°C) auch nach bereits stattgehabter Induktion einer experimentellen Endotoxinämie antiinflammatorisches Wirkprofil aufweisen.

### Methodik

Nach Genehmigung durch die Tierversuchskommission erfolgte die Untersuchung an 24 männlichen SD-Ratten (450±50g). Nach Einleitung der Narkose (Pentobarbital/Fentanyl, i.p.) wurden die Tiere tracheotomiert (13G Angiocath) und mit einem neonatologischen Respirator beatmet (Stephanie®, $p_{max}$: 18 mbar, PEEP: 4 mbar, Frequenz: 40 /min, $F_IO_2$: 0.3). Die Gefäße einer Leiste wurden kanüliert (Polyurethan-Katheter, 20G). Die Narkose wurde durch Infusion von Pentobarbital und Fentanyl i.v. weitergeführt. Anschließend erfolgte die zufällige Zuteilung der Tiere zu folgenden Versuchsgruppen: (1) Induktion einer Endotoxinämie durch i.v.-Injektion von Lipopolysaccharid (LPS, 5 mg/kg, 055:B5, Sigma); keine antiinflammatorische Therapie und normotherme Körpertemperatur von 37-38°C (LPS-Normothermie). (2) Bei den Tieren der LPS-Hypothermie-Gruppe erfolgte ab 15 min. nach LPS-Injektion das Absenken der Körpertemperatur mittels inguinaler Eisbeutel auf 33(±0.3)°C. (3) In der LPS-Sevoflurane-Gruppe wurde 15 min. nach LPS-Injektion Sevoflurane in einer Dosierung von 1 MAC (minimale alveoläre Konzentration, 2.0 Vol%, Vamos, Draeger) dem Atemgas mittels Vapor beigemischt; die Tiere blieben normotherm, und die Narkose wurde durch Infusion von Fentanyl supplementiert. (4). Die Tiere der normothermen Kontrollgruppe (Kontrolle) erhielten eine Injektion physiologischer Kochsalzlösung (NaCl 0.9%) als LPS-Placebo. Sechs Stunden nach LPS bzw. Placebo-Gabe wurde Blut abgezogen, der Thorax eröffnet und eine bronchoalveoläre Lavage (10x10 ml gepufferter NaCl 0.81%) durchgeführt. Eine Quantifizierung der systemischen und pulmonalen Entzündungsreaktion erfolgte mittels Bestimmung der proinflammatorischen Zytokine TNF$\alpha$ und IL-1$\beta$ sowie des antiinflammatorischen IL-10 im Blutplasma (ELISA) bzw. der Freisetzung von Nitrit aus ex vivo kultivierten Alveolarmakrophagen (Griess Methode).

### Ergebnisse

Die therapeutische Applikation von Sevoflurane reduzierte die Plasmakonzentrationen sowohl von TNF$\alpha$ (-60%, $p<.05$) als

auch von IL-1β (-68%, p<.05) verglichen mit LPS-Normothermie signifikant. Milde Hypothermie verminderte ebenfalls signifikant den Gehalt von Plasma-TNFα (-46%, p<.05), jedoch nicht den von IL-1β. Im Gegensatz zu Sevoflurane erhöhte die milde Hypothermie die Plasmakonzentration von IL-10 um rund das 5-fache des Wertes der LPS-Normothermie-Gruppe. Der Nitritgehalt im Überstand von für 24h kultivierten Alveolarmakrophagen (200.000/200µl) war sowohl in der LPS-Sevoflurane- (-83%) als auch der LPS-Hypothermie-Gruppe (-73%) gegenüber LPS-Normothermie signifikant reduziert (Tab. 1).

### Interpretation

Sowohl Sevoflurane als auch milde Hypothermie besitzen auch bei Applikation nach Induktion einer experimentellen Endotoxinämie ein antiinflammatorisches Wirkspektrum in vivo. Im Gegensatz zu Sevoflurane bewirkt milde Hypothermie dabei das Ansteigen messbarer Konzentrationen von IL-10 im Plasma, nicht jedoch eine Reduktion von IL-1β, wie sie für die tiefe Hypothermie in Lungengewebe gezeigt werden konnte [3]. Daher vermuten wir eine Temperaturabhängigkeit dieses Effektes sowie dessen Unabhängigkeit von einer Induktion von IL-10.

### Literatur


1. **Lee HT et al.** Differential protective effects of volatile anesthetics against ischemia-reperfusion injury in vivo. Anesthesiology 2004;101:1313-1324.
2. **Lim CM et al.** Hypothermia protects against endotoxin-induced acute lung injury in rats. Intensive Care Med 2003;29:453-459.
3. **Sarcia PJ et al.** Hypothermia attenuates injury in the lungs of endotoxemic rats. Shock 2003;20:41-45.


Tab. 1

| | Kontrolle, n=6 | LPS-Normothermie, n=6 | LPS-Sevoflurane, n=6 | LPS-Hypothermie, n=6 |
|---|---|---|---|---|
| TNFα (pg/ml) | 22.4 (37) | 1151 (725)* | 467 (498)† | 622 (754)§ |
| IL-1β (pg/ml) | 5.4 (29) | 1300 (815)* | 375 (355)† | 1221 (1185) |
| IL-10 (pg/ml) | 54 (77) | 288 (41)* | 218 (206) | 1381 (772)§ |
| Nitrit (nmol/24h) | 2.7 (1.6) | 22.3 (8)* | 3.7 (2)† | 6.2 (4)§ |

Daten als Median (Interquartilsabstand). ANOVA Rangsummentest, post hoc: Student-Newman-Keuls-Test, (p<.05): * LPS-Normothermie vs. Kontrolle; † LPS-Sevoflurane vs. LPS-Normothermie, § LPS-Hypothermie vs. LPS-Normothermie.

© Anästh Intensivmed 2006;47:387-426 DIOmed Gesellschaft mit beschränkter Haftung