

Abstracts der 21. 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 **23. - 24.02.2007** 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 **Ausschreibung für die Wissenschaftlichen Arbeitstage 2008 und das DGAI-Forschungsstipendium der Fresenius-Stiftung** finden Sie auf der Seite 403.

Aquaporin-5-Gene-Promotor-Poly-morphismus verstärkt die Suppression des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems durch Salzbelastung

M. Adamzik^{1,3}, U.H. Frey³, K. Bitzer¹, R. Schmieder⁴, G. Heusch², W. Siffert¹ und J. Peters³

¹ Institut für Pharmakogenetik,

² Institut für Pathophysiologie,

³ Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin, Universitätsklinikum Essen, Universität Duisburg-Essen

⁴ Medizinische Klinik 4 - Nephrologie und Hypertensiologie, Universitätsklinikum Erlangen, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

Fragestellung

Der Wassertransport im humanen Gewebe wird hauptsächlich durch eine Familie von Membranproteinen reguliert, den Aquaporinen [1]. Die Aquaporinexpression beeinflusst verschiedenste physiologische Prozesse [2], insbesondere die Regulation des Wasser- und Salzhaushaltes [3].

Aquaporin-5 (AQP5) ist ein ubiquitär exprimiertes Protein, wobei das Fehlen von AQP5 bei AQP5-Knock-out-Mäusen zu einem gestörten Wasserhaushalt in Lunge, Auge und Speicheldrüsen führt [3]. Da funktionell wirksame Varianten des AQP5-Gens von physiologischer Bedeutung sein könnten, wurde a) nach Varianten im AQP5-Gen gesucht und b) getestet, dass die Ausprägung einer durch Salzbelastung induzierten Suppression des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) von AQP5-Promotor Genvarianten abhängig ist.

Methode und Ergebnisse

Zunächst wurde ein im AQP5-Promoter liegender Gen-Polymorphismus A(-1364)C identifiziert, wobei der Basenaustausch Adenin zu Cytosin zu einer verstärkten Bindung von Transkriptionsfaktoren im Electrophoretic Mobility Shift Assay und einer um ca. 50% reduzierten transkriptionellen Aktivität im Zellsystem (Alkalische Phosphatase Reporter Assay) führte. Des Weiteren war im humanen Herzgewebe von C-Allel-Trägern im Vergleich zu A-Allel-Trägern die AQP5 mRNA-Konzentration (Real-time PCR) um 50% geringer. Auch auf Proteinebene (Westernblot) konnte dieser Unterschied ($p = 0.002$) zwischen den Genotypen gezeigt werden. Um die phänotypische Variabilität zu testen, wurde der Einfluss des Gen-Polymorphismus A(-1364)C auf das Renin-Aldosteron-Angiotensin-System bei 103 jungen (26 ± 3 Jahren), gesunden Probanden (Genotypenverteilung: AA: $n = 68$, AC: $n = 34$, CC: $n = 1$) unter Salzbelastung (13 g/Tag) untersucht (positives Ethikvotum und Einwilligung der Probanden lagen vor). Nach einer Woche war die Angiotensin II Plasmakonzentration bei C-Allel-Trägern um 25 % reduziert, bei A-Allel-Trägern jedoch nur um 2% ($p = 0.012$). Des Weiteren war bei C-Allel-Trägern die Aldosteronkonzentration um 34% reduziert, bei A-Allel-Trägern

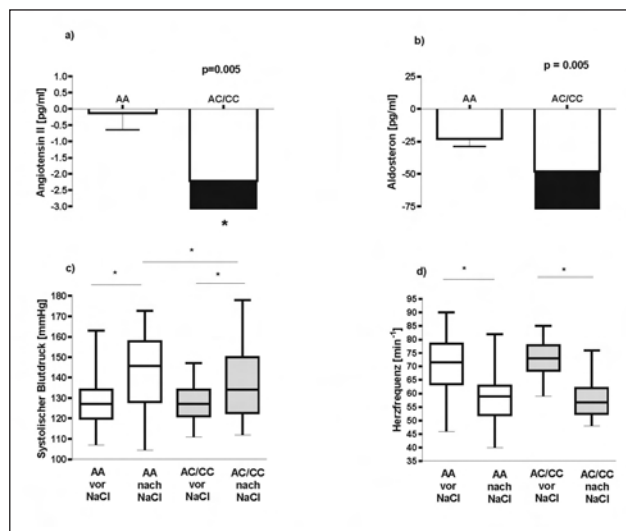


Abb. 1

dagegen nur um 19% ($p = 0.005$). Beide Genotypen zeigten unter Salzbelastung einen Anstieg des systolischen Blutdrucks ($p < 0.01$), der bei A-Allel-Trägern ausgeprägter war ($p = 0.029$). Die Reaktion der Herzfrequenz auf Salzbelastung unterschied sich nicht zwischen den Genotypen. Das Kollektiv befand sich im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.

Interpretation

Wir weisen erstmalig einen funktionellen Polymorphismus im AQP5-Promoter nach, der 1) die AQP5-Expression und 2) Herzkreislaufsystem und RAAS beeinflusst, da A-Allel-Träger eine wesentlich geringer ausgeprägte Suppression des Renin-Aldosteron-Angiotensin-Systems unter Salzbelastung und stärkeren Blutdruckanstieg als C-Allel-Träger zeigten.

Literatur

1. Agre P, Brown D, Nielsen S. Aquaporin water channels: unanswered questions and unresolved controversies. *Curr Opin Cell Biol* 1995;7:472-483.
2. Agre P. Aquaporin null phenotypes: the importance of classical physiology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:9061-9063.
3. Verkman AS, Yang B, Song Y, Manley GT, Ma T. Role of water channels in fluid transport studied by phenotype analysis of aquaporin knockout mice. *Exp Physiol* 2000;85 Spec No:233S-241S.

Korrespondenzadresse: Michael.Adamzik@uk-essen.de

* Rechte vorbehalten

Der Austausch einer einzelnen Aminosäure beeinflusst die Interaktion des Propofols mit dem α_1 -Glycin-Rezeptor

J. Ahrens¹, M. Leuwer³, S. Stachura¹, K. Krampff², D. Belelli⁴, J.J. Lambert⁴, S. Piepenbrock¹ und G. Haeseler¹

¹ Zentrum Anästhesiologie,

² Abt. Neurologie und Klinische Neurophysiologie, Medizinische Hochschule Hannover

³ Department of Anaesthesia, University of Liverpool, U.K.

⁴ Neurosciences Institute, Ninewells Hospital and Medical School, University of Dundee, U.K.

Fragestellung

Das Anästhetikum Propofol moduliert in vitro sowohl inhibitorische γ -Aminobuttersäure- (GABA_A) Rezeptoren [1] als auch die strukturell eng verwandten Glycin-Rezeptoren [2]. Ein Aminosäureaustausch in der β -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors macht diesen Rezeptor unempfindlich für Propofol [1]. Der komplementäre Aminosäurerest in der α_1 -Untereinheit des Glycin-Rezeptors ist Serin an der Position 267. Ziel dieser Studie war es, die Interaktion des Propofols mit dem Glycin-Rezeptor zu untersuchen, wenn Serin 267 gegen das polare Methionin (S267M) oder die größere verzweigte Aminosäure Isoleucin (S267I) ausgetauscht wurde.

Methodik

Glycin-Rezeptor- α_1 -Untereinheiten (Wildtyp (WT), S267I und S267M) wurden transient in HEK 293-Zellen exprimiert. Chlorid-Einwärtsströme wurden über der ganzen Zelle registriert nach ultraschneller Applikation (a) des natürlichen Agonisten Glycin in supramaximaler Konzentration, (b) Co-Applikation einer EC₂₀ von Glycin und Propofol in ansteigender Konzentration und (c)

Propofol in ansteigender Konzentration ohne den natürlichen Agonisten. Rezeptor-Coaktivierung (I-I₀) wurde ausgedrückt als % Potenzierung der Glycin-EC₂₀ (I₀) nach der Formel $E(\%) = 100 [(I-I_0)/I_0]$. Anpassung einer Hill-Funktion an die gegen die applizierte Konzentration aufgetragenen Daten ergab die EC₅₀ sowie den Steigungsfaktor n für die Co-Aktivierung [2].

Ergebnisse

Beide Mutanten zeigten (a) eine geringere Glycin-Empfindlichkeit gegenüber WT (EC₂₀ für Rezeptor-Aktivierung durch Glycin lag bei 30 μ M gegenüber 3 μ M bei WT), (b) eine deutlich reduzierte Empfindlichkeit gegenüber Propofol hinsichtlich der Co-Aktivierung der Stromantwort auf eine EC₂₀ von Glycin durch Propofol und (c) eine aufgehobene Direktaktivierung durch Propofol ohne Anwesenheit des natürlichen Agonisten.

Interpretation

Diese Ergebnisse zeigen, dass zunehmende Größe und Polarität des Aminosäurerestes in Position 267 der α_1 -Untereinheit des Glycin-Rezeptors entweder die Bindung von Propofol an den Rezeptor behindert oder den Effekt-Transduktionsmechanismus stört. Die Identifikation der Position 267 als Schlüsselposition für die Vermittlung der Propofol-Effekte wird es ermöglichen, im Knock-in-Mausmodell behaviorale Propofol-Effekte, die über Glycin-Rezeptoren vermittelt werden, genauer zu untersuchen.

Literatur

1. Jurd R, Arras M, Lambert S, Drexler B, Siegwart R, Crestani F, et al. General anesthetic actions in vivo strongly attenuated by a point mutation in the GABA(A) receptor beta3 subunit. *FASEB J* 2003;17:250-252.

2. Ahrens J, Haeseler G, Leuwer M, Mohammadi B, Krampff K, Dengler R, et al. 2,6 di-tert-butylphenol, a non-anesthetic propofol analogue, modulates $\alpha 1$ glycine receptor function in a manner distinct from propofol. *Anesth Analg* 2004;99:91-96.

Korrespondenzadresse: ahrens_joerg@web.de

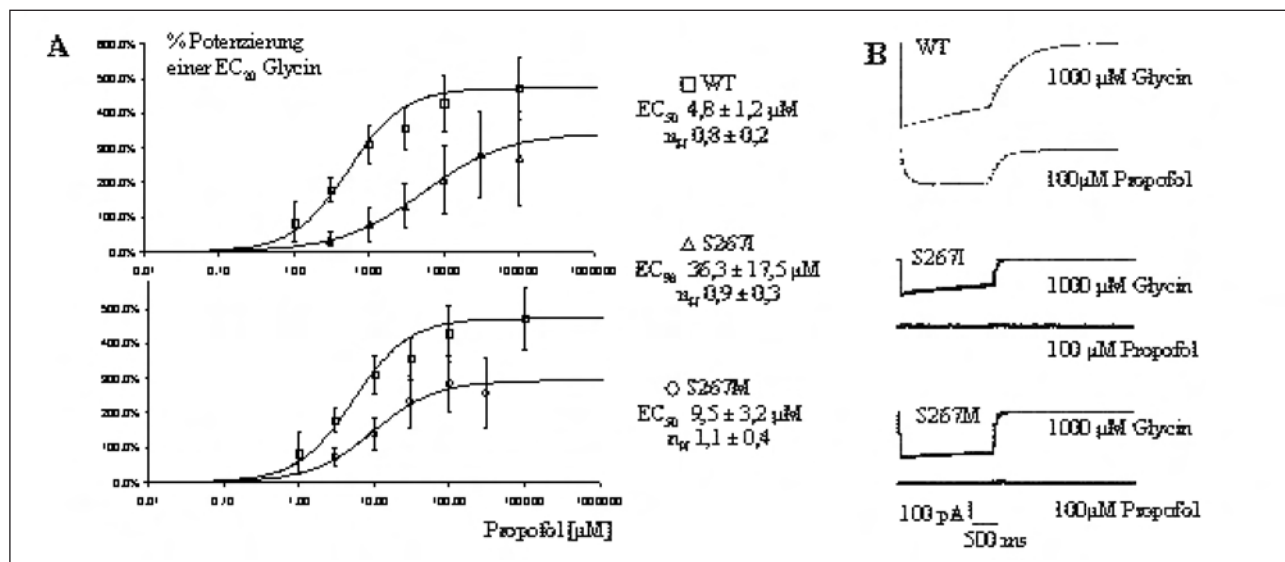


Abb. A: Potenzierung (%) der Stromantwort auf eine EC₂₀ von Glycin durch Propofol (MW \pm SD aus jeweils 4-5 Experimenten), aufgetragen gegen die mit 30 μ M (beide Mutanten) oder 3 μ M (WT) Glycin co-applizierte Propofol-Konzentration. In S267I (oberes Diagramm, Dreiecke) und S267M (unteres Diagramm, Kreise) war die Konzentrations-Wirkungskurve gegenüber WT (beide Diagramme, Vierecke) nach rechts verschoben und erreichte einen geringeren Maximal-effekt. Linien repräsentieren Anpassungen von Hill-Funktionen an die Daten mit den angegebenen Parametern.

Abb. B: Repräsentative Stromspuren während 2s Applikation des natürlichen Agonisten Glycin in supramaximaler Konzentration (jeweils obere Spur) oder Propofol 100 μ M ohne Glycin (jeweils untere Spur). In WT induziert Propofol einen deutlichen Einwärtsstrom. In S267I (vierte Spur von oben) und S267M (sechste Spur von oben) ist keine Direktaktivierung durch Propofol zu erkennen.

Eine Prophylaxe mit Heparin plus Granulozyten-Kolonie-Stimulierendem-Faktor (G-CSF) verbessert die Überlebensrate im Sepsismodell der Ratte

C. Arndt¹, A. Bauhofer², H. Wulf¹ und A. Torossian¹

¹ Klinik für Anästhesie und Intensivtherapie,

² Institut für Theoretische Chirurgie, Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Marburg

Fragestellung

Eine Heparinprophylaxe gehört zum perioperativen Standard bei abdominalchirurgischen Eingriffen. Heparin ist bekanntermaßen ein Antikoagulant, das aber auch anti-inflammatorische Eigenschaften besitzt [1]. Der Granulozyten-Kolonie stimulierende Faktor (G-CSF) ist ein hämatopoetischer Wachstumsfaktor mit ebenfalls immunmodulatorischen Wirkungen. Eine positive Interaktion von Heparin mit G-CSF konnte durch Elektrophorese nachgewiesen werden [2,3], jedoch gibt es bislang keine Untersuchungen zur Effektivität einer kombinierten Heparin plus G-CSF Prophylaxe auf die Überlebensrate im Sepsismodell.

Methodik

Mit Genehmigung durch das zuständige Regierungspräsidium untersuchten wir 60 männliche Wistar-Ratten. Alle Tiere wurden in Fentanyl/DHB-Analgesie nach i.v. Antibiotikaprophylaxe (Levofloxacin/Metronidazol 3/1 mg/kg) laparotomiert und mit einer standardisierten humanen Stuhlsuspension peritoneal kontaminiert und infiziert (PCI). Eine Heparin-Prophylaxe (800 I.E./kg Liquemin® s.c., 12 h vor und nach Infektion) wurde in einer Pilotstudie an 6 Tieren getestet. Anschließend wurden 54 Tiere randomisiert zu folgenden Behandlungen: Gruppe I (Kontrolle): nur PCI und Antibiose (AB), oder Gruppe II: PCI + AB + Heparin-Prophylaxe, oder Gruppe III: PCI + AB + Heparin plus G-CSF Prophylaxe (20 µg/kg s.c., 12 h vor und 12 und 36 h nach Infektion). Der primäre Studienendpunkt war die Überlebensrate nach 120 Stunden. Überlebensraten wurden mit dem χ^2 -Test und Kaplan-Meier-Überlebenskurven mit dem Log-Rank-Test analysiert.

Ergebnisse

Die Pilotstudie verlief erfolgreich, insbesondere wurden keine Blutungskomplikationen beobachtet. Auch in der Hauptstudie konnten alle Tiere in die Auswertung eingeschlossen werden. Das Ge-

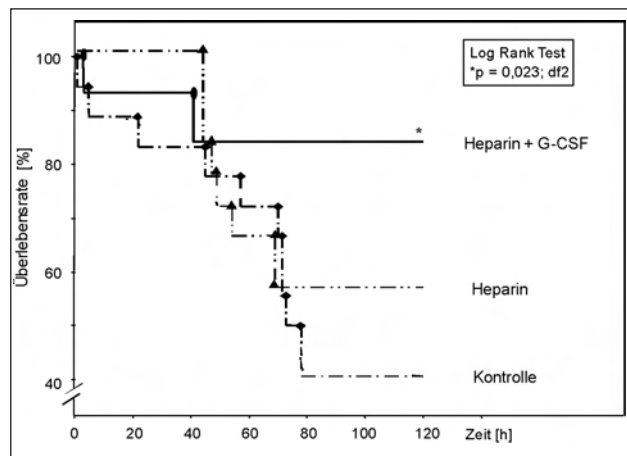


Abb. 1

wicht der Ratten war in allen Gruppen ähnlich und betrug im Mittel 250 ± 30 g. Von den Kontrolltieren überlebten 7 von 18 Tieren (39%) eine PCI, mit zusätzlicher Heparin-Prophylaxe überlebten 10 von 18 Tieren (56%), jedoch erst nach Heparin plus G-CSF Prophylaxe war das Überleben signifikant auf 15 von 18 Tieren (83%) verbessert. ($p = 0,023$, $df2$ und $p = 0,015$, $df1$, Abb. 1).

Interpretation

Die Überlebensrate nach intraabdomineller Sepsis ist in unserem Modell erst nach Kombination einer Heparin plus G-CSF Prophylaxe signifikant verbessert. Eine Erklärung hierfür könnte in der positiven Interaktion beider Substanzen liegen [2,3]. Weitere Untersuchungen zur Wirkungsweise, insbesondere auch anti-inflammatorischer Effekte einer subantikoagulatorischen Heparindosierung stehen aus.

Literatur

1. Wang L, Brown JR, Varki A, Esko JD. Heparin's anti-inflammatory effects require glucosamine 6-O-sulfation and are mediated by blockade of L- and P-selectins. *J Clin Invest* 2002;110:127-136.
2. Liang A, He X, Du Y, Wang K, Fung Y, Lin B. Capillary zone electrophoresis investigation of the interaction between heparin and granulocyte colony stimulating factor. *Electrophoresis* 2004;25:870-875.
3. Liang A, Yapeng Ch, Liu X, Du Y, Wang K, Qian S, Lin B. Separation, identification and interaction of heparin oligosaccharides with granulocyte colony stimulating factor using capillary electrophoresis and mass spectrometry. *Electrophoresis* 2005;26:3460-3467.

Korrespondenzadresse: arndtch@staff.uni-marburg.de

Sevofluran hemmt die über glycinerge Interneurone vermittelte reziproke Ia-Inhibition im Menschen

J.H. Baars, M. Benzke, F. von Dincklage, J. Reiche und B. Rehberg

Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin, Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Mitte und Campus Virchow-Klinikum

Fragestellung

Die hemmende neuronale Übertragung im Rückenmark wird maßgeblich durch Glycin-Rezeptoren vermittelt. Ihre spinale Häufung und der Nachweis, dass volatile Anästhetika glycinerge Effekte an ligandengesteuerten Ionenkanälen potenzieren, lässt eine Beteiligung dieser Rezeptoren an der Vermittlung der chirurgischen Im-

mobilität vermuten. Diese Vermutung wird teilweise tierexperimentell durch Studien mit spezifischen Antagonisten und Studien an Tieren mit mutierten Glycin-Rezeptoren unterstützt [1].

In dieser Studie untersuchten wir nach der Methode von Crone et al. [2] die disynaptische reziproke Ia-Inhibition, einen spezifisch glycinergen spinalen Schaltkreis am Menschen.

Methodik

Nach Genehmigung der Ethikkommission der Charité wurde die Studie an 6 Probanden (23-31 Jahre) 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 (Testreflex) wurde alle 6 Sekunden durch Stimulation des N. tibialis ausgelöst und über dem M. soleus abgeleitet. Die Inhibition des H-Reflexes wurde durch Stimulation des N. pero- ▶

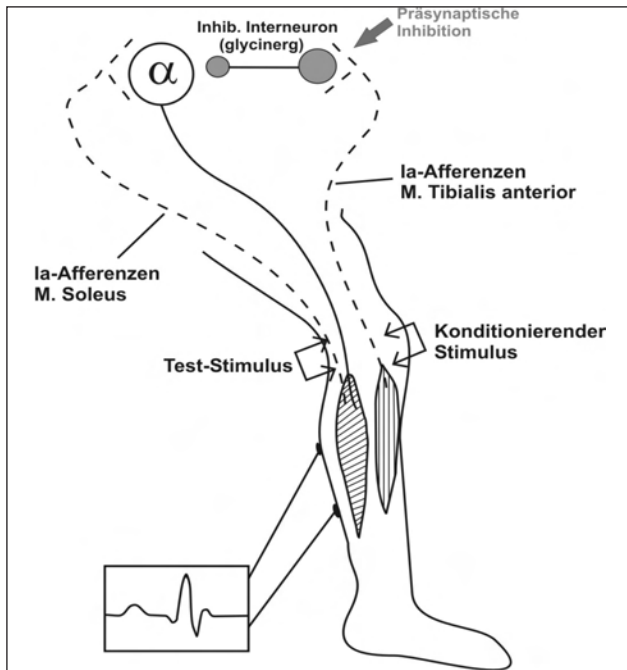


Abb. 1

neus (konditionierender Stimulus) auf Höhe des Fibulaköpfchens mittels einer monopolen Kugelelektrode erreicht. Dieser konditionierende Stimulus führte über den in der Abbildung gezeigten Schaltkreis zu einer Hemmung der Motoneurone und damit zu einer Reduktion der H-Reflex-Amplitude um ca. 10-30%. Um eine disynaptische Verschaltung zu gewährleisten, wurde zwischen den Reizen ein Zeitabstand von 2 ms gewählt. Konditionierte (Stimulation N. tibialis und N. peroneus) und unkonditionierte (Stimulation ausschließlich N. tibialis) Reize erfolgten in zufälliger Reihenfolge.

Die Messungen wurden in drei Zuständen durchgeführt: a) vor, b) während und c) mindestens 30 Minuten nach Ende der Sevofluranapplikation (2. Kontrolle). Um zu den verschiedenen Messzeitpunkten eine vergleichbare Anzahl von motorischen Einheiten zu erregen, war die Größe des unkonditionierten H-Reflexes durch Anpassung der Stimulationsstromstärke bei allen Messungen gleich. In jedem Zustand wurden jeweils mindestens 75 konditionierte und unkonditionierte Reize gemessen. Die Mittelwerte der prozentualen Reduktion der konditionierten H-Reflexamplituden im Vergleich der unkonditionierten H-Reflexamplitude unter Sevofluranapplikation wurden mittels einer Varianzanalyse mit Messwiederholung mit beiden Kontrollwerten verglichen (Bonferoni Post-Test $p < 0.05$).

Ergebnisse

Die Graphik zeigt die Mittelwerte der Reduktion des konditionierten H-Reflexes aller Probanden. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler. Die statistische Analyse ergab eine signifikante Abschwächung der durch die Peroneus-Stimulation induzierten

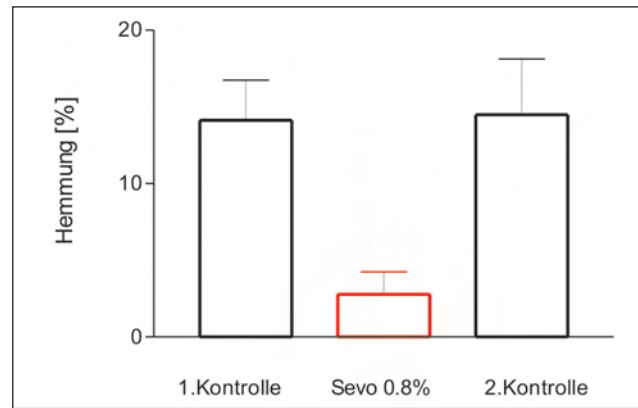


Abb. 2

Inhibition des H-Reflexes (Varianzanalyse mit Messwiederholung, Bonferoni Post-Test: $P(\text{vor-Sevofluran}) < 0.05$, $P(\text{vor-nach}) > 0.05$, $P(\text{Sevofluran-nach}) < 0.05$).

Interpretation

Die Ergebnisse zeigen, dass Sevofluran die glycinerg vermittelte reziproke Ia-Inhibition nicht entsprechend seiner potenzierenden Eigenschaften am Glycin-Rezeptor verstärkt, sondern reduziert. Als mögliche Gründe für diesen scheinbaren Widerspruch zu molekularen Studien kommen unter anderem präsynaptische inhibitorische Effekte von Sevofluran in Betracht: 1.) Sevofluran kann direkt die synaptische Transmission des inhibitorischen Interneurons hemmen. Ein solcher Effekt stünde jedoch im Widerspruch zur grundsätzlichen Annahme, dass Anästhetika hemmende Effekte verstärkten und exzitatorische Effekte abschwächten [1]. 2.) Die glutamaterge Übertragung des konditionierenden Stimulus von den Ia-Afferenzen des N. peroneus auf das inhibitorische Interneuron kann präsynaptisch gehemmt werden. Ein solcher Effekt konnte für Halothan an Ia-Afferenzen, die auf Motoneurone projizieren, bei Ratten nachgewiesen werden [3].

Diese Untersuchung verdeutlicht, dass in vitro nachgewiesene Effekte von Anästhetika selbst innerhalb einfacher Schaltkreise in vivo durch vermutlich präsynaptische Mechanismen überlagert und so nicht immer bestätigt werden können.

Literatur

1. Sonner JM, Antognini JF, Dutton RC, et al. Inhaled anesthetics and immobility: Mechanisms, Mysteries, and minimum alveolar anesthetic concentration. *Anesth Analg* 2003;97:718-40.
2. Crone C, Hultborn H, Jespersen B, Nielsen J. Reciprocal Ia inhibition between ankle flexors and extensors in man. *J Physiol* 1987;389:163-185.
3. Kullmann DM, Martin RL, Redman SJ. Reduction by general anaesthetics of group Ia excitatory postsynaptic potentials and currents in the cat spinal cord. *J Physiol* 1989;412:277-296.

Korrespondenzadresse: jan.baars@charite.de

Wie beeinflusst Propofol das Gedächtnis? – Eine funktionelle MRT-Studie

S. Berg¹, S. Zysset² und W. Heinke¹

¹ Klinik und Poliklinik für Anästhesie und Intensivmedizin, Universitäts-Klinikum Leipzig, Universität Leipzig

² Max Planck Institut für Kognitions- und Neurowissenschaften Leipzig

Fragestellung

Jede Information gelangt über das sensorische Gedächtnis in das Arbeitsgedächtnis, wird dort vorübergehend bereitgehalten und bei Relevanz im Langzeitgedächtnis gespeichert. Wie Anästhetika die Aufnahme und Speicherung von Informationen im Gedächtnis beeinflussen ist unklar [1]. Die an diesen Prozessen beteiligten neuronalen Netze lassen sich mit der funktionellen Magnetresonanztomographie (fMRT) darstellen [2]. In dieser Studie sollte in vivo untersucht werden, ob verschiedene Gedächtnisspeicher gleichermaßen sensibel auf Anästhetika reagieren und ob niedrige Anästhetikakonzentrationen eine globale oder selektive Aktivitätsabnahme im Kortex hervorrufen. An Probanden wurde die Wirkung von sehr niedrig dosiertem Propofol auf das Arbeitsgedächtnis und auf Formen des Langzeitgedächtnisses (episodisch, semantisch) mittels fMRT untersucht.

Methodik

Mit Genehmigung der örtlichen Ethikkommission wurden 25 freiwillige männliche Probanden doppelblind randomisiert (3 Gruppen: Kontrollgruppe [NaCl 0,9%], Propofol 0,6 µg/ml und Propofol 1,2 µg/ml – Becton Dickinson TCI Infusionssystem) und mittels „blood oxygenation level dependent“ (BOLD) – Kontrast-MRT untersucht. Die ersten 10 Minuten des 60-minütigen Experimentes dienten als Anflutungszeit, um die Zielkonzentration von Propofol zu erreichen. Während der Anflutung wurde bereits funktionell gescannt, um Einflüsse von Propofol auf das BOLD-Signal unter Ruhebedingungen auszuschließen. Im Anschluss bearbeiteten die Probanden verschiedene episodische, semantische und Arbeitsgedächtnisaufgaben. Danach wurden sie aufgefordert, mehrfach kontrolliert zu hyperventilieren bzw. mehrfach für 30s die Luft anzuhalten (Hypoventilation), um den Einfluss von Propofol auf die zerebrale Vasoreaktivität zu erfassen. 45 Minuten nach Infusionsende wurden außerhalb des Scanners zur Überprüfung des Langzeitgedächtnisses Bilder (Gesichter) aus dem Arbeitsgedächtnistest gegenüber neuen Bildern abgefragt.

Die Daten wurden mittels ANOVA und T-Test auf statistische Signifikanz ($p < 0,05$) geprüft.

Ergebnisse

Propofol hat im untersuchten Konzentrationsbereich keine Wirkungen auf das basale BOLD-Signal oder auf ventilationsbedingte BOLD-Signaländerungen ($p > 0,05$). Dosisabhängig stiegen Reaktionszeit und Fehlerrate ($p < 0,05$). 4 Probanden aus beiden Propofolgruppen konnten die Arbeitsgedächtnisaufgaben zu 100% lösen und wurden als „high performer“ ($n=8$) zusammengefasst.

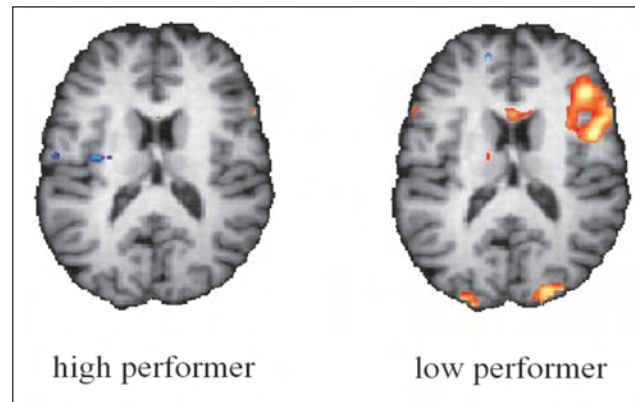


Abb. 1 rot: Signalabnahme gegenüber Kontrollgruppe
blau: Signalzunahme gegenüber Kontrollgruppe
($z > 3,1$; $p < 0,001$)

Die übrigen 9 Probanden wurden als „low performer“ eingestuft (Tab. 1).

Im Vergleich zur Kontrollgruppe hatten alle Propofolprobanden deutliche Langzeitgedächtniseinbußen ($p < 0,05$). Dabei bestand kein Unterschied zwischen „low“ und „high performer“. Funktionell zeigten die „high performer“ signifikant weniger BOLD-Signalabnahmen im Arbeitsgedächtnisnetzwerk ($p < 0,05$; Abb.1). Insgesamt kam es in allen untersuchten Gedächtnisnetzwerken ausschließlich zu selektiven BOLD-Signaländerungen.

Interpretationen

Propofol beeinflusst weder das basale BOLD-Signal, noch die ventilatorisch bedingten BOLD-Signaländerungen. Die zerebrale Vasoreaktivität bleibt demzufolge unter Propofol intakt. Daher sind alle BOLD-Änderungen während der Gedächtnisaufgaben unter Propofol als echte Änderungen der neuronalen Aktivität zu interpretieren.

Das Arbeitsgedächtnis ist nur bei der Hälfte der Probanden beeinträchtigt, während alle Propofolprobanden Langzeitgedächtniseinbußen zeigen. Die Verschlechterung von Arbeitsgedächtnisleistungen scheint daher nicht ursächlich für die amnestischen Wirkungen von Propofol zu sein. Innerhalb der untersuchten Gedächtnisnetzwerke kommt es nicht zu globalen, sondern zu hochselektiven Änderungen der neuronalen Aktivität.

Literatur

1. Veselis RA, Reinsel RA, Feshchenko VA, Johnson R Jr. Information loss over time defines the memory defect of propofol: a comparative response with thiopental and dexmedetomidine. *Anesthesiology* 2004;101:831-841.
2. Heinke W, Schwarzbauer C. In vivo imaging of anaesthetic action in humans: approaches with positron emission tomography (PET) and functional magnetic resonance imaging (fMRI). *Br J Anaesth* 2002;89:112-122.

Korrespondenzadresse: stefan.berg@medizin.uni-leipzig.de

Tab. 1

	Kontrollgruppe	0,6 µg/ml „high Perf.“	0,6 µg/ml „low Perf.“	1,2 µg/ml „high Perf.“	1,2 µg/ml „low Perf.“
Arbeitsgedächtnis	96 ± 2	100 ± 0	75 ± 5*	100 ± 0	50 ± 8*
Langzeitgedächtnis	69 ± 7	53 ± 4*	52 ± 7*	34 ± 3*	28 ± 3*

Erfolgsraten der verschiedenen Gruppen beim Arbeitsgedächtnis- und Langzeitgedächtnistest (Mittelwert (%) ± Standardabweichung (%)); * Signifikanz gegenüber Kontrollgruppe ($p < 0,05$); # Signifikanz gegenüber Kontrollgruppe ($p < 0,01$).

Hypoxie-induzierte Änderungen der pulmonalen Plasma-Konzentrationen von ET-1 und Nitrit korrelieren mit dem Ausmaß der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion

M.M. Berger^{1,2}, P. Bärtsch³, A. Luks³, D. Bailey⁴, C. Castell⁵, G. Schendler², E. Menold², V. Faoro⁵, H. Mairbäurl², E. Swenson³ und C. Dehnert²

¹ Klinik für Anaesthesiologie,

² Abteilung Innere Medizin VII, Sportmedizin, Universitätsklinikum Heidelberg, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

³ Department of Medicine, University of Washington, Seattle, USA

⁴ Department of Physiology, University of Glamorgan, UK

⁵ Department of Pathophysiology, University of Brussels, Belgium

Fragestellung

Die hypoxische pulmonale Vasokonstriktion (HPV) dient in Situationen, die mit alveolärer Hypoxie assoziiert sind (z.B. Pneumonie, COPD, ARDS), der Umverteilung des Blutflusses aus hypoxischen Arealen in besser oxygenierte Areale der Lunge und damit der Optimierung des Ventilations-Perfusions-Verhältnisses. Eine gesteigerte HPV führt jedoch zu einem überschießenden pulmonalarteriellen und -kapillären Druckanstieg, wodurch ein Austritt von Flüssigkeit in den Alveolarraum begünstigt wird [1]. Die Mechanismen, über welche Hypoxie zur pulmonalen Vasokonstriktion führt, sind unzureichend verstanden. In dieser Studie wurde untersucht, inwieweit Hypoxie die Konzentrationen der vasoaktiven Substanzen Endothelin-1 (ET-1) und Stickstoffmonoxid (NO) in der Pulmonalzirkulation moduliert und ob eine Korrelation zwischen den pulmonalen Plasma-Konzentrationen dieser Substanzen und dem Ausmaß des pulmonalarteriellen Druckanstieges in der Höhe besteht.

Methodik

Nach Zustimmung der örtlichen Ethikkommission wurden 34 gesunde Probanden im Flachland (110m) und nach zügigem Aufstieg (<24 Std.) auf 4559m Höhe in der Höhenforschungsstation Margherita-Hütte untersucht. 3-4 Stunden nach Ankunft in der Höhe wurden ein zentralvenöser (V. cava superior) und ein arterieller (A. radialis) Verweilkatheter gelegt und simultan arterielle und zentralvenöse Blutproben entnommen. Aus diesen Proben wurden die Plasma-ET-1-Konzentrationen (gemessen mittels Radioimmunoassay), die Plasma-Nitrit-Konzentrationen (indirekter Pa-

rameter der NO-Bioverfügbarkeit, gemessen mittels Fließ-Injektions-Analyse) sowie die Plasma-Adrenalin und Noradrenalin-Konzentrationen (gemessen mittels HPLC) bestimmt. Der systolische pulmonalarterielle Druck (PASP) wurde mittels transthorakaler Echokardiografie gemessen. Ein Thorax-Röntgenbild diente der Dokumentation eines Lungenödems. Von den Probanden, die ein Höhenlungenödem entwickelten, wurden die angegebenen Daten vor Ödembeginn erhoben. Die Ergebnisse sind als MW \pm SE dargestellt, Signifikanzniveau: $p < 0,05$.

Ergebnisse

Nach Aufstieg in die Höhe fiel der arterielle pO_2 auf $38 \pm 0,5$ mmHg ($p < 0,001$) und der PASP stieg von $23 \pm 0,7$ mmHg auf 37 ± 2 mmHg ($p < 0,001$; Minimum: 28 mmHg, Maximum 65 mmHg). Vier Probanden entwickelten ein Höhenlungenödem. Die zentralvenösen ET-1-Plasmaspiegel waren um etwa das 3-fache erhöht ($p < 0,001$), wohingegen die zentralvenösen Plasma-Nitrit-Konzentrationen stabil blieben ($p = 0,33$). Im Flachland war die zentralvenöse Plasmakonzentration von ET-1 höher als die arterielle und von Nitrit niedriger. In der Höhe erfolgte eine signifikante Umkehr der arterio-zentralvenösen Plasmagradienten, mit höherem arteriellem ET-1 und niedrigerem arteriellem Nitrit ($p < 0,05$). Die arterio-zentralvenösen Plasmagradienten von ET-1 und Nitrit zeigten eine signifikante Korrelation mit dem PASP (ET-1: $R = 0,49$, $p < 0,001$; Nitrit: $R = -0,21$, $p < 0,05$) und eine inverse Korrelation untereinander ($R = -0,48$; $p < 0,001$). Die zentralvenösen Plasmakonzentrationen von Noradrenalin und Adrenalin waren um das 2-fache ($p < 0,001$) bzw. das 1,6-fache ($p < 0,05$) erhöht, zeigten jedoch keine Korrelation mit dem PASP.

Interpretation

Die Höhen-induzierte Umkehr der arterio-zentralvenösen Plasmagradienten von ET-1 und Nitrit deutet auf eine Einschränkung der pulmonalen Endothelfunktion mit erhöhter ET-1- und verminderter NO-Konzentration in Hypoxie. Die Korrelation der arterio-zentralvenösen Plasmagradienten von ET-1 und Nitrit mit dem PASP spricht weiterhin für eine zentrale Bedeutung von ET-1 und NO für das Ausmaß der HPV. Die inverse Korrelation der ET-1- und Nitrit-Plasmagradienten dürfte Ausdruck einer reziproken pulmonalen Regulation der vom Gefäßendothel synthetisierten vasoaktiven Substanzen ET-1 und NO sein.

Literatur

1. Maggiorini M, Melot C, Pierre S, Pfeiffer F, Greve I, Sartori C, et al. High-altitude pulmonary edema is initially caused by an increase in capillary pressure. *Circulation* 2001;103:2078-2083.

Korrespondenzadresse: Marc.Berger@med.uni-heidelberg.de

Die prophylaktische Inhalation des Calcium-Sensitizers Levosimendan vermindert die Sekretion proinflammatorischer Zytokine und die Letalität beim beatmungsinduzierten Lungenschaden (VILI) der Ratte

K.A. Boost, S. Hoegl, C. Hofstetter, M. Flondor, A. Dolfen, H. Czerwonka und B. Zwissler

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

Fragestellung

Der beatmungsinduzierte Lungenschaden (ventilator induced lung injury, VILI) ist gekennzeichnet durch strukturelle und funktionelle

Veränderungen der Lunge, die mit einer Verschlechterung von Lungenmechanik und Gasaustausch einhergehen [1]. Überdehnung und Kollaps von distalen Broncheoli und Alveolen führen zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren, Verdickung des Epithels und Gasaustauschstörung mit nachfolgender hypoxischer Vasokonstriktion und Rechtsherzbelastung [2]. Levosimendan ist eine positiv inotrope Substanz, die zusätzlich in höherer Dosierung über intrazelluläre Phosphodiesterase-Hemmung und cAMP-Erhöhung eine selektive Vasodilatation und anti-inflammatorische Wirkung entwickelt [3]. Ziel der Studie war es zu klären, ob die prophylaktische inhalative sowie die intravenöse Applikation von Levosimendan einen positiven Effekt auf Entzündungsreaktion und Überleben bei experimentellem VILI in der Ratte hat.

Methodik

Nach Genehmigung durch die zuständige Behörde wurden männliche, narkotisierte und beatmete Sprague-Dawley-Ratten wie ►

▶ folgt behandelt (n=8 pro Gruppe) und 4h beobachtet: VILI-Gruppe: VILI-Induktion (20minütige Überdruckbeatmung mit pmax 45mbar, PEEP 0mbar, I:E 1:1; Letalität im weiteren Verlauf unbehandelt nach 4h Beobachtungszeit: 70% (Pilotstudie)), keine weitere Behandlung. Levo240µg-Gruppe: Inhalation von 240µg Levosimendan mittels Jet-Vernebler vor VILI-Induktion. Levo24µg-Gruppe: Inhalation von 24µg Levosimendan vor VILI-Induktion. Levo-i.v.-Gruppe: Injektion von 24µg/kg Levosimendan vor VILI-Induktion. Sham-Gruppe: Beatmung für 4h ohne VILI-Induktion oder Behandlung. Bei allen Tieren, die mindestens 2h bis 4h Beobachtungszeit überlebten, wurden eine bronchoalveoläre Lavage (BAL) durchgeführt und Blutproben entnommen. Nur diese Tiere wurden statistisch ausgewertet. Mittels Bradford-Assay und ELISA wurden Protein-Konzentrationen der BAL und die proinflammatorischen Zytokine (IL-1β und MIP-2 (Macrophage Inflammatory Protein-2)) in Plasma und BAL bestimmt. Die statistische Auswertung erfolgte durch Log Rank und Rangsummentest mit Bonferroni-Korrektur. Die Werte sind als Median (semi-IQR) dargestellt.

Ergebnisse

In der Levo240µg-Gruppe war das Überleben nach 4h signifikant gegenüber der VILI-Gruppe gesteigert. Der Proteingehalt der BAL als Maß des Schrankenschadens war sowohl in der Levo240µg- als auch der Levo-i.v.-Gruppe signifikant gegenüber der VILI-Kontrolle vermindert. Die Sekretion der Entzündungsmediatoren IL-1β und MIP-2 war sowohl im Plasma als auch der BAL in allen Therapie-Gruppen signifikant vermindert, mit Ausnahme von IL-1β in der BAL (Tab. 1).

Interpretation

Die vorliegende Studie zeigt, dass eine prophylaktische Inhalation des Calcium-Sensitizers Levosimendan antiinflammatorische Effekte auf Zytokinsekretion und Letalität während experimentellem VILI in der Ratte hat. Die Inhalation von Levosimendan führt in der Levo240µg-Gruppe zu einer signifikanten Verbesserung des Überlebens gegenüber der Kontroll-Gruppe (VILI). Dieser Effekt ist möglicherweise auf den signifikant höheren MAP in der Inhalations- gegenüber der Kontroll-Gruppe (VILI) (58 vs. 119 mmHg) zurückzuführen. Für die Letalität zeigt sich hier ein Vorteil der inhalativen Applikation gegenüber der intravenösen, da die nach Inhalation tatsächlich deponierte Menge (24µg/kg Levosimendan) in der Levo240µg-Gruppe der Dosierung der Levo-i.v.-Gruppe entspricht, so dass diese direkt vergleichbar sind. Der ausbleibende Effekt auf die IL-1β-Sekretion in der BAL dagegen ist möglicherweise auf durch Zelldestruktion freigesetztes, präformiertes und prozessiertes IL-1β zurückzuführen.

Literatur

1. Hammer J. Acute lung injury: pathophysiology, assessment and current therapy. *Paediatr Respir Rev* 2001;2:10-21.
2. Parker JC, Hernandez LA, Peevy KJ. Mechanisms of ventilator-induced lung injury. *Crit Care Med* 1993;21:131-143.
3. Szilagy S, Pollesello P, Levijoki J, Haikala H, Bak I, Tosaki A, Borbely A, Edes I, Papp Z. Two inotropes with different mechanisms of action: contractile, PDE-inhibitory and direct myofibrillar effects of levosimendan and enoximone. *J Cardiovasc Pharmacol* 2005;46:369-376.

Korrespondenzadresse: k.boost@med.uni-frankfurt.de

Tab. 1

	Sham	VILI	Levo240µg	Levo24µg	Levo-i.v.
Letalität n. 4h (n von 8/%)	0 / 0%	6 / 75%	2 / 25%*	4 / 50%	4 / 50%
PaO ₂ (mmHg)	99,5(5)	51,6(7)	79,7(9)	65,1(8)	75,2(9)
MAP (mmHg) (30min)	125(5)	58(4)	119(6)*	95(24)	118(12)*
Proteingehalt BAL (µg/ml)	249(15)	1469(249)	690(354)*	1193(159)	887(340)*
MIP-2 (pg/ml) im Plasma	129(49)	436(131)	73(19)*	81(35)*	75(6)*
MIP-2 (pg/ml) in der BAL	109(24)	497(109)	37(5)*	90(10)*	22(4)*
IL-1β (pg/ml) im Plasma	173(25)	1495(441)	245(107)*	313(57)*	220(63)*
IL-1β (pg/ml) in der BAL	76(15)	208(56)	182(32)	310(159)	97(30)
n (2-4h)	8	5	8	6	5

Log Rank und Rangsummentest mit Bonferroni-Korrektur, * P<0.05 vs. VILI, Median (semi-IQR).

Untersuchungen zum Mechanismus der Ketamin-induzierten Apoptose an Jurkat-T- und Neuroblastomzellen

S. Braun, R. Werdehausen, N. Gaza, H. Hermanns, P. Lipfert und M.F. Stevens

Klinik für Anaesthesiologie, Universitätsklinikum Düsseldorf, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Fragestellung

Es ist bekannt, dass Ketamin in neuronalen Zellen von Ratten Apoptose induziert [1]. Bisher ungeklärt ist, über welchen Mechanismus Ketamin Apoptose induziert. Daher wurde in dieser Studie mit Hilfe genetisch veränderter Jurkat-T-Zellen untersucht, ob Ketamin-induzierte Apoptose über den Todesrezeptor- oder mitochondrialen Signalweg vermittelt wird [2]. An neuronalen Zellen wurde untersucht, ob die konzentrationsabhängige Neurotoxizität

durch einen Caspase-Inhibitor hemmbar ist. Die Bedeutung des für Ketamin stereospezifischen NMDA-Rezeptors [3] für die Apoptose-Induktion wurde anhand des Vergleichs von Ketamin mit S-Ketamin evaluiert.

Methodik

In allen Versuchen wurde nach 24-stündiger Behandlung das Auftreten von Apoptose mittels Doppelfärbung (AnnexinV und 7AAD) durchflußzytometrisch (FACS) analysiert. Caspase-8-, Caspase-9- oder FADD-defiziente bzw. Bcl-2-überexprimierende Jurkat-T-Zellen wurden ohne oder mit Ketamin (2 mM) mit den entsprechenden Wildtypzellen verglichen. Neuroblastomzellen (SHEP) wurden mit dem Pancaspaseinhibitor Q-VD (10 µM) für eine Stunde vorbehandelt, anschließend mit Ketamin in aufsteigender Konzentration (1-8 mM) inkubiert und mit nicht vorbehandelten Zellen verglichen. Die Neurotoxizität äquipotenter Dosierungen von Ketamin und S-Ketamin (1mM/0,5 mM; 2 mM/1 mM; 4 mM/2mM; 6 mM/3 mM; 8 mM/4 mM) wurde verglichen. ▶

► Alle Versuche wurden dreifach durchgeführt und die Ergebnisse als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt. Die Effekte wurden mittels t-Test mit Bonferroni-Korrektur verglichen. Das Signifikanzniveau wurde als $P < 0,05$ definiert.

Ergebnisse

Ketamin (2 mM) induzierte nach 24 h Inkubation in T-Jurkat-Zellen zu $43,1 \pm 1,9\%$ Zelltod durch Apoptose. Bcl-2-Überexpression und Caspase-9-Defizienz reduzierten diesen Anteil signifikant auf $10,9 \pm 2,9\%$ bzw. $4,1 \pm 0,6\%$ (Abb. 1). Im Gegensatz dazu schützt Caspase-8- und FADD-Defizienz nicht vor Apoptoseinduktion durch Ketamin (Abb. 2). Der Pancaspaseinhibitor Q-VD reduzierte bei neuronalen Zellen die durch Ketamin induzierte Apoptoserate um bis zu 80% (Abb. 3). Bei der Untersuchung klinisch äquipotenter Konzentrationen von S-Ketamin und dem Racemat an Neuroblastomzellen zeigte sich, dass das Racemat deutlich toxischer als das Stereoisomer ist (Abb. 4). Äquimolare Konzentrationen unterschieden sich nicht in ihrer toxischen Wirkung.

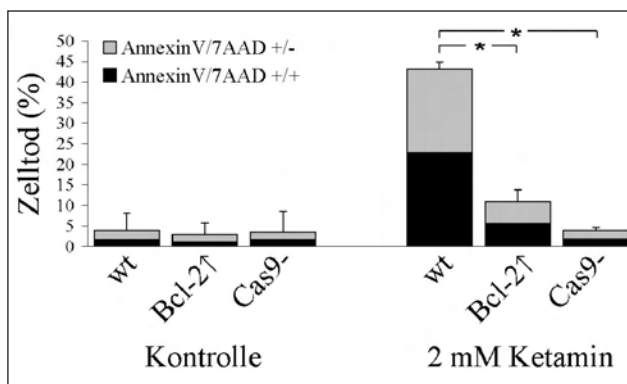


Abb. 1: Apoptotischer Anteil Bcl-2-überexprimierender, Caspase-9-defizienter und Wildtypzellen (Jurkat) nach 24-stündiger Inkubation ohne und mit Ketamin (2 mM).

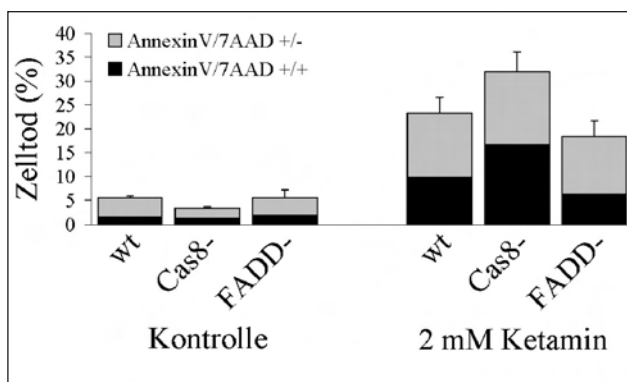


Abb. 2: Apoptotischer Anteil Caspase-8-defizienter, FADD-defizienter und Wildtypzellen (Jurkat) nach 24-stündiger Inkubation ohne und mit Ketamin (2 mM).

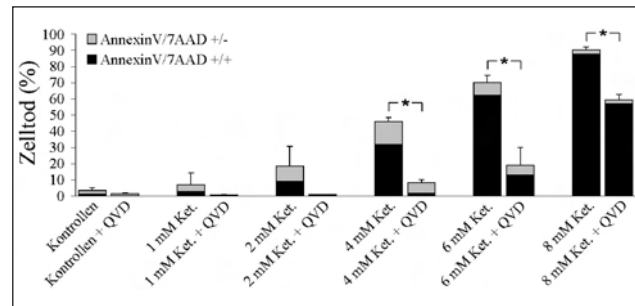


Abb. 3: Anteil apoptotischer Wildtypzellen (SHEP) nach 24-stündiger Inkubation mit aufsteigenden Konzentrationen von Ketamin ohne und mit Vorbehandlung eines Caspaseinhibitors (Q-VD, 10 μM).

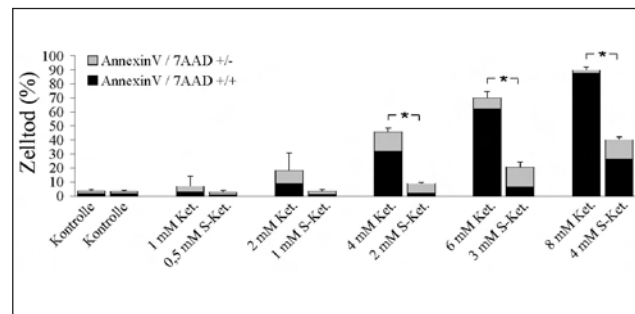


Abb. 4: Anteil apoptotischer Wildtypzellen (SHEP) nach 24-stündiger Inkubation mit äquipotenten Konzentrationen von Ketamin und S-Ketamin in aufsteigenden Konzentrationen.

Interpretation

Ketamin induziert an neuronalen und nicht-neuronalen Zellen konzentrationsabhängig Apoptose. Caspase-9-Defizienz und Bcl-2-Überexpression schützen vor Ketamin-induzierter Apoptose, während Caspase-8- und FADD-Defizienz keinen schützenden Effekt haben. Somit induziert Ketamin Apoptose über den mitochondrialen Signalweg, nicht aber über den Todesrezeptor-Signalweg. Die Neurotoxizität von Ketamin lässt sich mittels eines Caspase-Inhibitors erheblich unterdrücken. Da S-Ketamin in äquipotenten Dosierungen eine geringere Neurotoxizität als Ketamin in diesem Modell hat, scheint der Apoptose-induzierende Effekt beider Substanzen nicht stereospezifisch und somit nicht über den NMDA-Rezeptor vermittelt zu sein.

Literatur

- 1) Wang C, et al. The role of the N-methyl-D-aspartate receptor in ketamine-induced apoptosis in rat forebrain culture. *Neuroscience* 2005;132(4):967-77.
- 2) Budihardjo I, et al. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1999;15:269-290.
- 3) Zeilhofer HU, et al. Differential effects of ketamine enantiomers on NMDA receptor currents in cultured neurons. *Eur J Pharmacol* 1992;213(1):155-158.

Korrespondenzadresse: brauns@uni-duesseldorf.de

Funktion α_2 -adrenerger Rezeptoren nach Induktion einer transienten zerebralen Ischämie vor und nach Stimulation mit dem α_2 -Agonisten Clonidin: Untersuchung an einem transgenen Mausmodell

M. Brede¹, S. Bräuninger², C. Kleinschnitz², L. Hein³, G. Stoll² und N. Roewer¹

¹ Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie,

² Neurologische Klinik und Poliklinik,

Universitätsklinikum Würzburg, Julius-Maximilians-Universität Würzburg

³ Institut für Pharmakologie, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg

Fragestellung

α_2 -Adrenerge Rezeptoren (α_2 -AR) sollen an der Vermittlung neuroprotektiver Effekte beteiligt sein [1]. Wir konnten bereits zeigen, dass der α_{2A} -adrenerge Rezeptor neuroprotektive Effekte in der Perinatalperiode vermittelt [2]. An einem transgenem Mausmodell sollte die Rolle der unterschiedlichen α_2 -adrenergen Rezeptorsubtypen nach Induktion einer transienten zerebralen Ischämie mit und ohne Vorbehandlung mit dem α_2 -adrenergen Agonisten Clonidin untersucht werden. Zusätzlich wurden hämodynamische Variablen vor und nach Gabe von Clonidin an den verschiedenen Genotypen erhoben, da eine veränderte Hämodynamik Einfluss auf die Ausdehnung der zerebralen Ischämie nehmen kann.

Methodik

Der Tierversuchsantrag wurde durch die zuständige Behörde genehmigt. Transgene Mäuse mit Deletionen α_2 -adrenerger Rezeptorsubtypen (α_{2A} -KO, α_{2B} -KO, α_{2C} -KO, $\alpha_{2A/C}$ -KO) und Kontroll-

tiere (WT) wurden mit und ohne Vorbehandlung von Clonidin (40µg/kg intraperitoneal 1h vor Induktion der zerebralen Ischämie) untersucht. Die Arteria cerebri media dextra wurde für 60 Minuten transient okkludiert. Nach 24 Stunden wurden zwei funktionelle neurologische Scores, der modifizierte Bederson-Score (0= „kein motorisches Defizit“ bis 5= „keine Bewegung des Tieres“) und der Grip-Test-Score (0= „Herabfallen der Maus von einem Holzstab“ bis 5= „problemlose Flucht“), erhoben sowie das Infarktvolumen in Prozent der kontralateralen Hemisphäre mittels 2,3,5-Triphenyl-tetrazoliumchlorid-Färbung bestimmt. Der arterielle Mitteldruck vor und 1h nach Injektion von Clonidin (40µg/kg) wurde mittels eines 1.4F-Miniatur-Druckkatheters in der A. carotis communis dextra gemessen.

Die Daten wurden mittels Kruskal-Wallis-Test und Post-Hoc-Test nach Dunn, ungepaartem t-Test bzw. zweiseitiger Varianzanalyse und nachfolgender Bonferroni-Korrektur auf statistische Signifikanz getestet.

Ergebnisse

Das Infarktvolumen nach transienter Ischämie unterschied sich basal nicht zwischen den einzelnen Kollektiven. Allerdings war das Infarktvolumen nach Gabe von Clonidin bei $\alpha_{2A/C}$ -KO-Mäusen signifikant geringer gegenüber WT-, α_{2B} -KO- und α_{2C} -KO-Mäusen (Abb. 1).

Der arterielle Mitteldruck von α_{2A} -KO- und $\alpha_{2A/C}$ -KO-Mäusen war gegenüber WT-Tieren signifikant erhöht (WT: 75.33mmHg \pm 1.62; * α_{2A} -KO: 81.89mmHg \pm 2.33; α_{2B} -KO: 81.27mmHg \pm 2.77; α_{2C} -KO: 77.22mmHg \pm 1.58; * $\alpha_{2A/C}$ -KO: 83.33mmHg \pm 1.70; n=5-7; *p \leq 0.05). Die Vorbehandlung mit Clonidin führte in allen Gruppen mit Ausnahme der $\alpha_{2A/C}$ -KO-Mäuse zu einer signifikanten Abnahme des arteriellen Mitteldruckes (WT: 63.84mmHg \pm 1.42; α_{2A} -KO: 72.56mmHg \pm 3.47; α_{2B} -KO: 70.39mmHg \pm 3.26; α_{2C} -KO: 62.87mmHg \pm 1.78; * $\alpha_{2A/C}$ -KO: 82.41mmHg \pm 2.85; n=5-7; *p \leq 0.05). Das Infarktvolumen korrelierte signifikant mit den Blutdruckveränderungen nach Vorbehandlung mit Clonidin ▶

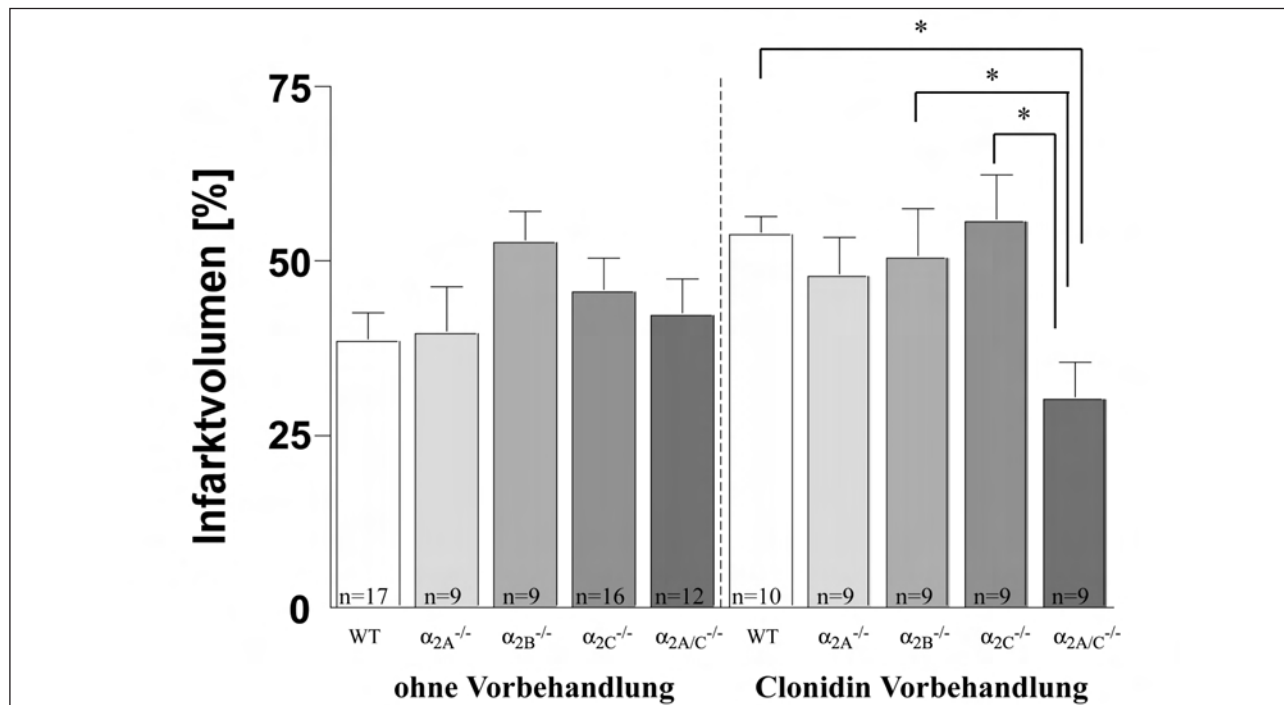


Abb. 1: Infarktvolumen von WT und α_2 -KO-Mäusen nach transienter zerebraler Ischämie unter basalen Bedingungen und Vorbehandlung mit Clonidin (Daten als Mittelwert \pm Standardfehler, * p \leq 0.05).

► ($r^2=0.9362$). Die funktionellen Defizit-Scores unterschieden sich nicht zwischen den Untersuchungskollektiven.

Interpretation

Unsere Befunde zeigen, dass die Stimulation des α_{2B} -adrenergen Rezeptorsubtyps neuroprotektive Effekte nach Induktion einer zerebralen Ischämie vermitteln könnte. Das verminderte Infarkt-volumen bei α_{2AVC} -KO-Mäusen könnte allerdings auch durch den fehlenden Abfall des arteriellen Mitteldruck nach Gabe des α_2 -

Agonisten Clonidin erklärt werden, da das Infarktvolumen nach Stimulation mit Clonidin mit dem arteriellen Mitteldruck korreliert.

Literatur

1. Ma D, Rajakumaraswamy N, Maze M. α_2 -Adrenoceptor agonists: shedding light on neuroprotection. *Eur J Pharmacol* 2004;502(1,2):87-97.
2. Paris A, Mantz J, Tonner PH, Hein L, Brede M, Gressens P. The effects of dexmedetomidine on perinatal excitotoxic brain injury are mediated by the α_{2A} -adrenoceptor subtype. *Anesth Analg* 2006;102(2):456-461.

Korrespondenzadresse: brede_e@klinik.uni-wuerzburg.de

Kardioprotektive Rolle von E-NTPDase1 (CD39) bei akuter Myokardischämie

T. Eckle^{1*}, D. Köhler¹, Almut Grenz², M. Mittelbronn³, S.C. Robson⁴, Christa E. Müller⁵, K. Unertl¹ und H.K. Eltzschig¹

¹ Klinik für Anaesthesiologie und Intensivmedizin,

² Institut für Pharmakologie und Toxikologie,

³ Institut für Neuropathologie,

Universitätsklinikum Tübingen, Eberhard-Karls-Universität Tübingen

⁴ Liver and Transplant Center, Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, Boston, USA

⁵ Pharmazeutisches Institut, Universitätsklinikum Bonn, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Fragestellung

Verschiedene Studien konnten belegen, dass der extrazellulären Adenosin-Bildung und Signalübertragung eine kardioprotektive Bedeutung während akuter Myokardischämie zukommt [1]. Extrazelluläres Adenosin wird vorwiegend enzymatisch via Phosphohydrolyse aus ATP und ADP gebildet. Dieser enzymatische Prozess wird durch Ekto-Nukleosid Triphosphat Diphosphohydrolasen (E-NTPDasen 1-3, 8) gesteuert. Daher untersuchten wir hier eine mögliche kardioprotektive Rolle dieser Enzyme bei akuter Myokardischämie im murinen Tiermodell.

Methodik

Vor Versuchsbeginn lag eine Tierversuchsgenehmigung durch das zuständige Regierungspräsidium vor. Als ersten Schritt untersuchten wir die Folgen einer pharmakologischen Hemmung aller E-NTPDasen bei Myokardischämie und ischämischer Präkonditionierung (IP). Hierzu verwendeten wir einen neuen, nicht-selektiven E-NTPDase Inhibitor ($\text{Na}_6(\text{H}_2\text{W}_{12}\text{O}_{40})$, POM-1, 3mg/kg KG i.p.) [2] und untersuchten die Herzinfarktgröße nach 60-minütiger Ischämie mit und ohne vorheriger IP (5 min Ischämie, 5 min Reperfusion, 4 Zyklen) [1]. Anschließend wurden mittels Echtzeit-RT-PCR an präkonditioniertem Myokard transkriptionelle Folgen von IP auf die E-NTPDasen untersucht. Diese Befunde wurden durch Western-Blot- und immunhistochemische Analysen bestätigt. Für eine genetische Beweisführung wurden anschließend Myokardischämie und IP bei Mäusen nach gezielter Deletion der E-NTPDase1 (CD39) durchgeführt ($\text{cd}39^{-/-}$ -Mäuse). Um zu zeigen, dass ein unterschiedliches Verhalten von $\text{cd}39^{-/-}$ -Mäusen tatsächlich auf einen extrazellulären Nukleosid-Mangel zurückzuführen ist, bestimmten wir die Adenosin-Konzentrationen im Herzgewebe dieser Mäuse mittels HPLC-Technik. Anschließend rekonstituierten wir die $\text{cd}39^{-/-}$ -Mäuse durch Apyraseinfusionen und führten erneut murine Myokardischämie und in situ IP durch.

Ergebnisse

Durch POM-1-Behandlung wurde die basale Infarktgröße erhöht ($44 \pm 2,3\%$ vs. $52,5 \pm 6,6\%$, $p < 0,05$, $n=6$) und der infarktgrößen-reduzierende Effekt von IP aufgehoben (Mäuse mit IP ohne

POM-1: $13,8 \pm 3,6\%$ vs. Mäuse mit IP mit POM-1: $53,6 \pm 5,2\%$, $n=6$, $p < 0,0001$). In präkonditioniertem Herzgewebe zeigte sich eine selektive Induktion der E-NTPDase1/CD39 mRNA ($8,2 \pm 1,5$ -fach, $n=6$, $p < 0,0001$) mit IP. Western-Blot-Analysen bestätigten die Induktion von CD39 und immunhistochemische Färbungen lokalisierten CD39 auf Myokard- und Endothel-Zellen. Untersuchungen an $\text{cd}39^{-/-}$ -Mäusen bestätigten eine funktionelle Rolle von CD39 bei Myokardischämie und IP (Abb. 1A). So hatten diese Mäuse ohne IP größere Infarkte, und die IP-bedingte Infarktgrößen-reduktion war aufgehoben. Adenosin-Messungen bei $\text{cd}39^{-/-}$ -Mäusen ergaben, dass ein durch IP bedingter Anstieg der Adenosin-Konzentration bei diesen Mäusen ausblieb. Rekonstitution von $\text{cd}39^{-/-}$ -Mäusen mit löslicher Apyrase führte zu einer Wiederherstellung des Wildtyp-Phänotyps. Zusätzlich führt die Gabe von Apyrase bei Myokardischämie zu einer 50%-igen ($44,2 \pm 3,2\%$ vs. $23,2 \pm 4,7\%$) Infarktgrößenreduktion bei Wildtyp-Mäusen (Abb. 1B). Statistische Analysen: ANOVA, $*p < 0,05$.

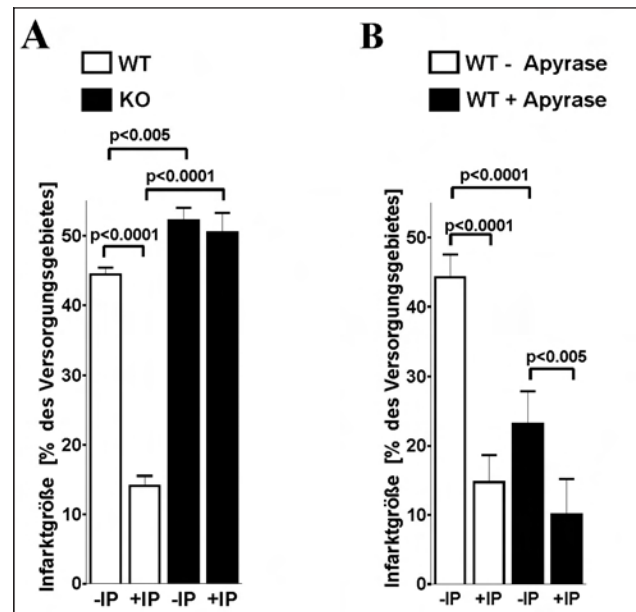


Abb. 1: (A) Myokardischämie und ischämische Präkonditionierung (IP) bei $\text{cd}39^{-/-}$ -Mäusen.

(B) Therapeutische Wirkung von Apyrase bei der akuten Myokardischämie.

Interpretation

Die vorliegenden Untersuchungen weisen erstmalig auf eine kardioprotektive Rolle der CD39-abhängigen ATP/ADP-Phosphohydrolyse bei akuter Myokardischämie hin. Der Einsatz von löslicher Nukleotidase (Apyrase) stellt möglicherweise eine neue Therapieform in der Behandlung oder Prophylaxe der akuten Koronarischämie dar.

► Zur Infarktinduktion wurde mit oder ohne IP (\pm IP [4 x 5 min]) die linke Koronararterie für 60 Minuten verschlossen. Nach 2 Stunden Reperfusion wurde durch retrograde Färbung mit Evan's Blue und durch eine spezifische Infarktfärbung die prozentuale Infarktgröße bestimmt.

Literatur

1. Eckle T, Krahn T, Grenz A, Köhler D, Mittelbronn M, Ledent C, et al. Cardioprotection by ecto-5'-nucleotidase (CD73) and A2B adenosine

receptors. *Circulation* 2007; 2007;115(12):1581-1590.

2. Muller C, Iqbal J, Baqi Y, Zimmermann H, Rollich A, Stephan H. Polyoxometalates -- a new class of potent ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase) inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 2006;16(23):5943-5947.

* Preisträger des Fresenius-Stipendiums 2007

Korrespondenzadresse: t.eckle@arcor.de

Hämodynamische Stabilität und humorale Kreislaufregulation nach akutem Blutverlust während Xenon/Remifentanil-Narkose mit und ohne Angiotensin-II-Rezeptorblockade – Eine tierexperimentelle Untersuchung

R.C.E. Francis, A. Klein, C. Höhne und W. Boemke

AG Experimentelle Anästhesie der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow-Klinikum und Campus Charité Mitte

Fragestellung

Unter den humoralen Faktoren bei der hämodynamischen Adaptation an einen akuten Blutverlust ist das Renin-Angiotensin-System für die kurzfristige, akute Kreislaufregulation und hämodynamische Stabilität besonders bedeutsam. So aggraviert eine medikamentöse Blockade des Renin-Angiotensin-Systems den Blutdruckabfall nach akutem Blutverlust bei wachen, noch stärker

jedoch bei anästhesierten Individuen oder Versuchstieren [1,2]. Möglicherweise könnte das Anästhetikum Xenon, welches mit einer im Vergleich zu volatilen Anästhetika geringeren Depression des kardiovaskulären Systems und besseren Kreislaufstabilität in Verbindung gebracht wird [3], auch unter den Bedingungen eines akuten Blutverlustes eine geringere Störung des Kreislaufs im Sinne einer Abnahme des arteriellen Blutdrucks und des Herzzeitvolumens garantieren. In der vorliegenden Untersuchung wurden daher zunächst die hämodynamischen Veränderung und hormonellen Regulationsmechanismen bei einem akuten Blutverlust unter Xenon/Remifentanil-Narkose in einem tierexperimentellen Modell charakterisiert und anschließend die Bedeutung des Renin-Angiotensin-Systems bei dieser Form der Narkose durch selektive Blockade der Angiotensin-II-Rezeptoren untersucht.

Methodik

Nach Zustimmung der Tierversuchkommission (AZ G0424/99) wurden 6 trainierte Beagle-Hündinnen (13.4 ± 1.3 kg) in je 2 Protokollen untersucht. Zwischen den in zufälliger Reihenfolge durchgeführten Experimenten lag ein Intervall von ≥ 14 Tagen. Die Hunde wurden bezüglich des Salz-Wasser-Haushaltes standardi-

Tab. 1

	Xenon / Remifentanil-Narkose		
	Normovolämie	5 min Blutentzug	60 min Blutentzug
Herzfrequenz (1/min)			
Kontrolle	40 \pm 3	41 \pm 2	43 \pm 2
Losartan	40 \pm 2	40 \pm 2	40 \pm 1
Arterieller Mitteldruck (mmHg)			
Kontrolle	85 \pm 6	87 \pm 6	93 \pm 5
Losartan	71 \pm 6 [§]	69 \pm 5 [§]	72 \pm 4 [§]
Herzzeitvolumen (L/min)			
Kontrolle	0,9 \pm 0,1	0,9 \pm 0,1	1,0 \pm 0,1
Losartan	0,9 \pm 0,1	0,9 \pm 0,1	0,9 \pm 0,1
Systemischer vaskulärer Widerstand (dyn·s·cm⁻⁵)			
Kontrolle	7231 \pm 803	7886 \pm 685	7420 \pm 867
Losartan	5939 \pm 611 [§]	5965 \pm 347 [§]	5940 \pm 474 [§]
Angiotensin II (pg/ml)			
Kontrolle	105 \pm 18	76 \pm 15	83 \pm 28
Losartan	298 \pm 49 [§]	278 \pm 45 [§]	280 \pm 53 [§]
Vasopressin (pg/ml)			
Kontrolle	71 \pm 16	182 \pm 56*	104 \pm 23*
Losartan	57 \pm 15	144 \pm 25*	93 \pm 20
Adrenalin (pg/ml)			
Kontrolle	1892 \pm 750	2509 \pm 746	2956 \pm 310*
Losartan	1003 \pm 410	1370 \pm 409	1618 \pm 465 [§]
Noradrenalin (pg/ml)			
Kontrolle	488 \pm 138	643 \pm 143	862 \pm 117*
Losartan	357 \pm 46	500 \pm 56	550 \pm 63*

Mittelwert \pm SEM, n=6, p<0,05 *vs. Normovolämie, § vs. Kontrolle, GLM-ANOVA, Post-hoc-t-Test (Holm).

siert ernährt. Dieses Ganztiermodell wurde an anderer Stelle detailliert beschrieben [1,2]. Protokoll 1: Nach Induktion mit 8-10 mg/kg Propofol (Disoprivan® 1%) wurden die Tiere oropharyngeal intubiert und kontrolliert maschinell beatmet (Physioflex™, Dräger Medical, Lübeck, Deutschland). Die Narkose wurde sodann durch eine Kombination aus Xenon 63±1vol% endtidal ($FO_2 = 0,3$) und Remifentanyl 0,5 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ i.v. aufrechterhalten. Eine Stunde nach Induktion wurden der arterielle Mitteldruck, das Herzzeitvolumen (Thermodilution) und die Herzfrequenz gemessen, die Hormone Renin, Angiotensin II, Vasopressin, Adrenalin und Noradrenalin bestimmt sowie der systemische vaskuläre Widerstand berechnet. Anschließend erfolgte innerhalb von 5 Minuten ein akuter Blutentzug von 20 ml/kg über eine Schleuse in der V. jugularis. Weitere Messungen erfolgten 5 und 60 Minuten nach dem Blutentzug. Protokoll 2: wie Protokoll 1, jedoch mit selektiver Angiotensin-II-Rezeptor (AT_1)-Blockade mittels Losartan 100 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ i.v., beginnend 60 Minuten vor Induktion.

Ergebnisse

Im Gegensatz zu den hämodynamischen Beeinträchtigungen (z.B. Blutdruckabfall), die infolge eines Blutentzugs von 20 ml/kg in diesem Tiermodell an wachen und mit Isofluran/Lachgas anästhesierten Tieren beschrieben worden sind [1,2], blieben die Herzfrequenz, der arterielle Mitteldruck, das Herzzeitvolumen sowie der systemische vaskuläre Widerstand während des Blutentzugs unter Xenon/Remifentanyl-Narkose konstant. Die dabei einsetzenden hormonellen Regulationsmechanismen beinhalten einen Anstieg der Plasmakonzentrationen von Vasopressin, Adrenalin

und Noradrenalin, nicht jedoch von Angiotensin II. Abgesehen von einer Reduktion des arteriellen Mitteldrucks vor dem Blutentzug, werden die Hämodynamik sowie die hormonellen Regulationsmechanismen von einer selektiven AT_1 -Rezeptorblockade nicht beeinträchtigt.

Interpretation

Ein Blutverlust von 20 ml/kg wird unter Xenon/Remifentanyl-Narkose durch eine hochgradige Stimulation von Vasopressin und Katecholaminen unter hämodynamischen Gesichtspunkten vollständig kompensiert. Diese Kompensation erfolgt unabhängig von Angiotensin II. Daher erscheint Xenon/Remifentanyl als eine geeignete Narkoseform bei einem bestehenden oder absehbaren Blutverlust, insbesondere wenn das Renin-Angiotensin-System therapeutisch blockiert ist.

Literatur

1. Francis RC, Höhne C, Kaczmarczyk G, Boemke W. Effect of angiotensin II and endothelin-1 receptor blockade on the haemodynamic and hormonal changes after acute blood loss and after retransfusion in conscious dogs. *Acta Physiol Scand* 2004;180: 319-328.
2. Höhne C, Vogler P, Frerking I, Francis RC, Swenson ER, Kaczmarczyk G, et al. Hemorrhage during isoflurane-nitrous oxide anesthesia: effects of endothelin-A or angiotensin II receptor blockade or both. *Anesthesiology* 2004;100:885-893.
3. Preckel B, Schlack W. Inert gases as the future inhalational anaesthetics? *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 2005;19:365-379.

Korrespondenzadresse: roland.franis@gmx.de

Ein funktioneller Haplotyp im humanen Gq-Promotor beeinflusst den pulmonal-arteriellen Okklusionsdruck unabhängig vom Schweregrad der Herzinsuffizienz

U.H. Frey¹, M. Adamzik^{1,2}, Eva Kottenberg-Assenmacher¹, W. Siffert², J. Peters¹ und P. Kienbaum¹

¹ Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin,

² Institut für Pharmakogenetik, Universitätsklinikum Essen, Universität Duisburg-Essen

Fragestellung

Die Gq-Untereinheit heterotrimer G-Proteine spielt eine wichtige Rolle bei der Vermittlung der intrazellulären Signaltransduktion von Angiotensin II und Endothelin [1]. Bei transgenen Mäusen führt Gq-Überexpression zu kardialer Hypertrophie, Apoptose und Herzinsuffizienz [2]. Wir konnten im humanen Gq-Promotor einen häufigen (fTT=0.48) funktionellen GC(-694/695)TT "single nucleotide polymorphism" (SNP) sowie zwei seltene G(-168)A und G(-173)A SNPs (fa=0.10) identifizieren und zeigen, dass homozygote GC(-694/695)-Allel-Träger eine vermehrte endogene Gq-Expression und ein erhöhtes Schlagvolumen im Vergleich zu GC/TT- und TT/TT-Genotypen besitzen. Echokardiographische

Untersuchungen an 1204 Individuen einer Querschnittsstudie zeigten zudem, dass die Inzidenz einer linksventrikulären Hypertrophie bei GC-Patienten 4-fach erhöht war [3]. Wir prüften nun die These, dass ein funktioneller Haplotyp besteht, der alle genannten Promotor-Polymorphismen beschreibt und einen direkten funktionellen Zusammenhang zwischen veränderter Gq-Expression und linksventrikulärer Funktion herstellt.

Methodik

Nach Zustimmung der Ethikkommission wurden 121 Patienten, die sich einer elektiven aortokoronaren Bypass-OP unterzogen, in diese prospektive Studie eingeschlossen. Die Allgemeinnarkose wurde standardisiert mit Etomidat (0.3 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), Sufentanyl (1 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) und Rocuronium (0.6 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) induziert und mit Isofluran (endtidal 0.6-1.0%) und Sufentanyl (1-4 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) aufrecht erhalten. Nach Anlage eines Pulmonalarterienkatheters wurden vor Hautschnitt Herzindex und vaskuläre Drücke gemessen sowie Widerstände berechnet. Rechte Herzohren wurden vor Kanülierung für den Anschluss an die extrakorporale Zirkulation gewonnen. mRNA wurde extrahiert und mittels Real-time PCR quantifiziert. Electrophoretic mobility shift Assays (EMSA) wurden an nukleären Extrakten von HEK293- und Herzmuskelzellen durchgeführt. Genotypen des GC(-694/695)TT SNPs wurden durch Restriktionsanalyse, Genotypen der G(-168)A und G(-173)A SNPs durch ▶

Tab. 1

Haplotyp	Alle	*1 (n = 36)	*2 (n = 50)	*3 (n = 35)	p-Wert
ZVD [mmHg]	9.2±3.8	9.3±3.6	9.6±4.5	8.4±3.0	0.321
PAP [mmHg]	21.5±5.9	21.6±5.2	21.9±6.6	20.6±5.8	0.481
PCWP [mmHg]	12.6±5.0	14.7±5.2	12.9±4.3	10.2±4.7	0.0001
CI [$\text{l}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$]	1.9±0.6	1.9±0.6	1.8±0.5	2.1±0.6	0.195
SVRI [$\text{dyne}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{cm}^{-5}\cdot\text{m}^{-2}$]	2748±910	2864±1038	2797±933	2561±718	0.166
PVRI [$\text{dyne}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{cm}^{-5}\cdot\text{m}^{-2}$]	402±188	357±172	431±220	403±145	0.318

► Pyrosequencing ermittelt. Mögliche Haplotypen wurden mit der Software HaploView bestimmt. Statistik: Werte kontinuierlicher Variablen wurden mittels ANOVA, kategoriale Variablen mittels χ^2 -Test verglichen.

Ergebnisse

Im EMSA zeigten sich für die G(-168)A und G(-173)A SNPs unterschiedliche Bindungsverhalten für Transkriptionsfaktoren und führten für A-Allel-Konstrukte zu einer verminderten Promotoraktivität nach Stimulation mit 10% Serum. Eine Haplotypanalyse dieser SNPs ergab ein signifikantes Kopplungsungleichgewicht mit dem GC(-694/695)TT SNP ($p < 0.001$). Die daraus konstruierten funktionellen Haplotypen zeigten im menschlichen Herzen ($n=44$) signifikante Unterschiede in der Gq-mRNA-Konzentration (Gq/ β -Actin Ratio, *1: 0.016 ± 0.005 ; *2: 0.015 ± 0.002 ; *3: 0.013 ± 0.003 ; $p=0.03$).

In der klinischen Studie unterschieden sich die präoperativ erhobenen Daten, wie Laborwerte, Medikation und Blutdruck, zwischen den Haplotypen nicht. *1 Träger zeigten jedoch einen geringfügig höheren Ruhepuls im Vergleich zu Haplotyp *2 und *3 (*1, 72.2 ± 10.8 min⁻¹; *2, 71.2 ± 10.3 min⁻¹; *3, 69.7 ± 8.7 min⁻¹; $p=0.026$) sowie eine höhere Inzidenz für eine NYHA-Klassifikation von III-IV (odds ratio 2.6 (95% CI 1.03-6.38); $p=0.04$). Intraoperativ wurden bei *1-Trägern die höchsten PCWP-Drücke gemessen bei identischem ZVD und Herzindex (Tab. 1). In einer „2-Wege ANOVA“ Auswertung zeigte interessanterweise der Gq-Haplotyp ($p=0.006$) einen stärkeren und unabhängigen Einfluss auf den PCWP in Relation zum NYHA-Stadium ($p=0.17$; Abb. 1).

Interpretation

Unsere Daten zeigen, dass erhöhte Gq-Expression, bedingt durch einen funktionell wirksamen Promotor-Haplotyp, mit einer Erhöhung des pulmonalarteriellen Okklusionsdruckes assoziiert und unabhängig vom klinischen Schweregrad der Herzinsuffizienz

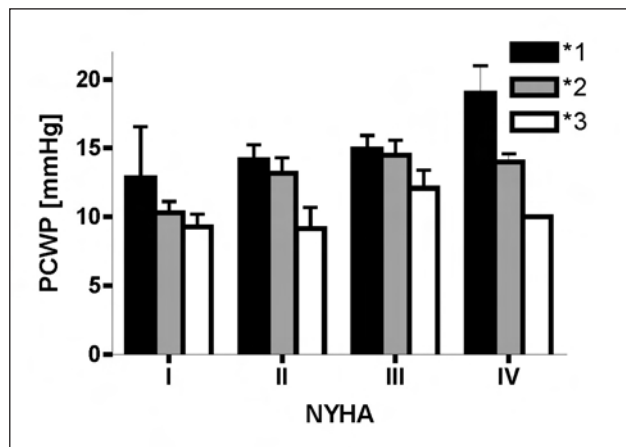


Abb. 1

ist. Damit präsentieren wir erstmals auf molekularer Ebene eine mögliche Erklärung für das variable Verhalten von Füllungsdrücken bei klinisch vergleichbarem Stadium der Herzinsuffizienz nach der NYHA-Klassifikation.

Literatur

1. Wettchurck N, Offermanns S. Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol Rev* 2005;85:1159-1204.
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* 1998;95:13893-13898.
3. Frey UH, et al. *Circulation* 2004;110(Suppl):553(2575).

Korrespondenzadresse: Ulrich.Frey@uk-essen.de

Präoperativ inhaliertes Kohlenmonoxid induziert in der Lunge eine differentielle Hitzeschockantwort während des kardiopulmonalen Bypasses bei Schweinen

U. Göbel¹, M. Siepe², K. Geiger¹, H.L. Pahl¹, C. Schlensak² und T. Loop¹

¹ Anaesthesiologische Universitätsklinik,

² Chirurgische Universitätsklinik, Abt. Herz- und Gefäßchirurgie, Universitätsklinikum Freiburg, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau

Fragestellung

Inhalatives Kohlenmonoxid (CO) besitzt sowohl antiinflammatorische als auch antiapoptotische Wirkungen [1,2]. Vorausgegangen eigene Untersuchungen an Schweinen während des kardiopulmonalen Bypasses (CPB) konnten zeigen, dass inhalatives CO sowohl die pulmonale Zytokinexpression als auch die Caspaseaktivierung in der Lunge inhibiert [3]. Da Hitzeschockproteine (HSP) wie HSP-32, -70 und -90 für antiinflammatorische und antiapoptotische Wirkungen verantwortlich sein können [4], war es das Ziel dieser Untersuchung, den Einfluss von präoperativ inhaliertem CO auf die Induktion der Hitzeschockantwort in der Lunge zu charakterisieren.

Methodik

Nach Genehmigung des Regierungspräsidiums wurden Schweine der Deutschen Landrasse ($30 \pm 1,5$ kg) kontinuierlich mit Fentanyl

(2-4 $\mu\text{g/kgKG/h}$) und Propofol (3-4 mg/kgKG/h) anästhesiert und kontinuierlich mit Cis-Atracurium (0,5 mg/kgKG/h) relaxiert, kontrolliert beatmet ($\text{FiO}_2 = 0.5$, $\text{PEEP} = 5$ cm H_2O , $\text{V}_T = 8$ ml/kg, $f/\text{min} = 14$) und hämodynamisch überwacht (u.a. Swan-Ganz-Katheter). Die Tiere wurden in drei Gruppen randomisiert: Scheinoperation: SCHEIN ($n=3$); kardiopulmonaler Bypass: CPB ($n=7$); kardiopulmonaler Bypass und Inhalation von CO: CPB+CO ($n=7$). Die Tiere beider CPB-Gruppen wurden für 2 h an eine Herz-Lungenmaschine (Stöckert, München) angeschlossen und für weitere 2 h überwacht. In der Gruppe CPB+CO erfolgte nach endotrachealer Intubation die Inhalation von CO (250 ppm) präoperativ für eine Stunde bis zum Beginn des CPB. Zu den Messzeitpunkten (Ausgangswert, 10 min + 120 min CPB, 15, 60 + 120 min post CPB) wurden Gewebeproben der Lunge entnommen. Die Analyse des Hitzeschockfaktors (HSF) -1 erfolgte mittels 'Electrophoretic mobility shift assay' (EMSA) und die mRNA Expression von hsp-32, -70 und -90 mittels 'Northern Blot'-Technik. Die Proteinexpression von HSP-27, -32, -70, und -90 wurde mittels 'Enzyme linked immunosorbent assay' (ELISA) untersucht. Die Messwerte wurden statistisch durch eine Varianzanalyse (ANOVA mit post hoc Holm-Sidak-Test) verglichen (Signifikanzniveau $p < 0.05$; Mittelwerte \pm Standardabweichung).

Ergebnisse

Präoperativ inhaliertes CO aktivierte zeitunabhängig den HSF-1 (Abb. 1). Die Induktion der mRNA-Expression von hsp-32, -70 und -90 war in der CPB+CO Gruppe signifikant stärker ($p < 0.001$) als in der CPB Gruppe (Abb. 2). Die Proteinexpression von HSP-32, -70 und -90 war in der CPB+CO-Gruppe sowohl während des CPB ►

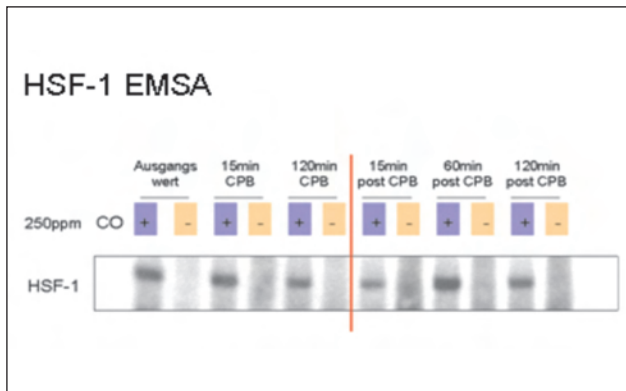


Abb. 1

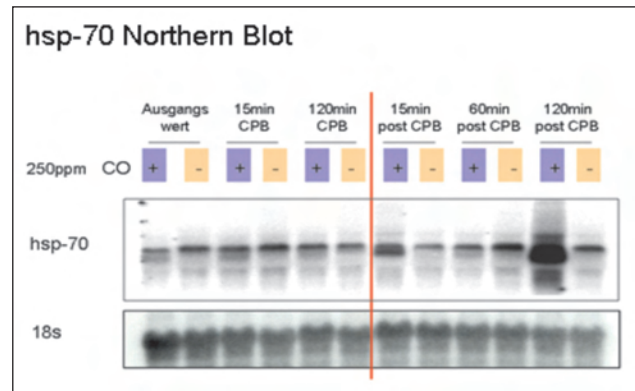
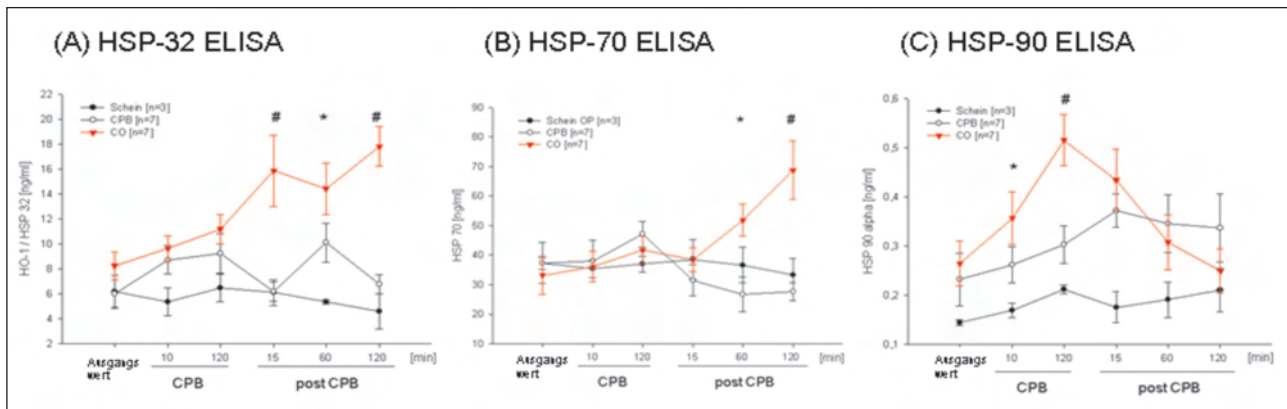


Abb. 2

Abb. 3: * = $p < 0.05$ # = $p < 0.001$ CPB+CO vs. CPB

► (HSP-90, 120min CPB: CPB vs. CPB+CO $p < 0.001$) als auch in der postCPB-Phase (HSP-70, CPB vs. CPB+CO $p > 0.001$; HSP-32 CPB vs. CPB+CO $p < 0.001$) signifikant erhöht (Abb. 3).

Interpretation

Präoperativ inhaliertes CO induziert in der Lunge eine differentielle Hitzeschockantwort während des CPB. Die CO-vermittelte Aktivierung des HSF-1 und der Genexpression der HSP weist auf eine transkriptionelle Regulation hin. Die beschriebenen antiinflammatorischen und antiapoptotischen Wirkungen von HSP-32,

-70 und -90 könnten in diesem Modell auf einen CO-vermittelten protektiven Mechanismus hinweisen.

Literatur

1. Otterbein LE, et al. Nat Med 2000;6:422-428.
2. Lavitrano M, et al. FASEB J 2004;18(10):1093-1095.
3. Goebel U, et al. Anästh Intensivmed 2006;47(Suppl 4):23-24.
4. Kim, et al. J Immunol 2005;175:2622-2629.

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

Korrespondenzadresse: goebel@ana1.ukl.uni-freiburg.de

GABA(A)-Rezeptoren mit einer alpha1-Untereinheit regulieren die Freisetzung von GABA im Vorderhorn des Rückenmarks

C. Grasshoff¹, U. Rudolph² und B. Antkowiak¹

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

² Laboratory of Genetic Neuropharmacology, McLean Hospital, Harvard Medical School, Belmont, Massachusetts, USA

Fragestellung

Die Unterdrückung von Schmerzreflexen ist ein zentraler Aspekt der Allgemeinanästhesie. Anästhetika reduzieren Schmerzreflexe

über eine Hemmung der Erregbarkeit spinaler Neurone. Untersuchungen in vitro konnten zeigen, dass GABAerge Anästhetika selbst bei Verabreichung hoher Konzentrationen die Netzwerkaktivität spinaler Neurone im Vorderhorn des Rückenmarks nur unvollständig unterdrücken [1]. Diese begrenzte Effektivität ist durch die gleichzeitige Wirkung von GABAergen Anästhetika auf erregende (glutamaterge) sowie hemmende (GABAerge) Interneurone bedingt. Während die Effekte auf glutamaterge Interneurone zu einer Reduktion der Aktionspotentialaktivität im Netzwerk des Vorderhorns führen, bewirkt die gleichzeitige Unterdrückung der Freisetzung von GABA das Gegenteil: eine Aktivierung der Netzwerkaktivität [2]. Es ist somit wünschenswert, die Zusammensetzung der Untereinheiten des GABA(A)-Rezeptors auf GABAergen Interneuronen zu kennen, um möglicherweise durch eine Blockade dieser Rezeptoruntergruppe die Effektivität GABAerger Anästhetika im Vorderhorn des Rückenmarks erhöhen zu können. ►

Methodik

Gewebeschnitte wurden den thorakalen und lumbalen Segmenten des Rückenmarks embryonaler 129/SvJ Wildtyp-Mäuse, sowie embryonaler Mäuse mit einer Punktmutation in der $\alpha 1$ -Untereinheit des GABA(A)-Rezeptors (E13-15) entnommen und nach der von Gähwiler beschriebenen Methode für mindestens 14 Tage kultiviert. GABA(A)-Rezeptoren mit dieser Punktmutation sind insensitive für Diazepam, nicht jedoch für GABA. Aktionspotentiale von Interneuronen des Vorderhorns wurden extrazellulär registriert sowie aktionspotentialabhängige postsynaptische Ströme (sIPSCs) von GABAergen Rezeptoren mittels „whole-cell patch-clamp“-Technik im „voltage-clamp“-Modus bei einer Membranspannung von -70 mV gemessen. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt.

Ergebnisse

Extrazelluläre Messungen der Netzwerkaktivität zeigen, dass Diazepam die Spontanaktivität spinaler Neurone konzentrationsabhängig vermindert. Die Konzentration halbmaximaler Wirkung (EC_{50}) beträgt $1,36 \pm 0,16 \mu\text{M}$. Bei einer Konzentration von $5 \mu\text{M}$ erreicht die Konzentrations-Wirkungskurve bei ca. 60% Hemmung der Spontanaktivität ein Plateau. Höhere Diazepamkonzentrationen (bis $15 \mu\text{M}$) können diesen Effekt nicht steigern. Somit zeigt Diazepam eine limitierte Effektivität, spinale Neurone zu hemmen. In der Mutante ist Diazepam potenter ($EC_{50} = 0,93 \pm 0,09 \mu\text{M}$) bei einer höheren Effektivität, spinale Netzwerkaktivität zu hemmen (ca. 72%). Beide Konzentrations-Wirkungskurven unterscheiden sich signifikant ($p < 0,001$; F-Test). Die mit einer monophasischen Exponentialfunktion quantifizierten Abklingzeiten der sIPSCs (Kontrolle: $30,96 \pm 1,47 \text{ ms}$; $n=31$) werden durch Diazepam konzentrationsabhängig verlängert (Diazepam $1,5 \mu\text{M}$: $54,88 \pm 4,72 \text{ ms}$; Diazepam $5 \mu\text{M}$: $82,67 \pm 6,59 \text{ ms}$; $n=10$). Die Ergebnisse von Messungen der sIPSCs der Mutante ergeben keinen signifikanten Unterschied für die Wirkung von Diazepam. Im Wildtyp verringert Diazepam die Frequenz der sIPSCs konzentrationsabhängig um $20,22 \pm 3,74\%$ (Diazepam $1,5 \mu\text{M}$) bzw. $34,88 \pm 4,40\%$ (Diazepam $5 \mu\text{M}$). Im Gegensatz zum Wildtyp kommt es bei der Mutante zu keiner Verringerung der IPSC-Frequenz (Diazepam $1,5 \mu\text{M}$: $-10,83 \pm 4,11\%$; Diazepam $5 \mu\text{M}$: $-6,86 \pm 7,46\%$; beides $p < 0,001$, $n=7$).

Interpretation

Die Wirkung von Diazepam auf die Spontanaktivität spinaler Neurone ist, ähnlich der Wirkung von Propofol [1], limitiert. Die Verminderung der Frequenz spontaner IPSCs zeigt, dass Diazepam die Aktivität GABAerger Interneurone und damit die präsynaptische Freisetzung von GABA im Rückenmark unterdrückt. Diese Unterdrückung der Freisetzung von GABA wird durch GABA(A)-Rezeptoren mit einer $\alpha 1$ -Untereinheit vermittelt, denn sie ist in organotypischen Schnitten der Mutante nicht mehr zu beobachten (Abb. 1). Daher ist die Effektivität von Diazepam,

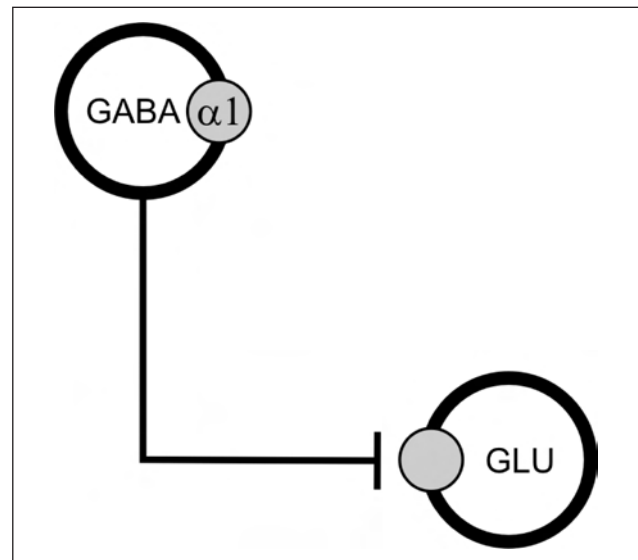


Abb. 1: Vereinfachtes Schaltbild von GABAergen und glutamatergen Interneuronen im Vorderhorn des Rückenmarks. Die grauen Kreise stellen GABA(A)-Rezeptoren dar. Anästhetika vermindern über die Modulation der GABA(A)-Rezeptoren auf GABAergen Interneuronen die Freisetzung von GABA und begrenzen damit ihre Effektivität, die spinale Netzwerkaktivität im Vorderhorn des Rückenmarks zu unterdrücken. Ergebnis der Studie unter Verwendung von Punktmutationen an GABA(A)-Rezeptoren ist, dass die Freisetzung von GABA durch GABA(A)-Rezeptoren mit einer $\alpha 1$ -Untereinheit reguliert wird.

die spinale Netzwerkaktivität zu hemmen, in der Mutante signifikant erhöht. Hieraus folgern wir, dass die Blockade von GABA(A)-Rezeptoren mit einer $\alpha 1$ -Untereinheit ein potentes Ziel darstellt, die Effektivität von GABAergen Anästhetika im Vorderhorn des Rückenmarks zu steigern.

Literatur

1. Grasshoff C, Antkowiak B. Propofol and sevoflurane depress spinal neurons in vitro via different molecular targets. *Anesthesiology* 2004;101(5):1167-1176.
2. Grasshoff C, Antkowiak B. Spinal Effects of Etomidate in vitro. *Anesthesiology* 2005;101:A-126.

Korrespondenzadresse: christian.grasshoff@uni-tuebingen.de

Isofluran-Anästhesie bewirkt eine selektive Hochregulierung der NMDA-Rezeptor-2B (NR2B)-Untereinheit und eine Verstärkung der In-vitro-Langzeit-Poten-zierung(LTP) im Hippocampus der Maus

R. Haseneder¹, L. Starker¹, J. Berkmann¹, E. Kochs¹, M. Blobner¹ und G. Rammes^{1,2}

¹ Klinik für Anaesthesiologie, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München

² Max-Planck-Institut für Psychiatrie, Klinische Neuropathologie, München

Fragestellung

Postoperative kognitive Dysfunktion (POCD) beschreibt eine Abnahme der kognitiven Leistungsfähigkeit über Wochen und Monate nach operativen Eingriffen [1]. Bis jetzt ist unklar, ob die POCD durch die Operation per se oder durch die Allgemeinanästhesie verursacht wird. Obwohl volatile Anästhetika eine relativ unspezifische und niedrigpotente Wirkung besitzen, stellen sich die ligandengesteuerten Ionenkanäle als zentrale Zielstruktur für Allgemeinanästhetika heraus [2]. Eine Verstärkung GABAerger und die Hemmung glutamaterger Rezeptorwirkungen durch volatile Anästhetika konnten detailliert im Hippocampus, einer wichtigen Hirnregion für Lern- und Gedächtnisleistungen, beobachtet werden. Die Aktivierung des NMDA-Rezeptors ist eine wichtige Voraussetzung für die Induktion von LTP, ein zelluläres Modell ▶

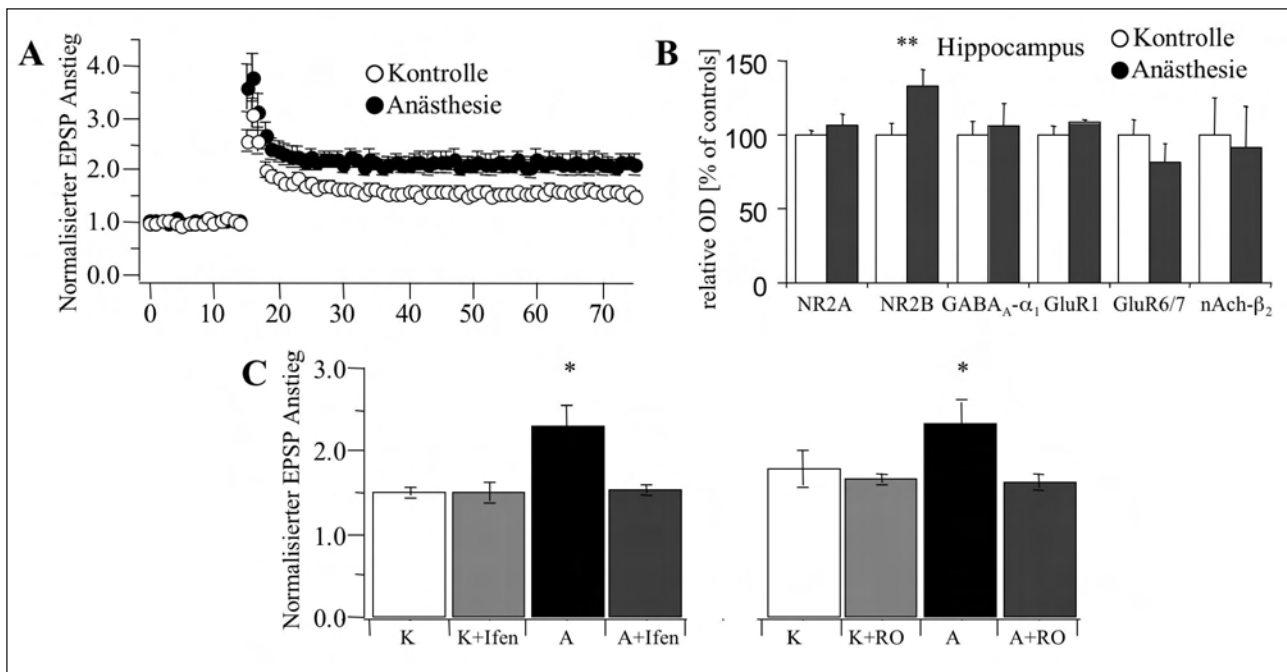


Abb. 1: (A) Verstärkte LTP nach Isofluran-Anästhesie im Hippocampus. (B) Selektive Hochregulierung der NR2B-Untereinheit im Hippocampus. (C) Die spezifischen NR2B-Antagonisten Ifenprodil (links) und RO 256981 (rechts) inhibieren die durch die Anästhesie induzierte Verstärkung der LTP und haben per se keinen Effekt auf die Induktion der LTP (K=Kontrolle, A=Anästhesie, Ifen=Ifenprodil, RO=RO256981; alle Gruppen n=12).

► für Lernen und Gedächtnis [3]. Bis jetzt ist die postanästhetische Wirkung auf die LTP noch nicht untersucht worden.

Methodik

Nach Genehmigung durch die Regierung von Oberbayern wurden männliche C57BL6/J-Mäuse (4-6 Monate) mit einem Isofluran, Sauerstoff/Luft-Gemisch (FiO₂=0,5) für 2 Stunden bei einem MAC (1,35 Vol%, n=42) anästhesiert. Geschwistertiere dienten als Kontrollen. 24 Stunden nach einer Isofluran-Anästhesie untersuchten wir die Wirkung auf die LTP-Induktion in sagittalen Hirnschnittpräparaten. Synaptisch evozierte Potenziale (EPSPs) wurden extrazellulär von Neuronen der CA1-Region abgeleitet. LTP wurde ausgelöst durch eine afferente tetanische Stimulation (100 Hz/1 s). Die Western-Blot-Technik wurde angewandt, um etwaige Veränderungen des Expressionsmusters spezifischer Rezeptoruntereinheiten in verschiedenen Hirnregionen zu detektieren. Die Signifikanz-Prüfung erfolgte mittels zweiseitigem Student's t-Test für verbundene oder unabhängige Stichproben.

Ergebnisse

Unter Kontrollbedingungen induzierte der Tetanus eine LTP und potenzierte die Amplitude der EPSPs um $57 \pm 7\%$ (n=20), während in Hirnschnitten von anästhesierten Tieren die LTP verstärkt war ($110 \pm 17\%$, n=18; p<0,05). Die Western-Blot-Analyse zeigte eine selektive Hochregulierung der NR2B-Untereinheit im Hippo-

campus nach der Anästhesie ($133 \pm 11\%$, n=16; p<0,01). Diese Steigerung des Anteils an NR2B-Untereinheiten könnte für die Verstärkung der LTP verantwortlich sein. Um diese Hypothese zu testen, wurden entweder Ifenprodil (3 μM) oder RO 256981 (0,5 μM), zwei spezifische NR2B-Antagonisten, appliziert. Waren die NR2B-Untereinheiten pharmakologisch blockiert, konnte die Anästhesie-induzierte Verstärkung der LTP nicht mehr beobachtet werden.

Interpretation

NMDA-Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle bei der Induktion von LTP. Die NR2B-Untereinheit ist dabei ein bestimmender Faktor. Die durch die Isofluran-Anästhesie vermittelte spezifische Hochregulierung der NR2B-Untereinheit könnte zu einer Verstärkung der LTP im Hippocampus führen.

Literatur

1. Rohan D, Buggy DJ, Crowley S, Ling FK, Gallagher H, Regan C, et al. Increased incidence of postoperative cognitive dysfunction 24 hr after minor surgery in the elderly. *Can J Anaesth* 2005;52:137-142.
2. Urban BW, Bleckwenn M, Barann M. Interactions of anaesthetics with their targets: non-specific, specific or both? *Pharmacol Ther* 2006;111:729-770.
3. Malenka RC, Bear MF. LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* 2004;44:5-11.

Korrespondenzadresse: rammes@mpipsykl.mpg.de

Morphologische Veränderungen glycinerg Neurotransmission im Rückenmark nach Induktion neuropathischer Schmerzen

H. Hermanns¹, P. Lipfert¹, H.U. Zeilhofer², L. Go¹ und U. Muth-Selbach¹

¹ Klinik für Anaesthesiologie, Universitätsklinikum Düsseldorf, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

² Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Zürich

Fragestellung

Bei der Entstehung neuropathischer Schmerzen werden sowohl funktionelle als auch strukturelle Veränderungen im Sinne eines Verlustes inhibitorischer spinaler Neurone diskutiert. Es existieren Hinweise über das Auftreten dunkler Neurone in den Laminae I – III sowie über apoptotische Prozesse und eine Reduktion GABAerger Neurone nach Neuropathieinduktion. In anderen Studien konnte kein Hinweis auf Verlust von Neuronen des Hinterhorns gefunden werden. Wir haben die Hypothese überprüft, ob die Induktion einer Neuropathie bei Mäusen zu einer Verminderung glycinerg Neurone im Rückenmark führt.

Methodik

Die Versuche wurden mit Genehmigung der Bezirksregierung bei 18 transgenen Mäusen durchgeführt, welche EGFP (enhanced green fluorescent protein) unter Kontrolle eines GlyT2-Promotors spezifisch in glycinergen Neuronen exprimieren [1]. Bei 6 Tieren wurde in Barbituratanästhesie eine chronische constriction injury (CCI) des linken N. ischiadicus durchgeführt, bei 6 Tieren wurde der Nerv mobilisiert, aber keine CCI durchgeführt (Sham). Sechs Tiere dienten als Kontrollgruppe – sie erhielten weder einen operativen Eingriff noch Schmerztestung. Die Schmerztestung der operierten Tiere erfolgte vor dem Eingriff sowie am 10. Tag. Es folgte die Entnahme lumbaler und thorakaler Rückenmarksegmente sowie nach digitaler Bildgewinnung die Quantifizierung der Immunfluoreszenz. Die Anzahl der Neurone wurde mittels einfaktorieller ANOVA und anschließender post-hoc Scheffé-Prozedur verglichen.

Ergebnisse

Bei allen 6 Tieren mit CCI wurde eine thermale Hyperalgesie und mechanische Allodynie ausgelöst. Auf der kontralateralen Seite kam es ebenfalls zu einer leichten Schwellenerniedrigung. Bei den 6 scheinoperierten Tieren war dies nicht der Fall. Die Quantifizierung ergab eine signifikant verminderte Anzahl fluoreszierender Neurone in der Gruppe mit CCI im Vergleich zur Kontrollgruppe, und zwar sowohl im linken als auch im rechten Dorsalhorn des lumbalen Segments. Des Weiteren wurden in der Sham-Gruppe sowohl auf lumbaler als auch auf thorakaler Ebene signifikant mehr fluoreszierende Neurone gezählt als in der Kontrollgruppe (Abb. 1).

Interpretation

Die Induktion einer CCI als Modell für neuropathischen Schmerz bei Mäusen führt zu einer Verminderung glycinerg Neurone im Rückenmark. Überraschend ist die vermehrte Anzahl glycinerg Neurone in der Sham-Gruppe. Möglicherweise hat die Auslösung von Schmerzreizen bei der Schmerztestung kurz vor der Entnahme zu einer vermehrten Freisetzung inhibitorischen Glycins und konsekutiv zu einer Up-Regulation des Glycintransporters GlyT2 geführt. Die in der Literatur strittige Hypothese, dass es durch Induktion neuropathischer Schmerzen zu einem Untergang spinaler Neurone im Sinne einer strukturellen Desinhibition kommt [2,3], konnte somit durch unsere Untersuchung untermauert werden. Die Veränderungen auch auf der kontralateralen Seite sowie im thorakalen Rückenmark zeigten, dass der beobachtete Effekt das gesamte glycinerge System im Rückenmark zu beeinflussen scheint.

Literatur

1. Zeilhofer H, Studler B, Arabadzisz D, et al. Glycinergic neurons expressing enhanced green fluorescent protein in bacterial artificial chromosome transgenic mice. *J Comp Neurol* 2005;482:123-141.
2. Moore KA, Kohno T, Karchewski LA, et al. Partial Peripheral Nerve Injury Promotes a Selective Loss of GABAergic Inhibition in the Superficial Dorsal Horn of the Spinal Cord. *J Neurosci* 2002;22:6724-31.
3. Polgar E, Gray S, Riddell J, Todd A. Lack of evidence for significant neuronal loss in laminae I-III of the spinal dorsal horn of the rat in the chronic constriction injury model. *Pain* 2004;111:144-150.

Gefördert von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Sachbeihilfe MU 2712/1-1 an U. Muth-Selbach und P. Lipfert).

Korrespondenzadresse: Henning.Hermanns@uni-duesseldorf.de

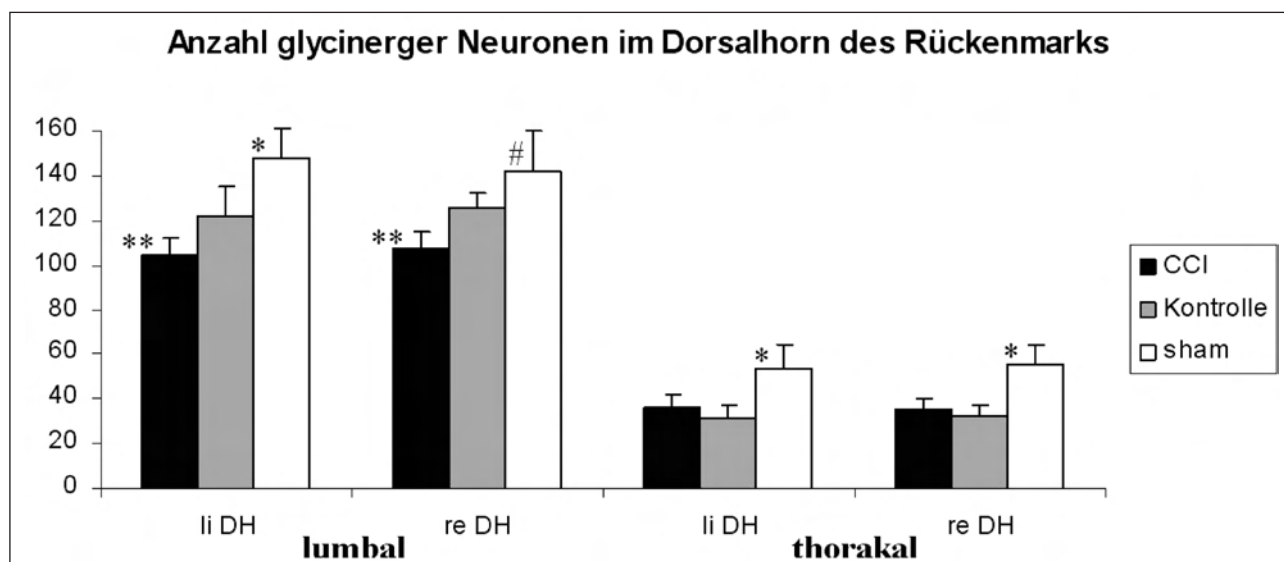


Abb. 1: * p < 0,001; ** p < 0,03; # p < 0,05 im Vergleich zur Kontrollgruppe (ANOVA mit post-hoc Scheffé-Prozedur); DH: Dorsalhorn.

Die prophylaktische Inhalation von Interleukin-10 vermindert das Biotrauma bei beatmungsinduziertem Lungenschaden (VILI) der Ratte

S. Hoegl, K.A. Boost, C. Hofstetter, P. Scheiermann, M. Flondor und B. Zwissler

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

Fragestellung

Eine mögliche Komplikation bei mechanischer Beatmung kritisch kranker Patienten ist der beatmungsinduzierte Lungenschaden (ventilator induced lung injury, VILI). Hohe Tidalvolumina (Volutrauma) führen u.a. zur intrapulmonalen Aktivierung immunkompetenter Zellen sowie konsekutiver Freisetzung von Entzündungsmediatoren (Biotrauma) [1]. Diese Umwandlung des mechanischen Stimulus in biochemische bzw. molekulare Veränderungen erfolgt über die komplexe Interaktion unterschiedlicher intrazellulärer Signalwege (Mechanotransduktion) und endet in der Zerstörung der alveolokapillären Einheit. Beim Endotoxinämie-induzierten Lungenschaden konnte die pulmonale Inflammation durch die Inhalation des antiinflammatorischen Zytokins Interleukin (IL)-10 vermindert werden [2]. Wir stellten uns die Frage, inwieweit sich dieses Konzept auf den beatmungsinduzierten Lungenschaden übertragen lässt.

Methodik

Nach Genehmigung durch die Tierversuchskommission erfolgte die Untersuchung an 36 narkotisierten (Fentanyl/Pentobarbital, i.v.), kontrolliert beatmeten Sprague-Dawley-Ratten (δ , 599 ± 68 g). Nach Tracheotomie sowie Kanülierung der Leistengefäße wurden die Tiere zufällig folgenden 4 Versuchsgruppen ($n=9$) zugeteilt: Sham: Beatmung der Tiere für 4h (Stephanie®, p_{max} : 20mbar, PEEP: 4mbar, f: 30/min, FIO_2 : 0,21, I:E=1:2) ohne weitere Intervention; VILI: Induktion eines mechanischen Lungenschadens durch 20min Beatmung mit p_{max} : 45mbar, PEEP: 0, I:E=1:1; IL-10high (10 $\mu\text{g/kgKG}$) bzw. IL-10low (1 $\mu\text{g/kgKG}$): vor VILI-Induktion 40min Jet-Vernebelung von IL-10. Nach einem maximalen Beobachtungszeitraum von 4h nach Schädigung wurden die Tiere exsanguiniert und anhand des Ausmaßes von Einblutungen und Infarzierung der makroskopische Lungenscore (0-16) [3] bestimmt. Um die Entzündungsantwort im 2- bis 4h-Intervall nach VILI-Induktion beurteilen zu können, wurden weiterführende Untersuchungen nur bei Tieren durchgeführt, die mindestens 2h nach VILI-Induktion überlebten (n_{2-4h}). Hierfür wurde der akzessorische Lungenlappen entnommen und eine bronchoalveoläre Lavage (BAL) durchgeführt. Als Hinweis auf eine pulmonale Schrankenstörung wurden in der BAL der Proteingehalt (nach Bradford) sowie zur Quantifizierung der pulmonalen Inflammation die Konzentrationen der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und MIP-2 (Macrophage Inflammatory Protein-2) bestimmt. Als weitere Indikatoren der zellulären Stressantwort dienten Matrixmetalloproteinasen (MMP) und Hitzeschockprotein (HSP)-70 [3].

Die statistische Auswertung erfolgte mittels Rangsummentest mit Bonferroni-Korrektur, $p < 0,05$, Angabe der Ergebnisse als Median [Semi-IQR].

Ergebnisse

Die Inhalation von IL-10 (10 $\mu\text{g/kgKG}$) konnte die makroskopisch sichtbare Lungenschädigung signifikant vermindern, die 10fach niedrigere Dosierung von IL-10 zeigte geringere protektive Effekte (Lungenscore: Sham: 0, VILI: 11,0[0,5], IL-10high: 4,0[0,5], IL-10low: 9,0[3,0]). Der Proteingehalt in der BAL war in beiden IL-10-

Gruppen signifikant vermindert (Sham ($n_{2-4h}=9$): 249[15] $\mu\text{g/ml}$, VILI ($n_{2-4h}=7$): 1469[215] $\mu\text{g/ml}$, IL-10high ($n_{2-4h}=8$): 859[308], IL-10low ($n_{2-4h}=4$): 929[250]). Auch die pulmonalen Konzentrationen von IL-1 β und MIP-2 sowie die Expression von MMP-9 und HSP-70 wurden durch IL-10-Aerosol reduziert (Abb. 1-3).

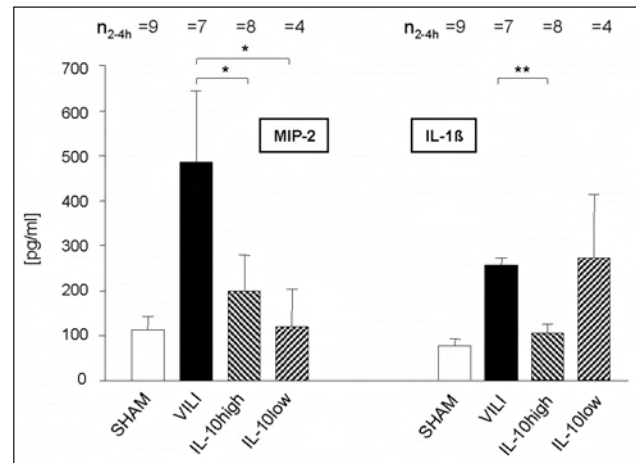


Abb. 1: Zytokinkonzentrationen in der BAL, ELISA.

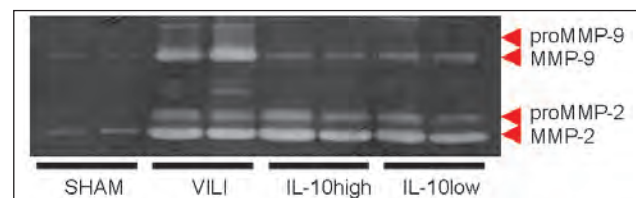


Abb. 2: Zymogramm; latente/aktive Formen von MMP, BAL, exemplarisch je 2 Tiere/Gruppe.

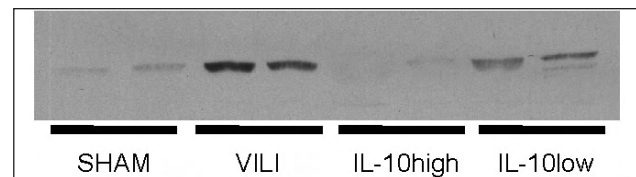


Abb. 3: Western Blot gegen HSP-70, Lungenhomogenat, exemplarisch je 2 Tiere/Gruppe.

Interpretation

Die prophylaktische Inhalation von Interleukin-10 vermindert die pulmonale Entzündungsreaktion und Stressantwort bei beatmungsinduzierter Lungenschädigung der Ratte und verringert sowohl die pulmonale Schrankenstörung als auch den Gewebeschaden.

Literatur

1. Chiumello D, Pristine G, Slutsky AS. Mechanical ventilation affects local and systemic cytokines in an animal model of acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:109-116.
2. Hofstetter C, Flondor M, Hoegl S, Muhl H, Zwissler B. Interleukin-10 aerosol reduces proinflammatory mediators in bronchoalveolar fluid of endotoxemic rat. *Crit Care Med* 2005;33:2317-2322.
3. Foda HD, Rollo EE, Drews M, et al. Ventilator-induced lung injury upregulates and activates gelatinases and EMMPRIN: attenuation by the synthetic matrix metalloproteinase inhibitor, Prinomastat (AG3340). *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001;25:717-724.

Korrespondenzadresse: Hoegl@med.uni-frankfurt.de

Xenonapplikation nach Beendigung einer extrakorporalen Zirkulation mit zerebralen Luftembolien verschlechtert die neurokognitive Funktion im Rattenmodell

B. Jungwirth, M.L. Gordan, J. Berkmann, M. Blobner und E.F. Kochs

Klinik für Anaesthesiologie, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München

Fragestellung

Neben möglichen neuroprotektiven Eigenschaften spricht auch die mit Xenon verbundene hämodynamische Stabilität für dessen Einsatz bei herzchirurgischen Patienten [1]. Der Nachteil von Xenon besteht allerdings in seiner physikalischen Eigenschaft, Luftbläschen zu vergrößern [2], die während herzchirurgischer Operationen mit extrakorporaler Zirkulation (EKZ) als zerebrale Luftembolien (ZLE) nachweisbar sind und als ursächlich für kognitive Defizite diskutiert werden. So konnten wir in einer Voruntersuchung zeigen, dass eine kontinuierliche Xenoninhalation vor, während und nach EKZ mit ZLE im Rattenmodell zu einer Verschlechterung der postoperativen kognitiven Funktion führte [3]. Inwieweit diese Verschlechterung durch Beschränkung der Xenoninhalation auf die Phasen vor, während oder nach EKZ mit ZLE verändert werden kann, soll in dieser Studie untersucht werden.

Methodik

Nach Einverständnis der Tierschutzkommission wurden 40 Ratten einer 90-minütigen normothermen EKZ unterzogen, während der sie 10 repetitiv verabreichte ZLE (0,3 µl pro Einzelbolus) über die rechte Arteria carotis interna erhielten. Es wurden entsprechend der unterschiedlichen Zeitpunkte der Xenoninhalation vier Gruppen (n=10) untersucht, die entweder kein Xenon (0-0-0), 55% Xenon (zusätzlich zu einer intravenösen Basisanästhesie) vor EKZ (1-0-0), während EKZ (0-1-0) oder nach EKZ mit ZLE (0-0-1) erhielten. Die motorische und kognitive Funktion der Ratten wurde bis zum 21. postoperativen Tag mittels des modifizierten Hole-Board-Testes untersucht. Eine Kontrollgruppe (n=10) wurde weder anästhesiert noch operiert, aber dem modifizierten Hole-Board-Test unterzogen. Die Ergebnisse der Gruppen wurden mit ANOVAs verglichen.

Ergebnisse

Die Ratten, die Xenon nur nach EKZ mit ZLE erhielten, zeigten eine bis zum 21. Tag persistierende feinmotorische Schädigung (Abb. 1) sowie eine Beeinträchtigung der kognitiven Leistungsfähigkeit (Abb. 2).

Interpretation

Mit dieser Studie sollte untersucht werden, ob durch eine Beschränkung der Xenoninhalation auf die herzchirurgischen Phasen, in denen das Auftreten zerebraler Luftembolien eher unwahrscheinlich ist (vor oder nach EKZ), die postoperative kognitive Funktion im Sinne eines neuroprotektiven Effektes verbes-

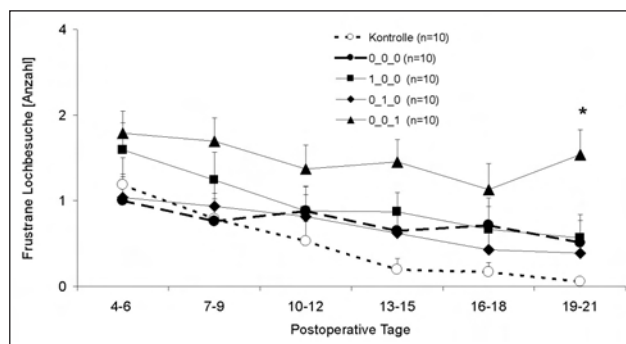


Abb. 1: Anzahl der frustrierten Lochbesuche als Parameter für feinmotorische Fähigkeiten. Die Tiere mit Xenon nach EKZ/ZLE zeigten bis zum 21. Tag mehr frustrierte Lochbesuche als die übrigen (*p<0,05)

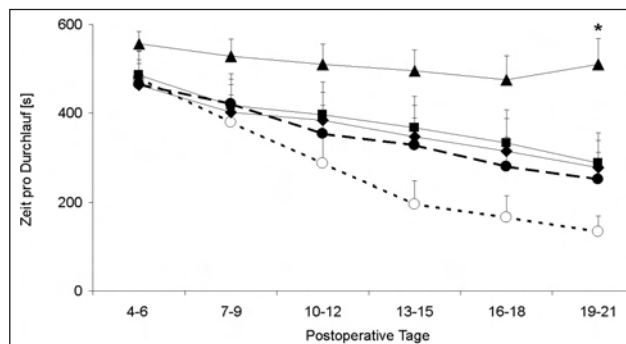


Abb. 2: Kognitive Leistungsfähigkeit im Zeitverlauf. Die Tiere mit Xenon nach EKZ/ZLE benötigen bis zum 21. Tag durchschnittlich mehr Zeit für einen Durchlauf als die übrigen Tiere (*p<0,05)

sert werden kann. Überraschenderweise war ein solcher Effekt für Xenon in keiner dieser Gruppen nachweisbar, ganz im Gegenteil: die Tiere, die Xenon nach EKZ mit ZLE erhielten, zeigten eine deutliche Beeinträchtigung der kognitiven Leistungsfähigkeit. Ob dies auf eine Verbesserung des zerebralen Blutflusses nach EKZ mit besserem Anfluten von Xenon und damit Vergrößerung der noch vorhandenen Luftblasen oder auf eine Veränderung der Resorptionseigenschaften durch Xenon zurückzuführen ist, bleibt in weiteren Studien zu untersuchen.

Literatur

1. Ma D, Yang H, Lynch J, Franks NP, Maze M, Grocott HP. Xenon attenuates cardiopulmonary bypass-induced neurologic and neurocognitive dysfunction in the rat. *Anesthesiology* 2003;98:690.
2. Lockwood G. Expansion of air bubbles in aqueous solutions of nitrous oxide or xenon. *Br J Anaesth* 2002;89:282.
3. Jungwirth B, Gordan ML, Blobner M, Schmehl W, Kochs EF, Mackensen GB. Xenon impairs neurocognitive and histologic outcome after cardiopulmonary bypass combined with cerebral air embolism in rats. *Anesthesiology* 2006;104:770.

Korrespondenzadresse: b.jungwirth@lrz.tum.de

Validierung des POVOC-Scores zur Prädiktion kindlichen Erbrechens in der postoperativen Phase

P. Kranke¹, H. Toker², P. Kiefer², H. Wulf³, N. Roewer¹ und L. Eberhart³

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

² Abteilung für Anästhesie, Evangelisches Krankenhaus Oberhausen

³ Klinik für Anästhesie und Intensivtherapie des Universitätsklinikums Giessen und Marburg GmbH, Standort Marburg

Fragestellung

Für erwachsene Patienten existieren zahlreiche Modelle zur Risikoeinschätzung für Übelkeit und Erbrechen (PÜ&E) in der postoperativen Phase. Die für erwachsene Patienten entwickelten Risikoscores sind jedoch nicht geeignet, das Risiko für postoperatives Erbrechen (PE) bei Kindern einzuschätzen, weil die Vorhersagekriterien dieser Modelle (z.B. Nichtraucherstatus) nicht auf das pädiatrische Patientenkollektiv übertragbar sind. Mit dem POVOC-Score (Postoperative Vomiting in Children-Score) wurde erstmals ein für diese Patientengruppe praktikables Vorhersagemodell entwickelt, das sich aus den Parametern „OP-Dauer \geq 30 Minuten“, „Alter \geq 3 Jahre“, „Strabismus-Operation“ sowie „Vorliegen von Reisekrankheit bzw. PÜ&E beim Patienten und / oder den Eltern / Geschwistern des Patienten“ zusammensetzt [1]. Die erwartete Inzidenz für PE im Rahmen einer durch Opioide supplementierten Allgemeinanästhesie unter Verwendung volatiler Anästhetika beträgt dabei 9%, 10%, 30%, 55% und 70% beim Vorliegen von 0, 1, 2, 3 bzw. 4 dieser Risikofaktoren. Der POVOC-Score wurde jedoch bislang nicht an einem externen Patientenkollektiv validiert. Diese Studie untersuchte daher die Validität des POVOC-Scores und seine Übertragbarkeit auf ein anderes Patientenkollektiv einer anderen Institution und unter Berücksichtigung des Fehlens eines Risikofaktors (Strabismus-Chirurgie). Zudem wurde untersucht, ob weitere Faktoren als Ersatz für das Fehlen der Strabismus-Chirurgie als Risikofaktor geeignet sind.

Methodik

Mit Einwilligung der Ethikkommission und Einverständnis der Eltern erfolgte die prospektive Erfassung patientenbezogener Risikofaktoren, des anästhesiologischen Vorgehens sowie des Auftretens von PE in den ersten 24 Stunden postoperativ bei 673 kinderchirurgischen Patienten. Die bestehenden Anästhesiestandards (durch Opioide supplementierte inhalative Anästhesie, Inhalationsanästhesie bzw. Kombinationsverfahren durch Anlage einer Regionalanästhesie zur intra- bzw. postoperativen Analgesie) wurden nicht verändert, und es wurde keine antiemetische Prophylaxe durchgeführt. Die Qualität der Vorhersage wurde anhand dreier üblicher Kriterien evaluiert: Praktikabilität, Diskriminationseigenschaft und Kalibrationscharakteristik. Die Diskriminationseigenschaft, also die Fähigkeit des Scores, einen individuellen Patienten mit PE von einem Patienten ohne PE zu unterscheiden, wurde anhand der Flächen unter der „receiver operating characteristic“-Kurve (AUC) bestimmt. Ein signifikanter Unterschied wurde angenommen, wenn der Wert des 95% Konfidenzintervalles (KI) der AUC über 0,5 lag.

Ergebnisse

In die Auswertung konnten die Daten von 524 Patienten aufge-

nommen werden. Die Erhebung der Risikofaktoren konnte in 95% der Fälle komplett erfolgen. Die Erbrechenshäufigkeit beim Vorhandensein von 0 bis 3 der erhobenen POVOC-Kriterien betrug 3,4% (KI: 0,7-9,7%), 11,6% (KI: 7,4-17,1%), 28,2% (KI: 21,6-35,6%) und 42,3% (KI: 31,2-54,0%). Die beschriebenen Inzidenzen der POVOC-Studie lagen somit, mit Ausnahme der Inzidenz für 3 Risikofaktoren (55%), im 95%-KI des vorliegenden Validierungsdatensatzes. Werden die aufgrund des POVOC-Scores erwarteten Inzidenzen für PE gegen die tatsächlich gefundenen Inzidenzen aufgetragen, ergibt sich die Kalibrationskurve mit einer Steigung der Regressionsgeraden von 0,78. Die Regressionsgerade schneidet die y-Achse bei 2,37. Zwischen den erwarteten Wahrscheinlichkeiten und den tatsächlichen Erbrechensinzidenzen gibt es eine hochgradige Korrelation ($R^2=0,94$). Die AUC betrug 0,72 (KI: 0,68 - 0,76) und war damit identisch mit dem Evaluationsdatensatz. Das KI der AUC für PE schloss den Wert „0,5“ nicht mit ein. Die Untersuchung weiterer potenzieller Risikofaktoren als Ersatz für den Wegfall des Faktors „Strabismus-Operation“ ergab für die postoperative Opioidtherapie mit Piritramid als vierten Risikofaktor mit einer AUC von 0,76 (KI: 0,72-0,80) die beste Prädiktion. Die Werte für Sensitivität und Spezifität unter Berücksichtigung der jeweiligen Scorekriterien sind in Tab. 1 dargestellt.

Tab. 1

Kriterien	POVOC-Score		POVOC + Piritramid	
	Sensitivität	Spezifität	Sensitivität	Spezifität
≥ 0	100,0	0,0	100,0	0,0
> 0	97,2	20,1	98,1	14,8
> 1	76,4	60,0	89,6	42,1
> 2	31,1	89,2	67,9	76,3
> 3	0,0	100,0	27,4	93,8
> 4	--	--	0,0	100,0

Interpretation

Die Parameter des POVOC-Scores sind einfach und umfassend zu erheben. Das Auftreten von PE ist auch bei Fehlen eines Faktors (Strabismus-Chirurgie) im Validierungsdatensatz vergleichbar gut vorauszusagen wie im Datensatz der POVOC-Studie. Anhand der Kalibrationseigenschaften konnte gezeigt werden, dass für den einzelnen Patienten die vorausgesagte PE-Wahrscheinlichkeit gut mit der tatsächlichen PE-Inzidenz korreliert. Bei Fehlen des Risikofaktors „Strabismus-Chirurgie“ kann ein modifizierter Score unter Berücksichtigung des Faktors „postoperative Opioidtherapie mit Piritramid“ empfohlen werden. Angesichts der Limitationen aller bislang verfügbaren Vorhersagemodelle muss die Therapie bestehender Symptome jedoch nach wie vor als wesentlichste Säule in einem antiemetischen Algorithmus angesehen werden [2].

Literatur

1. Eberhart LH, Geldner G, Kranke P, Morin AM, Schäffelen A, Treiber H, et al. The development and validation of a risk score to predict the probability of postoperative vomiting in pediatric patients. *Anesth Analg* 2004;99:1630-1637.
2. Eberhart LH, Frank S, Lange H, Morin AM, Scherag A, Wulf H, et al. Systematic review on the recurrence of postoperative nausea and vomiting after a first episode in the recovery room - implications for the treatment of PONV and related clinical trials. *BMC Anesthesiol* 2006;6:14.

Korrespondenzadresse: peter.kranke@t-online.de

In-vivo-Tracking nah-infrarot Fluoreszenz-markierter Makrophagen im Maus-Peritonitismodell mittels Fluoreszenz-mediierter-Tomographie

J. Larmann¹, T. Frenzel^{1,2}, A. Hahnenkamp², A. Swintek^{1,2}, M. Schmitz², C. Bremer³ und G. Theilmeier^{1,2}

¹ Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin,

² Institut für Anatomie,

³ Institut für Klinische Radiologie,

Universitätsklinikum Münster, Westfälische Wilhelms-Universität Münster

Fragestellung

Die Peritonitis (PT) gehört zu den führenden Todesursachen in der Intensivmedizin. Ein bestimmendes Motiv ihrer Pathophysiologie ist die exzessive Rekrutierung von Leukozyten zum Fokus der Entzündung. Die Leukozyteninvasion hat die Bekämpfung der krankheitsauslösenden Infektion zum Ziel, führt aber gleichzeitig zu weiterer Gewebeschädigung. Die Rekrutierung von Leukozyten durch einen inflammatorischen Stimulus kann in vivo derzeit nicht dargestellt werden. Neuerdings werden optische Bildgebungsmethoden auf der Basis von nah-infrarot Fluorophoren (NIRF) entwickelt, die bei hervorragender Gewebepenetration ein ideales Signal-Rausch-Verhältnis aufweisen. Diese Techniken erlauben die Abbildung von zellulären und molekularen Vorgängen in vivo [1]. Wir haben die Fluoreszenz-Medierte-Tomographie (FMT) [1] genutzt, um zu untersuchen, ob in einem PT-Modell in der lebenden Maus die Rekrutierung von NIRF-markierten Makrophagen (MØ) in das Peritoneum diagnostizierbar ist. Urokinase-Rezeptor-defiziente (u-PAR^{-/-})-Mäuse, die phänotypisch einen Leukozyten-Rekrutierungsdefekt aufweisen [2], wurden im FMT untersucht, um unterschiedliche PT-Intensitäten zu quantifizieren.

Methodik

Die Tierversuche wurden von der zuständigen Tierschutzkommission genehmigt. Peritoneale, durch Lavage aus Thioglycollat-behandelten enhanced-Green-Fluorescent-Protein (eGFP)-transgenen Mäusen gewonnene MØ wurden mit dem nah-infrarot Fluorophor DiR gefärbt (20 µg DiR/10⁶ MØ/ml HBSS für 10 min bei Raumtemperatur, 98,6% Propidium-Iodid-negativ). In einem in vitro Transmigrationsassay wurde das Migrationsverhalten DiR-gefärbter MØ durch TNF- α -aktivierte- oder Kontroll-Endothelzellen (EC) überprüft. Für das PT-Imaging wurden 10⁷ DiR/eGFP markierte MØ i.v. injiziert. Bei C57Bl6 bzw. u-PAR^{-/-} und WT-Mäusen erfolgte 4h nach der Injektion von markierten MØ die PT-Induktion durch Injektion von 500 µl Thioglycollat i.p.. Im Blut der Tiere wurden an Tag 1-3 die rezirkulierenden eGFP-positiven Indikatorzellen durchflusszytometrisch quantifiziert. Mittels FMT kann in narkotisierten Mäusen (i.p. Injektion von 18 µl 2% Avertine/g Körpergewicht) Gewebetiefe, Größe und Konzentration eines nah-infrarot Fluoreszenz-Signals dreidimensional tomographisch dargestellt werden. Unmittelbar vor der PT-Induktion

erfolgte eine FMT-Aufnahme des Abdomens, die nach 24 (d1), 48 (d2) und 72 Stunden (d3) wiederholt wurde, um die Umverteilung von DiR-MØ in das Peritoneum longitudinal, in vivo zu quantifizieren. Nach 72h wurde eine Peritoneal-Lavage durchgeführt und durchflusszytometrisch die Rekrutierung von Indikator-MØ quantifiziert. Die Daten wurden mittels M.-Whitney-U-Tests auf Signifikanz überprüft und als MW \pm SEM dargestellt.

Ergebnisse

Ein Unterschied im Migrationsverhalten wurde durch die DiR-Markierung nicht induziert (Kontr.-EC: 13.667 \pm 1785 vs. 10.733 \pm 4196; TNF- α aktivierte EC: 28.000 \pm 2357 vs. 29.333 \pm 4277; transmigrierte MØ; Kontr. vs. DiR; n=3). Scans einzelner Organe zeigten, dass die i.v. injizierten MØ zunächst vor allem in Lunge, Milz und Leber gepoolt werden. Nach 72h war eine Umverteilung der MØ aus der Lunge (-64,3 \pm 0,80, % delta-Fluoreszenz vs. d0, n=4, p<0,05) in das retikulo-endotheliale System (RES) detektierbar (Leber: +66,7 \pm 10,2; Milz: +40,1 \pm 8,83; Knochenmark: +78,3 \pm 6,53; % delta-Fluoreszenz vs. d0, n=4, p<0,05). Die DiR/eGFP-Doppel-Markierung der MØ konnte fluorezenzmikroskopisch bestätigt werden. An Tag 1-3 waren im peripheren Blut von PT-Mäuse rezirkulierende Indikatorzellen durchflusszytometrisch nachweisbar (d1: 1.056 \pm 301, d2: 887 \pm 69, d3: 1.391 \pm 420 eGFP pos. Zellen/ml Blut, n=3). Das abdominale DiR-FMT-Signal war in PT- jederzeit signifikant höher als in Kontroll-Mäusen (d1: 100 \pm 18 vs. 222 \pm 42; d2: 107 \pm 22 vs. 219 \pm 38; d3: 110 \pm 25 vs. 215 \pm 38, % delta-Fluoreszenz vs. d0, Kontr. vs. PT, n=9/10, p<0,05). PT-u-PAR^{-/-}-Mäuse wiesen signifikant weniger MØ auf als PT-WT-Mäuse. (d1: 86 \pm 20 vs. 210 \pm 41, d2: 88 \pm 21 vs. 258 \pm 45, d3: 97 \pm 34 vs. 235 \pm 40, % delta-Fluoreszenz vs. d0, u-PAR^{-/-} vs. WT, n=9/8, p<0,05). Die Rekrutierung der i.v.-injizierten Indikatorzellen ins Peritoneum konnte durchflusszytometrisch bestätigt werden (2,45 \times 10³ \pm 6,26 \times 10² vs. 1,08 \times 10⁴ \pm 2,05 \times 10³, eGFP pos. MØ in der Peritoneallavage, Kontr. vs. PT, n=7/9, p=0,002).

Interpretation

Die DiR-Markierung von Maus-MØ beeinträchtigt weder die Vitalität noch das In-vitro-Transmigrationsverhalten der Zellen. In vivo konnte im FMT die Rekrutierung rezirkulierender MØ aus der Lunge in RES und Peritoneum visualisiert und quantifiziert werden. Exemplarisch wurde der Leukozytenrekrutierungsdefekt der u-PAR^{-/-}-Maus dargestellt. Dieses Verfahren ermöglicht die tomographische Abbildung und Quantifizierung von sehr geringen Zellinfiltraten im lebenden Organismus und könnte bei Verfügbarkeit mobiler, brettseitig einzusetzender NIRF-Scanner für die Erforschung, Diagnose oder Therapieüberwachung inflammatorischer Krankheitsbilder von überaus großem Nutzen sein.

Literatur

1. Ntziachristos V, Tung CH, Bremer C, Weissleder R. Fluorescence molecular tomography resolves protease activity in vivo. Nat Med 2002;8:757-760.
2. May A, Kanse S, Lund L, Gisler R, Imhof B, Preissner KT. Urokinase receptor (CD87) regulates leukocyte recruitment via beta 2 integrins in vivo. J Exp Med 1998;188:1029-1037.

Korrespondenzadresse: jan.larmann@uni-muenster.de

Blockade spannungsabhängiger Na⁺-Kanäle als neuer Wirkmechanismus des partiellen Opioid-Rezeptor-Agonisten Buprenorphin

A. Leffler¹, K. Kistner², P. Reeh², W. Koppert¹ und C. Nau¹

¹ Anästhesiologische Klinik, Universitätsklinikum Erlangen

² Institut für Physiologie und Experimentelle Pathophysiologie, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

Fragestellung

Der partielle Opioid-Rezeptor (OR)-Agonist Buprenorphin wird mit guter Wirksamkeit bei der Therapie starker chronischer und akuter Schmerzen eingesetzt. Der partielle μ -Opioid-Rezeptor-Agonismus, die langsame Dissoziation vom μ -Opioid-Rezeptor und die Fähigkeit zur Blockade der Rezeptor-Internalisierung steuern zum guten Sicherheitsprofil und geringen Suchtpotential von Buprenorphin im Vergleich zu anderen starken Opioiden bei. In einem humanen Schmerzmodell zeigte Buprenorphin eine starke und lang anhaltende antihyperalgetische Wirkung, die anderen ▶

► μ -OR-Agonisten fehlt [1]. Wie bei anderen OR-Agonisten wird die starke analgetische Wirkung von Buprenorphin durch periphere und zentrale μ -OR vermittelt. Buprenorphin zeigt außerdem antagonistische Wirkung an zentralen κ -OR und agonistische Wirkung am ORL1 (opioid receptor like -1) [2]. Die molekularen Mechanismen der antihyperalgetischen Wirkung von Buprenorphin sind unklar. Da auch für das Lokalanästhetikum Lidocain eine ausgeprägte antihyperalgetische Wirkung nachgewiesen wurde [3], die vermutlich auf der Blockade spannungsabhängiger Na^+ -Kanäle beruht, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob auch Buprenorphin die Erregbarkeit nozizeptiver Afferenzen beeinflusst und die direkte Interaktion mit spannungsabhängigen Na^+ -Kanälen zeigt.

Methodik

Mit behördlicher Genehmigung wurden adulte Wildtyp-C57/BL6-Mäuse zur Gewebesenntnahme mit CO_2 getötet. Einzelne kutane C-Fasern wurden mit der in vitro Haut-Nerv-Präparation untersucht. Dazu wurde mit einem mechanischen Stimulus das rezeptive Feld einzelner C-Fasern von der behaarten Haut der Hinterpfote identifiziert. Dann wurde die elektrische Reizschwelle bestimmt und die C-Fasern mit doppelter Reizstärke und 0.1 Hz stimuliert. Na^+ -Ströme von kultivierten Spinalganglienzellen, von neuronalen ND7/23-Zellen oder HEK293t-Zellen, die mit cDNA verschiedener Na^+ -Kanal-Mutationen transfiziert wurden, wurden mit der Whole-Cell-Konfiguration der Patch-Clamp-Methode untersucht.

Ergebnisse

In Anwesenheit von 10 μM Naloxon führte Buprenorphin zu einer reversiblen Leitungsblockade aller untersuchten C-Fasern in Konzentrationen zwischen 100–400 μM ($n=6$). Eine Leitungsblockade durch Lidocain trat erst zwischen 500–1100 μM auf ($n=11$). Buprenorphin blockierte konzentrationsabhängig und reversibel Na^+ -Ströme in Spinalganglienzellen (Abb. 1A). Mit einem

IC_{50} -Wert von $22 \pm 1 \mu\text{M}$ ($n=8$) war Buprenorphin potenter als Lidocain ($231 \pm 38 \mu\text{M}$, $n=18$). Eine eingehendere Charakterisierung der Blockade spannungsabhängiger Na^+ -Kanäle in ND7/23-Zellen lieferte IC_{50} -Werte für den tonischen Block von $29 \pm 3 \mu\text{M}$ ($n=9$) und $5.3 \pm 0.5 \mu\text{M}$ ($n=4$) bei einem Haltepotential von -140 mV bzw. -80 mV . Buprenorphin zeigte auch eine ausgeprägte frequenzabhängige Blockade bei 10 Hz ($3 \mu\text{M}$: $44 \pm 5\%$; $n=5$; $30 \mu\text{M}$: $81 \pm 4\%$; $n=5$) (Abb. 1B) und eine starke Blockade offener, inaktivierungsdefizienter Na^+ -Kanäle ($\text{IC}_{50} = 1.7 \pm 0.1 \mu\text{M}$ ($n=7$)). Die frequenzabhängige Blockade der Lokalanästhetika-insensitiven Na^+ -Kanal-Mutationen $\text{Na}_v1.4\text{-}434\text{K}$, $\text{Na}_v1.4\text{-}1280\text{K}$ und $\text{Na}_v1.4\text{-}1579\text{K}$ durch 30 μM Buprenorphin bei 10 Hz war gegenüber dem $\text{Na}_v1.4$ Wild-Typ signifikant reduziert ($9.3 \pm 3.7\%$, $n=4$; $21 \pm 3\%$, $n=4$; $15 \pm 2\%$, $n=5$; $75 \pm 3\%$, $n=5$) ($p < 0.05$, ungep. t-Test).

Interpretation

Durch eine Interaktion mit der Lokalanästhetika-Bindungsstelle spannungsabhängiger Na^+ -Kanäle zeigt Buprenorphin ausgeprägte lokalanästhetische Wirkung. Dieser Effekt könnte der antihyperalgetischen Wirkkomponente von Buprenorphin in vivo zugrunde liegen.

Literatur

1. Koppert W, Ihmsen H, Körber N, Wehrfritz A, Sittl R, Schmelz M, et al. Different profiles of buprenorphine-induced analgesia and antihyperalgesia in a human pain model. *Pain* 2005;118:15-22.
2. Luty K, Eitan S, Bryant CD, Yang YC, Saliminejad N, Walwyn W, et al. Buprenorphine-induced antinociception is mediated by μ -opioid receptors and compromised by concomitant activation of opioid receptor-like receptors. *J Neurosci* 2003;23:10331-10337.
3. Koppert W, Ostermeier N, Sittl R, Weidner C, Schmelz M. Low-dose lidocaine reduces secondary hyperalgesia by a central mode of action. *Pain* 2000; 85:217-224.

Korrespondenzadresse: Andreas.Leffler@kfa.imed.uni-erlangen.de

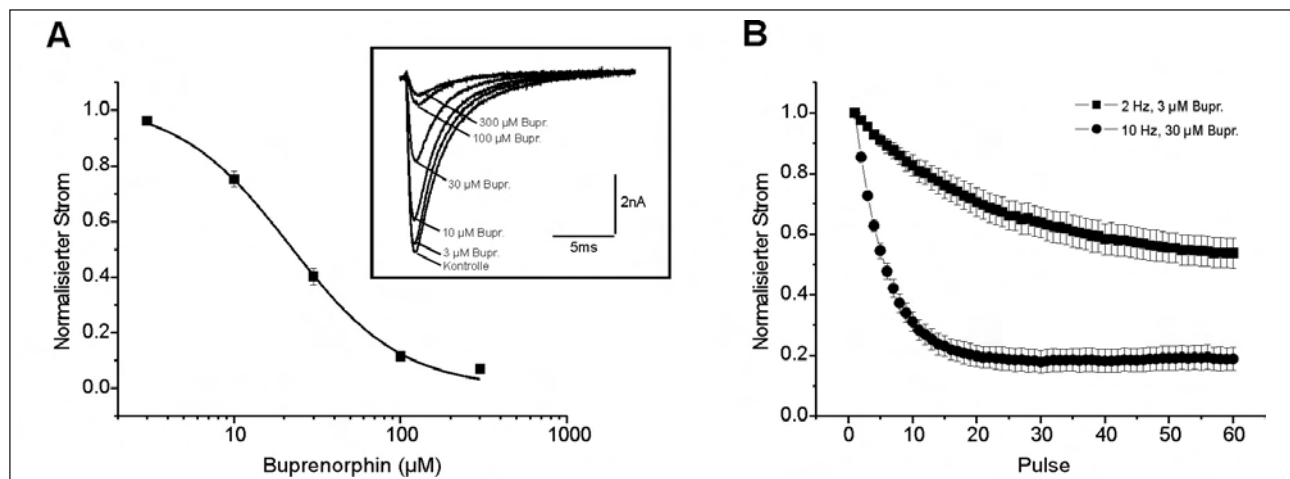


Abb. 1: Tonische und frequenzabhängige Blockade spannungsabhängiger Na^+ -Kanäle durch Buprenorphin. (A) Zur Bestimmung der tonischen Blockade wurden Na^+ -Ströme in Spinalganglienzellen durch 50 ms-lange Pulse nach 0 mV von einem Haltepotential V_h -80 mV mit 0.05 Hz aktiviert und Applikation verschiedener Konzentrationen (c) von Buprenorphin gemessen. Die halbmaximal-blockierende Konzentration (IC_{50} , $\text{MW} \pm \text{SEM}$) wurde durch nichtlineare Kurvenanpassung der Gleichung $b(c) = c^h / (\text{IC}_{50}^h + c^h)$ an die Datenpunkte errechnet (h: Hill-Koeffizient). Inset: Repräsentative Stromspuren von Na^+ -Strömen einer Spinalganglienzelle. (B) Zur Bestimmung der frequenzabhängigen Blockade von Na^+ -Kanälen in ND7/23-Zellen durch 3 und 30 μM Buprenorphin wurden Na^+ -Ströme durch 25 ms-lange Pulse nach +50 mV von einem Haltepotential $V_h = -140 \text{ mV}$ mit 10 Hz aktiviert. Stromamplituden wurden gemessen und normalisiert gegenüber der Stromamplitude des 1. Pulses.

Therapie mit Melatonin verbessert die Leberfunktion nach hämorrhagischem Schock bei der Ratte

A. Mathes, D. Kubulus, J. Weiler, A. Bentley, I. Bauer und H. Rensing

Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie, Universitätsklinikum des Saarlandes, Universität des Saarlandes, Homburg (Saar)

Fragestellung

Die exogene Zufuhr des pinealen Hormons Melatonin resultiert in ausgeprägten antioxidativen Wirkungen [1] und kann bei oxidativem Stress, wie zum Beispiel bei der Sepsis oder nach Ischämie/Reperfusion [2], zu einer Verminderung von Zell- und Organschäden führen. Melatonin wirkt dabei nicht nur über eine direkte Inaktivierung von Sauerstoff- und Stickstoffradikalen, sondern auch indirekt über eine Erhöhung der Stickstoffmonoxid-Bioverfügbarkeit und die Induktion von antioxidativen Enzymen, wie der Glutathion-Peroxidase. Aktuelle Hypothesen lassen allerdings vermuten, dass Melatoninrezeptor-vermittelte Wirkungen ebenfalls zum antioxidativen Potenzial des Hormons beitragen könnten [3]. Obwohl die Leber Melatoninrezeptoren exprimiert, wurde jedoch bisher noch nicht untersucht, ob die protektiven Eigenschaften von Melatonin von einer Rezeptoraktivierung abhängig sind. Weiterhin ist unbekannt, ob exogenes Melatonin nach hämorrhagischem Schock zu einer spezifischen Organprotektion beitragen kann. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die funktionelle Bedeutung von Melatonin für die Leberfunktion nach hämorrhagischem Schock zu charakterisieren.

Methodik

Alle Untersuchungen wurden nach Genehmigung durch die Tierschutzbehörde an narkotisierten (Pentobarbital, 50 mg/kg i.p.), männlichen Sprague-Dawley-Ratten durchgeführt. Bei allen Tieren wurde ein druckkontrollierter hämorrhagischer Schock (MAP 35 ± 5 mmHg) für 90 Minuten induziert. Die Tiere erhielten am Ende des Schocks entweder Melatonin (10 mg/kg i.v.), den Melatonin-Rezeptorantagonisten Luzindole (2,5 mg/kg i.v.) plus Melatonin (10 mg/kg i.v.) oder Vehikel. Alle Tiere erhielten zur Retransfusion 60% des entnommenen Blutes zurück, es wurde nachfolgend eine zweistündige Reperusionsphase durchgeführt (Volumentherapie: 1. Stunde 200%, 2. Stunde 100% des entnommenen Blutvolumens als Ringer-Laktat-Infusion). In drei weiteren Versuchsgruppen wurde kein hämorrhagischer Schock durchgeführt (Scheinoperation); eine dieser Gruppen erhielt Melatonin, die andere Luzindole als Kontrolle. Nach Retransfusion wurde in allen Gruppen die Plasmaverschwinderate von Indozyanin (PDR_{ICG}) zur Beurteilung der exkretorischen Leberfunktion gemessen oder der linke Leberlappen mittels Intravitalmikroskopie bezüglich der Parameter NAD(P)H-Autofluoreszenz (als indirektes Maß des Redoxstatus) und Propidium-Jodid(PI)-Färbung (zur Bestimmung

des zellulären Schadens) evaluiert. Zum Versuchsende wurden bei allen Tieren die Serumparameter GLDH, AST und ALT bestimmt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ANOVA und Student-Newman-Keuls-Tests. Die angegebenen Daten entsprechen dem Mittelwert \pm Standardabweichung ($n = 10$ pro Gruppe).

Ergebnisse

Die Induktion eines 90-minütigen hämorrhagischen Schocks führte zu einer signifikanten Verminderung der PDR_{ICG} im Vergleich zu scheinoperierten Tieren ($9,96 \text{ %/min} \pm 2,44$ vs. $15,84 \text{ %/min} \pm 2,27$; $p = 0,008$), zu einer signifikanten Erhöhung der NAD(P)H-Autofluoreszenz ($136,32 \text{ aU} \pm 9,79$ vs. $99,86 \text{ aU} \pm 4,66$; $p < 0,001$) sowie zu einem signifikanten Anstieg an PI-gefärbten Zellen pro Gesichtsfeld ($41,45 \pm 16,37$ vs. $2,6 \pm 1,6$; $p < 0,001$). Die Therapie mit Melatonin führte zu einer erheblichen Verbesserung der PDR_{ICG} im Vergleich zu unbehandelten Tieren ($16,14 \text{ %/min} \pm 2,59$; $p = 0,003$ vs. Vehikel) sowie zu einer signifikanten Reduktion der NAD(P)H-Autofluoreszenz ($114,75 \text{ aU} \pm 14,66$; $p = 0,014$ vs. Vehikel) und der PI-gefärbten Zellen ($8,15 \pm 3,45$; $p < 0,001$ vs. Vehikel). Die Gabe des Rezeptorantagonisten Luzindole hob den protektiven Effekt mit Bezug auf die Leberfunktion vollständig wieder auf ($9,41 \text{ %/min} \pm 1,43$; $p = 0,001$ vs. Melatonin), nicht aber in Bezug auf NAD(P)H-Autofluoreszenz ($121,83 \text{ aU} \pm 7,73$; $p = 0,046$ vs. Vehikel) und PI-gefärbte Zellen ($5,44 \pm 1,24$; $p < 0,001$ vs. Vehikel). Die Serumanalyse zeigte bei Vehikeltieren einen signifikanten Anstieg von GLDH, AST und ALT im Vergleich zu scheinoperierten Tieren (GLDH: $41,58 \text{ U/l} \pm 32,99$ vs. $8,77 \text{ U/l} \pm 4,96$; $p = 0,004$; AST: $404,16 \text{ U/l} \pm 237,72$ vs. $155,50 \text{ U/l} \pm 95,66$; $p = 0,023$; ALT: $135,00 \text{ U/l} \pm 83,36$ vs. $51,11 \text{ U/l} \pm 17,28$; $p = 0,02$), allerdings führte die Gabe von Melatonin mit oder ohne Antagonist lediglich zu einem nicht signifikanten Trend in Richtung verbesserter Serumparameter. Die Gabe von Melatonin oder Luzindole ohne Induktion eines hämorrhagischen Schocks veränderte keinen der gemessenen Parameter im Vergleich zu scheinoperierten Tieren.

Interpretation

Die Therapie mit Melatonin nach hämorrhagischem Schock beinhaltet spezifische leberprotektive Effekte. Melatonin führt hier zu einer signifikanten Verbesserung des hepatischen Redoxstatus, einer Reduktion des hepatozellulären Schadens und einer rezeptorabhängigen Verbesserung der Leberfunktion.

Literatur

1. Hardeland R. Antioxidative protection by melatonin: multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance. *Endocrine* 2005;27:119-130.
2. Cuzzocrea S, Constantino G, Mazzon E, Micali A, De SA, Caputi AP. Beneficial effects of melatonin in a rat model of splanchnic artery occlusion and reperfusion. *J Pineal Res* 2000;28:52-63.
3. Tomas-Zapico C, Coto-Montes A. A proposed mechanism to explain the stimulatory effect of melatonin on antioxidant enzymes. *J Pineal Res* 2005;39:99-104.

Korrespondenzadresse: alexander.mathes@gmx.net

Kombination von arteriovenöser extrakorporaler Lungenassistenz und Hochfrequenzoszillation: Effekte auf den Gasaustausch und die beatmungsassoziierte Lungenschädigung im Großtier-24-Stunden-ARDS-Modell

R. Muellenbach¹, M. Kredel¹, J. Wilhelm², J. Küstermann¹, L. Fink², B. Klosterhalfen³, N. Roewer¹, C. Wunder¹ und J. Brederlau¹

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

² Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen

³ Institut für Pathologie, Städtisches Krankenhaus Düren

Fragestellung

Durch Einführung lungenprotektiver Beatmungsstrategien mit reduziertem Tidalvolumen (V_T) konnte die Mortalität des akuten Lungenversagens (ARDS) weiter gesenkt werden [1]. Die pumpenlose arteriovenöse extrakorporale Lungenassistenz (pECLA) erlaubt durch nahezu vollständige Kohlendioxid-Elimination eine Entkopplung von Ventilation und Oxygenierung. Somit ist eine weitere V_T -Reduktion, z.B. durch den Einsatz der Hochfrequenzoszillation (HFOV), möglich [2]. Wir testeten die Hypothese, dass durch die Kombination HFOV/pECLA verglichen mit konventioneller lungenprotektiver Beatmung (PCV) eine Reduktion der pulmonalen Entzündungsreaktion im Großtier-24-Std.-ARDS-Modell erreicht werden kann.

Methodik

Nach behördlicher Genehmigung wurde bei 16 Pietrain-Schweinen (Gewicht: $54,3 \pm 4,2$ kg) durch wiederholte pulmonale Kochsalzlavage (30 ml/kg KG) ein ARDS induziert (Ziel- $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 60$ mmHg). Nach einstündiger Stabilisierungsphase wurde der untere Inflektionspunkt (UIP) der pulmonalen Druckvolumenbeziehung ermittelt. Anschließend erfolgte die Randomisierung der Tiere in zwei Gruppen: Gruppe 1: PCV ($V_T = 6$ ml/kg KG, $f = 30$ -40/min); Gruppe 2: HFOV/pECLA ($f = 720$ - 900/min, Amplitude = 60 cmH₂O). In der Gruppe 2 wurden die A. und V. femoralis kanüliert und eine Membranlunge mit niedrigem Flusswiderstand (iLA, Novalung, Hechingen) interponiert. Nach Rekrutierung (Continuous-positive-airway-pressure mit 50 cmH₂O über 60 Sekunden) wurde der PEEP in der Gruppe 1 bzw. der Atemwegsmitteldruck (P_{mean}) in der HFOV/pECLA-Gruppe 3 cmH₂O über den UIP gesetzt. In beiden Gruppen wurde während des 24-stündigen Versuchszeitraums ein $\text{PaO}_2 > 90$ mmHg und ein $\text{PaCO}_2 < 50$ mmHg angestrebt. Die relative mRNA-Expression der Zytokine TNF- α , IL-1- β , IL-6, IL-8 und IL-10 im linken Lungenober- (OL) sowie Unterlappen (UL) wurden nach 24 Std. mit Real-Time-PCR gemessen. Der Gehalt der exprimierten Zielparameter wurde mit der delta- C_T -Methode ($\Delta C_T = \text{Referenzgen (HPRT)} - \text{Zielgen}$) ermittelt. Schnitte aus Ober-, Mittel- und Unterlappen der rechten Lunge wurden lichtmikroskopisch anhand eines semiquantitativen Punktesystems beurteilt [3]. Statistik: Two-way ANOVA mit Student-Newman-Keul's-Test, t-Test und paired t-Test für parametrische ($\text{MW} \pm \text{SD}$ und $\text{MW} \pm \text{SEM}$) und Mann-Whitney-U- und Wilcoxon-Rangsummen-Test für nicht-parametrische (Median (25%-75%-Perzentile)) Daten; ($p < 0,05$).

Ergebnisse

In beiden Gruppen kam es während des 24-stündigen Versuchszeitraums zu einer signifikanten Verbesserung des $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ -Quotienten (Gruppe 1: 519 ± 49 ; Gruppe 2: 461 ± 106 mmHg), des Oxygenierungsindex (Gruppe 1: $5,9 \pm 1,2$; Gruppe 2: $5 \pm 1,6$), der gemischt-venösen Sättigung (Gruppe 1: 70 ± 11 ; Gruppe 2: $79 \pm 9\%$) und des Ventilations/Perfusions-Verhältnisses (Gruppe 1: 8 ± 4 , Gruppe 2: $15 \pm 9\%$). In der Gruppe 2 war gegenüber Gruppe 1 der PaCO_2 sofort nach dem Start der pECLA signifikant erniedrigt (31 ± 4 vs. 44 ± 4 mmHg) und das Herzzeitvolumen signifikant erhöht ($5,2 \pm 1,1$ vs. $3,7 \pm 0,7$ l/min). Der P_{mean} und der Beatmungsspitzen- und -enddruck waren in Gruppe 2 signifikant vermindert (P_{mean} $21,4 \pm 2$ vs. $30,1 \pm 4,4$ cmH₂O; PIP: $24,4 \pm 2$ vs. $38,4 \pm 5,5$ cmH₂O). Nach 24 Std. war der UIP in beiden Gruppen signifikant höher als nach der Lungenschädigung (Gruppe 1: $25,3 \pm 5$ vs. $21,6 \pm 3,7$ cmH₂O; Gruppe 2: $21,6 \pm 2,3$ vs. $18,4 \pm 2$ cmH₂O), jedoch in Gruppe 2 signifikant niedriger als in Gruppe 1. Hämodynamisch waren alle Tiere unter vergleichbarer kontinuierlicher Volumen- und Noradrenalininfusion stabil. Histopathologisch zeigte sich eine signifikante Erniedrigung der interstitiellen Entzündungsreaktion in den basalen Anteilen der Gruppe 2 ($1,3(1-1,5)$ vs. $1,8(1,4-2)$). In beiden Gruppen konnte eine moderate alveoläre Überblähung in den apikalen Lungenabschnitten nachgewiesen werden (Gruppe 1: $1,8(1,6-2,1)$; Gruppe 2: $2,2(1,5-2,4)$). In den basal gelegenen Schnitten der Gruppe 1 war die Entzündungsreaktion (basal: $1,8(1,4-2)$ vs. apikal: $1,1(0,8-1,3)$) sowie die Epitheldesquamation (basal: $2(1,9-2,1)$ vs. apikal: $0,8(0,6-1,7)$) signifikant erhöht. Abgesehen von der relativen mRNA-Expression von TNF- α im OL (ΔC_T : Gruppe 2: $-2,32 \pm 0,2$ vs. Gruppe 1: $-2,91 \pm 0,13$), ließen sich keine signifikanten Unterschiede der Zytokinexpression zwischen beiden Gruppen nachweisen. Die Expression von IL-8 im UL der Gruppe 2 (ΔC_T : $1,65 \pm 0,47$ vs. OL: $0,29 \pm 0,49$) sowie die Expression von IL-10 im UL in beiden Gruppen (ΔC_T : Gruppe 1: $-2,26 \pm 0,25$ vs. OL: $-3,9 \pm 0,41$; Gruppe 2: $-2,3 \pm 0,36$ vs. OL: $-3,44 \pm 0,33$) waren im Vergleich zum OL signifikant erhöht.

Interpretation

Bei hocheffektiver CO_2 -Elimination ermöglicht HFOV/pECLA eine weitere V_T -Minimierung ohne negative Einflüsse auf die Oxygenierung. Histopathologisch konnte unter HFOV/pECLA eine Erniedrigung der interstitiellen Entzündungsreaktion in den basalen Lungenanteilen festgestellt werden. Die Expression inflammatorischer Zytokine in der Lunge nach 24 Std. war jedoch nicht reduziert. Durch HFOV/pECLA scheint im Großtier-ARDS-Modell eine weitere Reduktion der beatmungsassoziierten Lungenschädigung möglich zu sein.

Literatur

1. The ARDS-Network: Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for ALI and ARDS. NEJM 2000;342:1301-1308.
2. Brederlau J, Muellenbach R, Kredel M, Kuestermann J, Anetseder M, Greim C, et al. Combination of arteriovenous extracorporeal lung assist and high-frequency oscillatory ventilation in a porcine model of lavage-induced acute lung injury: a randomized controlled trial. J Trauma 2007;62(2):336-346.
3. Merz U, Kellinghaus M, Hausler M, Pakrawan N, Klosterhalfen B, Hornchen H. Partial liquid ventilation with surfactant: effects on gas exchange and lung pathology in surfactant-depleted piglets. Int Care Med 2000;26:9-16.

Korrespondenzadresse: muellenbac_r@klinik.uni-wuerzburg.de

Serumkonzentrationen Apoptose-relevanter Proteine bei Patienten mit SIRS und Sepsis

M. Paxian, F.M. Brunkhorst, G. Paxian, R.A. Claus, A. Kortgen, K. Reinhart und M. Bauer

Klinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie, Universitätsklinikum Jena, Friedrich-Schiller-Universität Jena

Fragestellung

Apoptotischer Zelltod in zirkulierenden Leukozyten trägt zur Dysregulation der Immunantwort nach Schock und Sepsis bei [1]. Die Bedeutung der Apoptose für das Versagen solider Organe wird jedoch kontrovers diskutiert [2,3]. Daher sollten zur systematischen Untersuchung der Aktivierung der Apoptosekaskade die Serumkonzentrationen verschiedener Apoptose-regulierender Proteine (Tumornekrosefaktor (TNF)/TNF-Rezeptor (TNF/TNFR)-Familie für den extrinsischen Weg bzw. Cytochrom-c für den intrinsischen, mitochondrialen Weg) bei Patienten mit SIRS oder Sepsis bestimmt und jeweils mit dem Schweregrad der Erkrankung korreliert werden. Weiterhin wurde die Konzentration des Cytokeratin-18-Neopeptids (CK-18), welches in apoptotischen Epithelzellen über aktivierte Caspasen zu einer Degradation zytoskelettaler Cytokeratin-18(CK18)-Filamente mit der Freisetzung von spezifischen Proteinfragmenten führt, bestimmt.

Methodik

Nach Genehmigung durch die zuständige Ethikkommission und Einverständnis der Angehörigen wurden Apoptose-spezifische Proteine im Serum von Patienten mit Sepsis (n=38) und postoperativem SIRS nach elektivem kardiochirurgischem Eingriff (n=49) sowie gesunden Kontrollen (n=8) mittels ELISA quantifiziert. Die Probenentnahme erfolgte unmittelbar nach Diagnosestellung sowie jeweils am Morgen der Folgetage. Statistische Auswertung erfolgte mittels ANOVA mit kommerzieller Software (SigmaStat).

Ergebnisse

Die Serumkonzentrationen löslicher Marker der TNF/TNFR-Familie waren bei septischer Genese höher verglichen mit nicht-infektiöser systemischer Entzündung. Hierbei überschritten nur die Serumkonzentrationen von sFas die Werte von Gesunden, wohingegen die Serumkonzentrationen von sFasL und TRAIL deutlich darunter lagen. Eine Zunahme des Caspasespaltproduktes CK-18-Neopeptid im Serum war lediglich bei schwerstem Multiorganversagen zu beobachten. Eine exemplarische Korrelation der Apoptosekaskade mit dem Ausmaß der Leberdysfunktion zeigte ebenfalls eine erhöhte Generierung von CK-18-Neopeptid nur bei schwerem Leberversagen, dann allerdings in hohen Konzentrationen. Dabei wurde die Bildung des Caspasespaltproduktes CK-18-Neopeptid von einer deutlichen Freisetzung von Cytochrom-c begleitet. Dem gegenüber waren die sFasL-Serumkonzentrationen nahezu unverändert. Bei 3 Patienten mit fulminantem Leberversagen wurde zu differentialdiagnostischen Zwecken eine Leberbiopsie durchgeführt. Die immunhistochemische Untersuchung dieser Leberbiopsien zeigte eine erhöhte Aktivität an aktivierter Caspase 3 und CK-18-Neopeptid.

Interpretation

Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind vereinbar mit einem Apoptose-bedingten hepatozellulären Schaden, welcher über die intrinsische/mitochondriale Wegstrecke initiiert wird, und deuten auf eine mögliche Protektion von Organen gegenüber dem apoptotischen Zelltod bei geringer und moderater Organdysfunktion hin, wohingegen der programmierte Zelltod einen wesentlichen Beitrag zum schweren Organversagen (z.B. der Leber) zu leisten scheint. Zusammenfassend eignet sich die Bestimmung der Serumkonzentration Apoptose-spezifischer Proteine zur indirek-

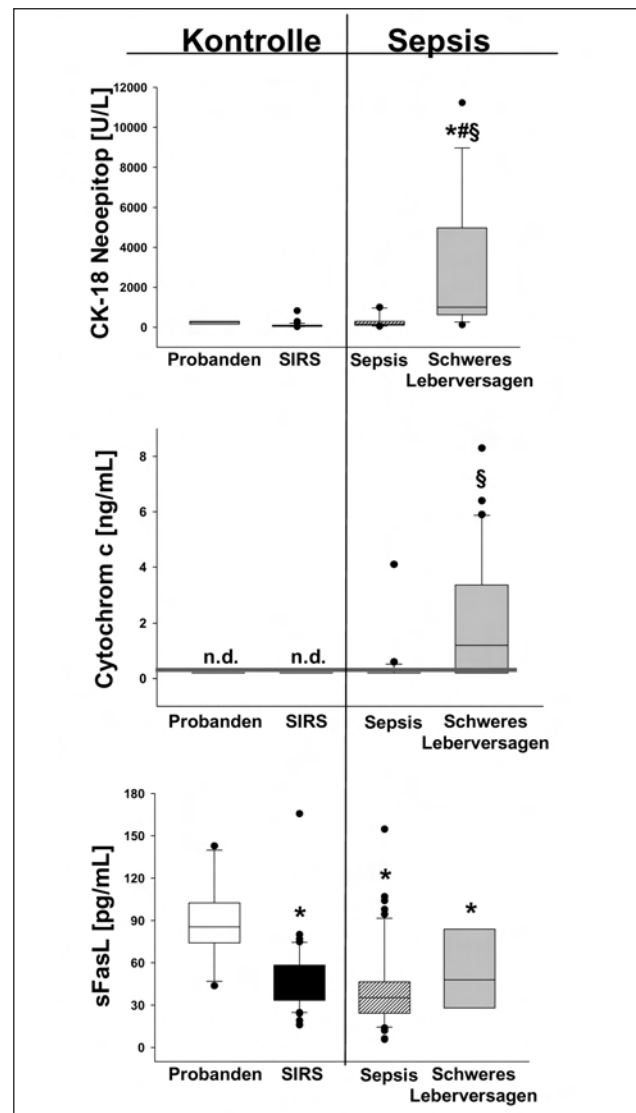


Abb. 1: Bedeutung der ephithelialen Apoptose (gemessen anhand der Generierung von CK-18-Neopeptid) und ihrer Regulation über den extrinsischen (sFasL) oder intrinsischen (Cytochrom c) Weg bei Sepsis und schwerem Leberversagen.

*P<0,05 vs. Probanden; #P< 0,05 vs. SIRS; §Py0,05 vs. Sepsis.

ten Quantifizierung der Apoptoseaktivität bei Patienten mit SIRS und Sepsis und könnte hilfreich zur Verlaufsbeurteilung der Krankheitsaktivität sein sowie neue Einblicke in die Bedeutung der Apoptose bei der Pathogenese und dem Therapieverlauf ermöglichen.

Literatur

1. Marsik C, et al. Regulation of Fas (APO-1, CD95) and Fas ligand expression in leukocytes during systemic inflammation in humans. Shock 2003;20:493-496.
2. Oberholzer C, et al. Apoptosis in sepsis: a new target for therapeutic exploration. FASEB J 2001;15:879-892.
3. De Freitas I, et al. Serum levels of the apoptosis-associated molecules, tumor necrosis factor-alpha/tumor necrosis factor type-I receptor and Fas/FasL in sepsis. Chest 2004;125:2238-2246.

Korrespondenzadresse: MARKUS.Paxian@med.uni-jena.de

Wirkung von Bupivacain auf kultivierte murine Hippokampusneurone

M.A. Punke¹, A. Solth¹, R. Scholz² und P. Friederich¹

¹ Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

² Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg, Universität Hamburg

Fragestellung

Krampfanfälle sind schwerwiegende neurotoxische Nebenwirkungen des Lokalanästhetikums Bupivacain [1]. Insbesondere der Hippokampus scheint eine Hirnregion zu sein, der in der Entstehung und Aufrechterhaltung von Krampfanfällen eine besondere Bedeutung zukommt [2]. Ziel der Studie war es deshalb, die Wirkung von Bupivacain auf spontane Aktionspotentiale und postsynaptische Ströme in einem neuronalen Netzwerk kultivierter Hippokampusneurone zu untersuchen und mit den Wirkungen spezifischer neuroexzitatorischer Substanzen zu vergleichen.

Methodik

Für die Zellkultur wurden die Hippokampi von neonatalen Mäusen abgetrennt, zerkleinert, in Zellkulturmedium gelöst und auf Coverslips ausplattiert (Die Organentnahme wurde behördlich angezeigt und erfolgte gemäß dem Tierschutzgesetz). Die Experimente wurden zwischen dem 10. und 16. Tag durchgeführt. Untersucht wurde die spontane elektrische Aktivität mittels der Patch-Clamp-Technik im Current- und Voltage-Clamp-Modus. Angegeben wurde der Median [1./3. Quartile]; n steht für die Anzahl der Experimente, statistische Vergleiche erfolgten mit Wilcoxon-Mann-Whitney-Test.

Ergebnisse

Die Applikation von Bicucullin (10 μ M), einem Antagonisten von GABA_A-Rezeptoren, und Linopirdin (10 μ M), einem Antagonisten von KCNQ2/Q3-Kanälen, führte im Vergleich zu Kontrollbedingungen zu einer Zunahme der Aktionspotentiale (APs) und der exzitatorischen postsynaptischen Ströme (EPSCs). Bicucullin

steigerte die APs von 3 [0/6] unter Kontrolle auf 74 [54/120] und die EPSCs von 187 [175/427] auf 374 [235/1432]. Diese Effekte waren reversibel im Auswasch (n=6; p<0.05). Außerdem führte Bicucullin zu einer signifikanten Inhibition der inhibitorischen postsynaptischen Ströme (IPSCs) von 41[3/53] auf 0 [0/3] (n=6; p<0.05). Linopirdin steigerte die APs von 3 [1/3] auf 20 [5/74] und die EPSCs von 170 [57/958] auf 1106 [419/1869] (n=10; p<0.05). Die IPSCs wurden durch Linopirdin von 116 [53/400] auf 222 [129/355] gesteigert (n=10; p>0.05). Die Linopirdineffekte waren nicht reversibel im Auswasch. Bupivacain (10 μ M) unterdrückte die APs von 44 [8/784] auf 1 [0/4] (n=9; p<0.05), die EPSCs von 56 [10/1101] auf 2 [0/186] (n=12; p<0.05) und die IPSCs von 15 [3/755] auf 1 [0/10], (n=11; p<0.05). Die Bupivacaineffekte waren konzentrationsabhängig, reversibel und bereits bei 1 μ M nachweisbar. Ähnlich wie Bupivacain führte Tetrodotoxin (5 nM) zu einer vollständigen Unterdrückung der APs, EPSCs und IPSCs.

Interpretation

Die Wirkung von Bupivacain auf die Netzwerkaktivität von hippocampalen Neuronen unterscheidet sich deutlich von der Wirkung der spezifischen neuroexzitatorischen Substanzen Bicucullin und Linopirdin. Durch Applikation von Bupivacain kommt es zu einer Abnahme der spontanen elektrischen Aktivität. Es gibt keine Hinweise darauf, dass Bupivacain über eine Interaktion mit GABA_A-Rezeptoren oder mit KCNQ2/Q3-Kanälen neuronale Exzitation hervorruft. Die Ähnlichkeit der Wirkung von Bupivacain und des Natriumkanalblockers Tetrodotoxin auf Hippokampusneurone könnte darauf hinweisen, dass Bupivacain keine neuroexzitatorische molekulare Wirkung besitzt.

Literatur

1. Baaijens PF, Gielen MJ, Vree TB, Crul BJ, Jessen HJ. Bupivacaine toxicity secondary to continuous cervical epidural infusion. Case report. Reg Anesth 1995;20:163-168.
2. Peters HC, Hu H, Pongs O, Storm JF, Isbrandt D. Conditional transgenic suppression of M channels in mouse brain reveals functions in neuronal excitability, resonance and behavior. Nat Neurosci 2005;8:51-60.

Korrespondenzadresse: punke@uke.uni-hamburg.de

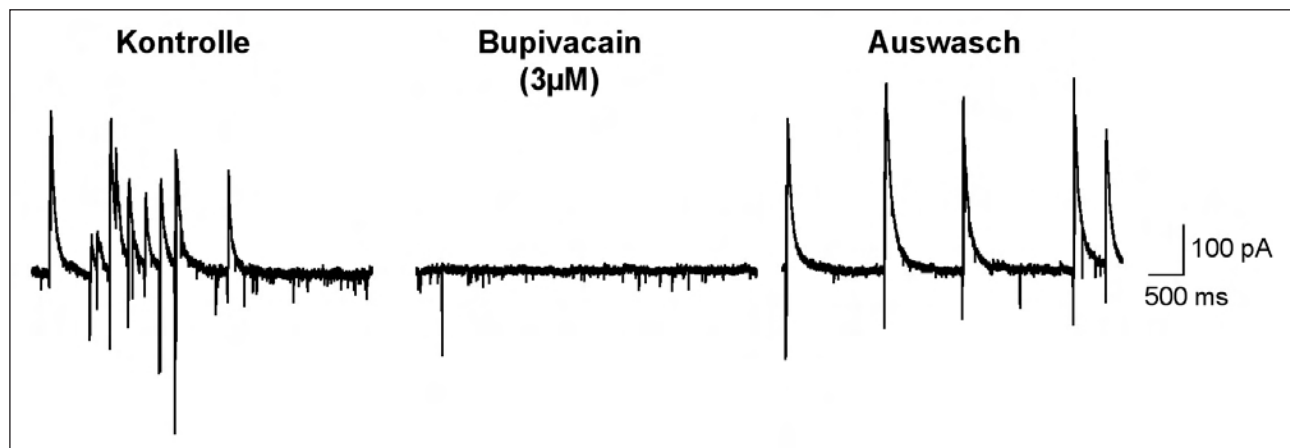


Abb. 1: EPSCs und IPSCs hippokampaler Neurone unter Kontroll- und Auswaschbedingungen sowie unter dem Einfluss von Bupivacain (3 μ M).

Die Aktivierung des Ca^{++} -aktivierten K^{+} -Kanals mit großer Leitfähigkeit (BK_{Ca}) ist notwendig für die Vermittlung der Anästhetika-induzierten Präkonditionierung

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

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

Fragestellung

Sarkomale und mitochondriale ATP-regulierte K^{+} -Kanäle sind an der Isofluran- [1] und Desfluran- [2] induzierten Präkonditionierung beteiligt. Die Beteiligung anderer K^{+} -Kanäle an der Anästhetika-induzierten Präkonditionierung (APC) ist noch ungeklärt. Wir prüften die Hypothese, dass die APC durch Aktivierung des Ca^{++} -aktivierten K^{+} -Kanals mit großer Leitfähigkeit (BK_{Ca}) vermittelt wird.

Methodik

Die Tierversuchsgenehmigung der zuständigen Landesbehörde lag vor. Männliche C57BL/6-Mäuse ($n=49$, 8-12 Wochen) wurden randomisiert sieben Gruppen zugeteilt. Alle Tiere erhielten Pentobarbital zur Narkoseeinleitung (60 mg/kg i.p.), wurden endotracheal intubiert, mechanisch ventiliert und zur Messung von Herzfrequenz und mittlerem arteriellem Blutdruck instrumentiert. Nach linksseitiger Thorakotomie im 4. ICR 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. 30 min vor CAO erhielt die Gruppe APC für 15 min 1,0 MAC (7,5 Vol.-% [3]) Desfluran. Die Gruppen DMSO, NS1619 und IbTX erhielten jeweils 35 min vor CAO den Vehikel Dimethylsulfoxid (DMSO, 10 ml/kg i.p.), den BK_{Ca} -Agonisten NS1619 (1 mg/kg i.p.) bzw. den BK_{Ca} -Antagonisten Iberitoxin (IbTX; 0,05 mg/kg i.p.). Die Gruppen APC+NS1619 bzw. APC+IbTX erhielten 35 min vor CAO 1 mg/kg NS1619 i.p. bzw. 0,05 mg/kg IbTX i.p. und 30 min vor CAO für 15 min 1,0 MAC Desfluran. Die Kontrollgruppe erhielt vor CAO keine weitere Behandlung. Die Bestimmung der Herzinfarktgröße (IS=IA/AAR) erfolgte gravito-planimetrisch nach Färbung mit Evans Blue und Triphenyltetrazoliumchlorid. Die statistische Analyse erfolgte mittels ANOVA und post hoc Duncan-Test. Angegeben sind Mittelwert \pm SEM, * $p<0,05$.

Ergebnisse

Die hämodynamischen Parameter während Baseline sowie das Ischämieareal (AAR) waren zwischen den Gruppen nicht unter-

schiedlich. Die Infarktgröße betrug in der Kontrollgruppe $51 \pm 6\%$ ($n=7$). Desfluran verringerte die Infarktgröße auf $7 \pm 1\%^*$ ($n=7$). Die Applikation des BK_{Ca} -Agonisten NS1619 verringerte die Infarktgröße auf $8 \pm 2\%^*$ ($n=7$). Die Kombination von NS1619 und Desfluran führte zu keiner weiteren Verringerung der Infarktgröße ($5 \pm 1\%^*$; $n=7$). Die Applikation des Vehikels DMSO ($40 \pm 5\%$, $n=7$) und des BK_{Ca} -Antagonisten Iberitoxin ($46 \pm 6\%$, $n=7$) hatte keinen Einfluss auf die Infarktgröße. Die Desfluran-induzierte Präkonditionierung wurde durch Iberitoxin aufgehoben ($49 \pm 8\%^*$, $n=7$) (Abb. 1).

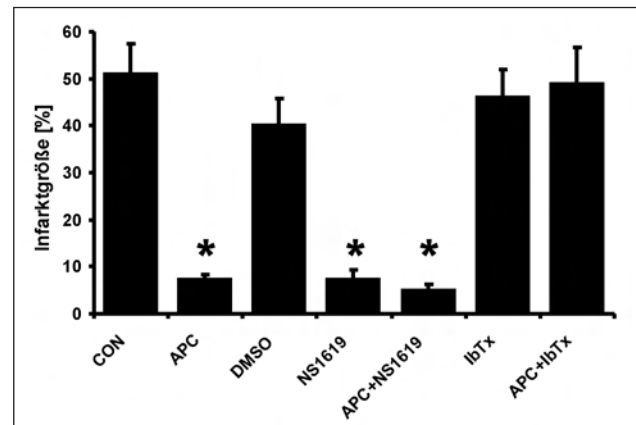


Abb. 1: Infarktgröße (IS=IA/AAR) in Prozent. Angegeben ist Mittelwert \pm SEM.

* signifikant ($p<0,05$) verschieden von CON.

Interpretation

Die Desfluran-induzierte Präkonditionierung sowie die Aktivierung des BK_{Ca} durch NS1619 führten zu einer deutlichen Verringerung der Infarktgröße. Die gleichzeitige Applikation von Desfluran und NS1619 erzeugte keine weitere Reduktion der Infarktgröße. Die Blockade des BK_{Ca} durch Iberitoxin führte zu einer Aufhebung der Desfluran-induzierten Präkonditionierung. Daraus kann geschlossen werden, dass die Aktivierung des BK_{Ca} zur Vermittlung der Desfluran-induzierten Präkonditionierung notwendig ist.

Literatur

1. Kersten JR, et al. Anesthesiology 1997;87:361-370.
2. Toller WG, et al. Anesthesiology 2000;92:1731-1739.
3. Sonner JM, et al. Anesth Analg 2000;91:720-726.

Korrespondenzadresse: Franz.Kehl@mail.uni-wuerzburg.de

Thiopental schützt humane T-Zellen in vitro vor Apoptose durch die Expression von Hitzeschockprotein 70

M. Roesslein, D. Schibilsky, K.K. Geiger, H.L. Pahl, B.H.J. Pannen und T. Loop

Anaesthesiologische Universitätsklinik, Universitätsklinikum Freiburg, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg

Fragestellung

Die Hitzeschockantwort (HSA), die durch die Expression von verschiedenen Hitzeschockproteinen (HSP) charakterisiert ist, besitzt zyto- und organprotektive Eigenschaften [1]. Neben den hypnotischen Wirkungen werden für Barbiturate sowohl immunsuppressi-

ve als auch zytoprotektive Effekte beschrieben [2]. Frühere eigene Untersuchungen konnten zeigen, dass Thiobarbiturate in humanen T-Lymphozyten zu einer differentiellen HSA führen und gleichzeitig das Ausmaß eines induzierten programmierten Zelltodes (Apoptose) in diesen Zellen vermindern [3]. Ob und wodurch diese Barbiturat-induzierte HSA die proapoptotischen Effekte reduziert, ist jedoch bisher nicht bekannt. Es war die Hypothese dieser Untersuchung, dass die Expression von HSP-70, das antiapoptotische Eigenschaften besitzt, für die zytoprotektiven Eigenschaften von Thiopental kausal verantwortlich ist.

Methodik

Jurkat-T-Zellen wurden entweder mit spezifischer „small interfering“ (si)RNA oder unspezifischer „non-silencing“ siRNA mittels Elektroporation transfiziert. Die spezifische siRNA war gegen ▶

► HSPA1A gerichtet, eines der für HSP-70 codierenden Hauptgene. Die „non-silencing“ siRNA besaß keine Homologie zu allen bekannten Säugetier-Genen. Nach Vorbehandlung der Zellen mit Thiopental [100 µg/ml, 4 h] wurde Apoptose mit Staurosporin [2 µM, 4 h] induziert und mittels Durchflusszytometrie über den Anteil Annexin V-FITC (Annexin)-markierter Zellen quantifiziert. Zur Unterscheidung von Nekrose wurden die Zellen zusätzlich mit 7-AAD markiert und der Anteil 7-AAD-positiver Zellen ebenfalls mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (ANOVA mit Holm-Sidak-Test, Signifikanzniveau $p < 0,05$).

Ergebnisse

Die Inkubation der Zellen mit Staurosporin führte zu einer signifikanten Zunahme des Anteils Annexin-positiver Zellen (Mittelwert \pm Standardfehler aus 5 unabhängigen Versuchen: $62,4 \pm 4,1$ % vs. $23,6 \pm 1,7$ %, Abb. 1, Balken Nr. 2 vs. Nr. 1). Nach Vorbehandlung der Zellen mit Thiopental kam es zu einer signifikanten Abnahme des Anteils Annexin-positiver Zellen ($35,4 \pm 3,2$ % vs. $62,4 \pm 4,1$ %, Abb. 1, Balken Nr. 3 vs. Nr. 2). Eine vorausgehende Transfektion der Zellen mit HSPA1A-siRNA führte jedoch wieder zu einem signifikanten Anstieg des Anteils an Annexin-positiven Zellen ($51,0 \pm 4,4$ % vs. $35,4 \pm 3,2$ %, Abb. 1, Balken Nr. 4 vs. Nr. 3). Im Gegensatz dazu kam es nach einer vorangegangenen Transfektion mit „non-silencing“ siRNA zu keiner Zunahme des Anteils Annexin-positiver Zellen ($35,2 \pm 3,1$ % vs. $35,4 \pm 3,2$ %, Abb. 1, Balken Nr. 5 vs. Nr. 3). Der Anteil 7-AAD-positiver Zellen unterschied sich zwischen den einzelnen Interventionen nicht.

Interpretation

Das Hitzeschockprotein HSP-70 spielt eine entscheidende Rolle bei der Thiopental-vermittelten Protektion von humanen T-Zellen, da die spezifische Hemmung seiner transkriptionellen Expression den Schutz vor Apoptose signifikant einschränkt. Die Induktion von HSP-70 durch Thiopental könnte somit einen molekularen Mechanismus der Thiopental-vermittelten Zytoprotektion darstellen.

HIF-1 α beeinflusst durch Repression von Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein (VASP) die Barrierefunktion unter Hypoxie

P. Rosenberger¹, A.M. Robinson², T. Kong², T. Weissmüller³, J. Khoury², H. Eltzschig¹, K. Unertl¹ und S.P. Colgan^{2,3}

¹ Klinik für Anaesthesiologie und Intensivmedizin, Universitätsklinikum Tübingen, Eberhard-Karls-Universität Tübingen

² Center for Experimental Therapeutics and Reperfusion Injury, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA, USA

³ Mucosal Inflammation Program, University of Colorado, Denver, CO, USA

Fragestellung

Die zelluläre Minderversorgung mit Sauerstoff (Hypoxie) findet sich bei Schock, Sepsis oder akutem Lungenversagen. Während Hypoxie zu einer allgemeinen Barriere-Dysfunktion führt, ist die dynamische Reorganisation des Zytoskeletts hierbei ein wichtiger Mechanismus, dieser entgegenzuwirken [1]. Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein (VASP), ist entscheidend an dieser Reorganisation des Zytoskeletts beteiligt [2,3].

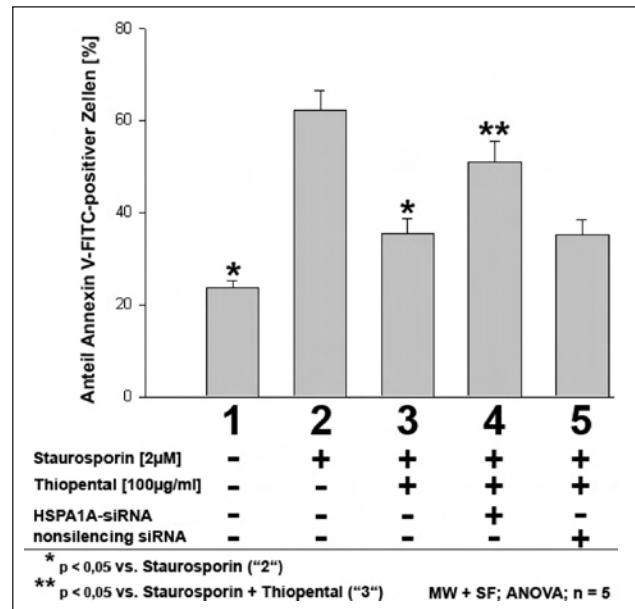


Abb. 1

Literatur

1. Bruemmer-Smith S, Stueber F, Schroeder S. Protective functions of intracellular heat-shock protein (HSP) 70-expression in patients with severe sepsis. *Intensive Care Med* 2001; 27:1835-1841.

2. Sasaki R, Hirota K, Roth SH, Yamazaki M. Anoxic depolarization of rat hippocampal slices is prevented by thiopental but not by propofol or isoflurane. *Br J Anaesth* 2005;94:486-491.

3. Loop T, Roesslein M, Muller L, Pahl HL, Geiger KK, Pannan BHJ. Thiopental induziert eine Hitzeschockantwort und vermindert die Staurosporin-induzierte Caspase-3-Aktivität in humanen T-Lymphozyten in vitro. *Anästh Intensivmed* 2005;46:576-577.

Korrespondenzadresse: roesslein@ana1.ukl.uni-freiburg.de

Methodik

Die Tierversuchsgenehmigung der Harvard Medical School in Boston lag vor. Zur Beurteilung der intestinalen Barrierefunktion applizierten wir Mäusen mit gezielter Deletion von intestinalem Hif1 α (Hif1 $\alpha^{-/-}$ -Mäuse) fluoreszenzmarkiertes Dextran (4kDa, 0,6mg/g Gewicht, p.o.) und bestimmten die Serum-Fluoreszenz nach Hypoxieexposition (8h, 8% Sauerstoff). Gewebeproben dieser Mäuse wurden mittels Western-Blot-Analyse und Echtzeit-RT-PCR auf VASP-Expression untersucht. Die funktionellen Auswirkungen einer VASP-Repression wurden mittels siRNA-Knock-down in Endothelzellen untersucht. Eine Überexpression von VASP wurde durch Transfektion eines VASP-CMV-Vektors erreicht. Zusätzlich wurde der 5'flankierende Anteil des putativen VASP-Promotors mittels PCR amplifiziert und in einen PGL3-Luziferase-Vektor eingefügt. Um die funktionelle Bedeutung der Hif1 α -bindenden Gen-Region zu bestätigen, führten wir abschließend eine gezielte Mutation dieses Gen-Abschnitts via site-directed mutagenesis (Quickchange-Kit, Stratagene) durch. Die statistische Evaluation wurde mittels t-test und ANOVA vorgenommen ($p < 0.05$ signifikant).

Ergebnisse

Die intestinalen Hif1 $\alpha^{-/-}$ -Mäuse waren gegenüber einer Hypoxie-induzierten Barriere-Dysfunktion geschützt (Serum Fluoreszenz Werte (WT 559 ± 30 vs. Hif1 $\alpha^{-/-}$ 251 ± 51 , n=4; $p < 0.05$, Abb. 1A)). ►

► Echtzeit-RT-PCR und Western-Blot-Analysen bestätigten eine reduzierte VASP-mRNA und Proteinexpression in WT nach Hypoxie-Exposition (Nx 1 ± 0.2 -fach vs. Hx 0.51 ± 0.08 -fach, $n=4$; $p<0.05$, Abb. 1B). Im Gegensatz dazu war VASP bei Hif1 $\alpha^{-/-}$ -Mäusen nicht Hypoxie-reguliert. In Hypoxie-exponierten Epithel-(T84) oder Endothel-(HMEC-1)-Zellen war VASP-mRNA und Proteinexpression ebenfalls reprimiert. Während der endotheliale VASP-Knockdown zu einer erhöhten Permeabilität ($1,68 \pm 0,06$ -fach; $n=8$; $p<0.01$) führte, bewirkte eine Überexpression von VASP eine Verringerung der posthypoxischen Permeabilität ($0.67 \pm 0,06$ -fach, $n=8$; $p<0.05$). Der VASP-PGL3-Reporter zeigte eine Repression der Luziferase-Aktivität nach Hypoxie-Inkubation in HMEC-1- ($0.39 \pm 0,03$ -fach; $n=5$; $p<0.05$) oder HeLa- ($0.34 \pm 0,1$ -fach; $n=5$; $p<0.05$)-Zellen. Diese Repression konnte durch Mutation der Hif1 α -Bindestelle vollständig aufgehoben werden (Kontrolle $1 \pm 0,11$ -fach; hVASP-PGL3 $0,47 \pm 0,06$ -fach, Hif1 α -Mutation $1,26 \pm 0,07$ -fach; $n=5$; $p<0.05$, Abb. 1C).

Interpretation

Die durchgeführten Untersuchungen bestätigen eine zentrale Rolle von Hif1 α für die Genregulation von VASP. Die HIF-induzierte Repression von VASP führt zu erhöhter Permeabilität unter Hypoxie, die durch Überexpression von VASP unterdrückt werden kann.

Literatur

1. Lawrence DW, Comerford KM, Colgan SP. Role of VASP in reestablishment of epithelial tight junction assembly after Ca²⁺ switch. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002;282:C1235-1245.
2. Comerford, KM, Lawrence DW, Synnestvedt K, Levi BP, Colgan SP. Role of vasodilator-stimulated phosphoprotein in protein kinase A-induced changes in endothelial junctional permeability. *Faseb J* 2002;16:583-585.
3. Butt E, Abel K, Krieger M, Palm D, Hoppe V, Hoppe J, et al. cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites of the focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) in vitro and in intact human platelets. *J Biol Chem* 1994;269:14509-14517.

Korrespondenzadresse: peter.rosenberger@medizin.uni-tuebingen.de

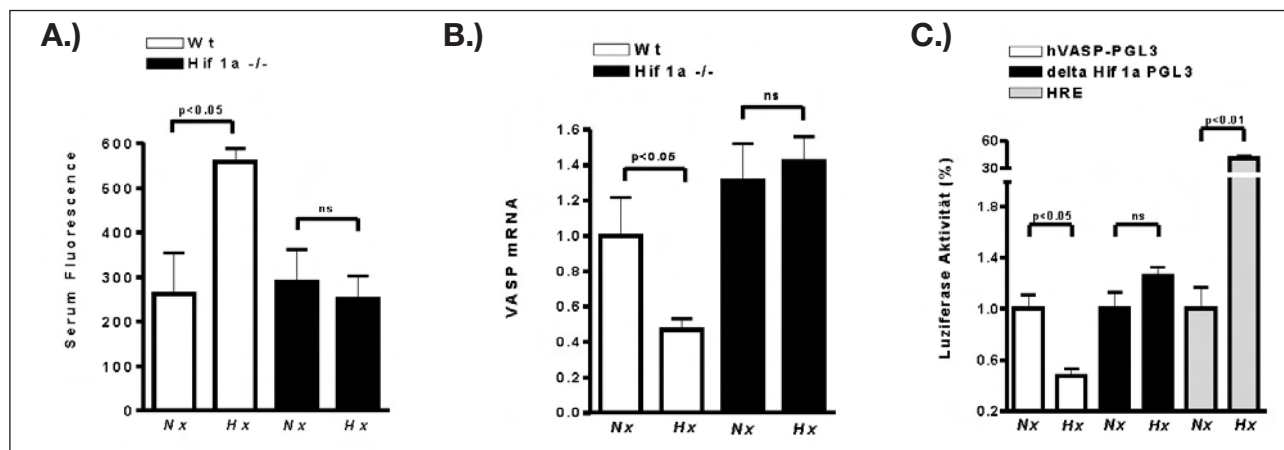


Abb. 1: A.) Serum-Fluoreszenz von 4kD FITC-Dextran in Wt- und intestinalen Hif1 $\alpha^{-/-}$ -Mäusen nach 8h normobarer Hypoxie (8% O₂) B.) VASP mRNA-Expression in der intestinalen Mukosa. C.) Humaner VASP-PGL3-Reporter während Normoxie (Nx) oder Hypoxie (24h, 1% Sauerstoff, Hx). (hVASP-PGL3: Vollständiger Vektor, Delta-Hif1 α -PGL3: Mutation der Hif1 α -Bindungsstelle an Position -522 bis -519bp. HRE = Hypoxia Responsive Element als Positiv-Kontrolle).

Interaktion der Ubiquitin-Esterase L1 mit dem alpha2-Adrenozeptor

C. Schaper, B. Weber, J. Scholz und B. Bein

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

Fragestellung

Alpha2-Adrenozeptor-Agonisten spielen eine bedeutende Rolle in der klinischen Anästhesie. Darüber hinaus wurden neuroprotektive Effekte nachgewiesen, die im speziellen über den alpha2a-Adrenozeptor-Subtyp vermittelt werden [1]. Die zellulären Mechanismen hierfür sind bisher wenig untersucht worden, als einzige Bindungspartner des alpha2-Adrenozeptors sind hier die Proteine Arrestin und Spinophilin beschrieben. Beide Proteine spielen eine wichtige Rolle beim Transport von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren an die Zellmembranoberfläche und bei deren Abbau [2]. In dieser Arbeit wurde untersucht, welche weiteren Proteine an den alpha2-Adrenozeptor binden und dessen Funktion beeinflussen.

Methodik

Die dritte intrazelluläre Schleife des alpha2-Adrenozeptors wurde in einem Two-Hybrid-Screening mit einer menschlichen cDNA auf potentielle Bindungspartner überprüft. Von im Test positiven Klonen wurde die DNA isoliert und sequenziert. Die Protein-Protein-Bindung wurde in vitro mittels GST-Pulldown bestätigt, dieser Versuch wurde auch zum Nachweis der Spezifität der Bindung an den einzelnen alpha2-Adrenozeptor-Subtypen verwendet. Anschließend wurden die Gene der humanen Ubiquitin-Esterase L1 und des alpha2a-Adrenozeptors in eukaryontische Expressionsvektoren kloniert und diese in HEK293-Zellen transfiziert. Die In-vivo-Interaktion der beiden Proteine wurde mittels Koimmunopräzipitation von transfizierten HEK293-Zellen untersucht. Diese Zellen wurden auch zur Bestimmung der subzellulären Lokalisation beider Proteine im konfokalen Mikroskop verwendet.

Ergebnisse

Insgesamt wurden 2×10^7 Klone im Two-Hybrid-System auf Interaktion mit der dritten intrazellulären Schleife des alpha2a-Adrenozeptors untersucht. Durch DNA-Sequenzierung der iso-

lierten positiven Klone wurde die Ubiquitin-Esterase L1 als ein potentieller Bindungspartner des alpha2-Adrenozeptors identifiziert. GST-Pulldown-Experimente bestätigten die Bindung der Ubiquitin-Esterase L1 an den alpha2a-Adrenozeptor und zeigten, dass die Ubiquitin-Esterase L1 mit geringerer Präferenz auch an den alpha2b-Adrenozeptor und den alpha2c-Adrenozeptor bindet. Eine Bindung an den beta2-Adrenozeptor, einem weiteren G-Protein-gekoppelten Rezeptor, konnte dagegen nicht gezeigt werden.

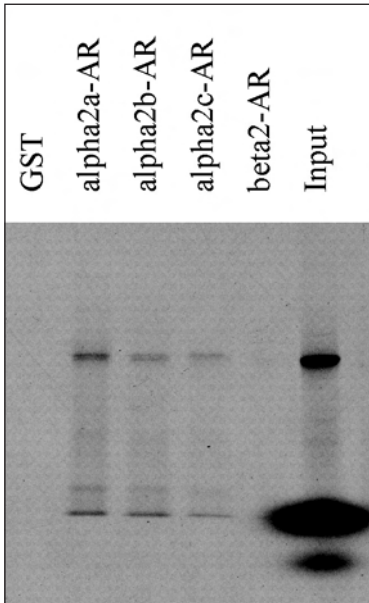


Abb. 1: GST-Pulldown: In vitro hergestellte und radioaktiv markierte Uch-L1 wurde mit auf Sepharose-Beads immobilisierten GST-Fusionsproteinen inkubiert. Nach dem Waschen der Proben wurden diese mittels SDS-PAGE und Autoradiographie aufgetrennt und analysiert. Der Input zeigt das Signal für 15% des eingesetzten Translationsproduktes. In Höhe der Markierung sind die spezifischen Banden zu sehen, als Ausdruck der Bindung der Uch-L1 an alle drei alpha2-AR, nicht aber an den beta2-AR oder an GST alleine.

Koimmunopräzipitationen des alpha2a-Adrenozeptors mit der Ubiquitin-Esterase L1 in transfizierten HEK293-Zellen zeigten,

dass beide Proteine auch in vivo interagieren und bestätigten damit die Ergebnisse des Two-Hybrid-Screenings und des GST-Pulldown. Die Untersuchung transfizierter Zellen im konfokalen Mikroskop ergab, dass der alpha2a-Adrenozeptor und die Ubiquitin-Esterase L1 in unmittelbarer Nähe an der Plasmamembran kolokalisieren.

Interpretation

Mit dieser Arbeit konnte erstmalig eine Interaktion des alpha2-Adrenozeptors mit dem deubiquitinierenden Enzym Ubiquitin-Esterase L1 nachgewiesen werden. Die Ubiquitin-Esterase L1 nimmt eine wichtige Funktion bei der Regulierung des Abbaus intrazellulärer Proteine ein. Es ist daher anzunehmen, dass die Bindung an den alpha2-Adrenozeptor eine entscheidende Rolle beim Rezeptorabbau und der Agonist-induzierten Desensibilisierung spielt. Von besonderem Interesse ist dabei die höhere Affinität der Ubiquitin-Esterase L1 zum alpha2a-Adrenozeptor im Vergleich zu den beiden anderen alpha2-Adrenozeptor-Subtypen. Da eine Bindung von Arrestin, einem Protein, welches für die Internalisierung von Membranproteinen verantwortlich ist, nur an die alpha2b- und alpha2c-Adrenozeptor-Subtypen, aber nicht an den alpha2a-Adrenozeptor nachgewiesen werden konnte, ist zu vermuten, dass der alpha2a-Adrenozeptor über einen anderen, Ubiquitin-Esterase-L1-vermittelten Stoffwechselweg internalisiert wird. Da die Ubiquitin-Esterase L1 auch mit neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Parkinson in Zusammenhang gebracht wurde [3], könnte die höhere Affinität der Bindung der Ubiquitin-Esterase L1 an den alpha2a-Adrenozeptor auch einen potentiellen Wirkmechanismus für die beschriebenen neuroprotektiven Effekte von alpha2-Adrenozeptor-Agonisten darstellen.

Literatur

1. Ma, et al. Eur J Pharmacol 2004;502:87-97.
2. Wang, et al. Science 2004;304:1940-1944.
3. Facheris, et al. Neurosci Lett 2005;381:131-134.

Korrespondenzadresse: schaper@anaesthesie.uni-kiel.de

Untersuchungen zur ventrikulären Arrhythmogenität von Droperidol

A. Schwoerer¹, C. Blütner², S. Brandt², S. Binder², C.C. Siebrands^{2,3}, H. Ehmke¹ und P. Friederich²

¹ Institut für Vegetative Physiologie und Pathophysiologie,

² Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

³ Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg, Universität Hamburg

Fragestellung

Die kardialen Nebenwirkungen von Droperidol in antiemetischen Dosierungen sind gegenwärtig umstritten. Die amerikanische Food and Drug Administration (FDA) gab 2001 eine Warnung heraus, dass Droperidol schwere Arrhythmien vom Torsade de pointes-Typ verursacht [1]. Entgegen dieser Warnung konnte bisher in klinischen Studien nicht nachgewiesen werden, dass Droperidol bei Verwendung in antiemetischen Dosierungen zu einer signifikanten Verlängerung der QT-Zeit führt bzw. ventrikuläre Arrhythmien auslöst [2]. Arrhythmien vom Torsade de pointes-Typ können durch eine übermäßige Verlängerung ventrikulärer Aktionspotentiale, verbunden mit der Entstehung von Nachdepolarisationen, typischerweise durch eine medikamentöse Blockade von human ether-a-go-go-related gene (HERG)-Kanälen

verursacht werden [3]. In der vorliegenden Studie sollte daher geklärt werden, ob Droperidol in antiemetischer Dosierung das Aktionspotential isolierter Kardiomyozyten verlängert und arrhythmogene Nachdepolarisationen auslöst. Darüber hinaus sollten die molekularen Grundlagen der HERG-Kanal-Blockade durch Droperidol und die Rolle von Aminosäuren, die typischerweise hochaffine HERG-Kanal-Blockaden vermitteln, untersucht werden.

Methodik

Die molekularen Mechanismen der HERG-Blockade durch Droperidol wurden mittels der Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp-Technik an *Xenopus-laevis*-Oozyten untersucht [3], welche Wildtyp- bzw. mutierte HERG-Kanäle exprimierten. Die Mutationen T623A, S624A, V625A, Y652A und F656A wurden durch Mutagenese erstellt. Die Auswirkungen von Droperidol auf das kardiale Aktionspotential wurde mittels Patch-Clamp-Technik an linksventrikulären Kardiomyozyten von Meerschweinchenherzen analysiert. Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardabweichung; n steht für die Anzahl der Experimente, statistische Vergleiche erfolgten mittels Student-t-Test und ANOVA.

Ergebnisse

Droperidol inhibiert Ströme durch HERG-Wildtyp-Kanäle in *Xenopus-laevis*-Oozyten mit einer vom Pulsprotokoll abhängigen halbmaximalen Hemmkonzentration von 0.6-0.9 μ mol/L. ▶

► Droperidol verschiebt die Spannung der halbmaximalen Aktivierung (-11.9 ± 2.0 mV, $n=8$ vs. -7.4 ± 1.8 mV, $n=8$, $P<0.001$) und die Spannung der halbmaximalen Steady-State-Inaktivierung (-45.3 ± 10.9 mV, $n=10$ vs. -38.7 ± 7.8 mV, $n=10$, $P<0.001$) zu negativen Membranpotentialen. Die Kanaldeaktivierung wird nicht signifikant durch Droperidol beeinflusst. Die Strominhibition nimmt signifikant mit steigendem Membranpotential ($P<0.001$) und steigender Zeitdauer der Kanalaktivierung ($P<0.001$) zu. Alle untersuchten HERG-Mutationen verringern signifikant und in vergleichbarer Ausprägung die Strominhibition durch Droperidol. In isolierten Kardiomyozyten verlängert Droperidol konzentrationsabhängig das Aktionspotential in einem Konzentrationsbereich von 5-100 nmol/L. Bei Konzentrationen von ≥ 300 nmol/L hingegen wird das Aktionspotential verkürzt. Andere Aktionspotentialparameter werden nicht durch Droperidol beeinflusst. Frühe Nachdepolarisationen wurden nicht beobachtet.

Interpretation

Droperidol ist ein hochpotenter Blocker von HERG-Kanälen. Dabei spielen Aminosäuren, welche typischerweise hochaffine HERG-Blockaden vermitteln, eine wichtige Rolle. In Übereinstimmung mit

der hochaffinen Blockade von HERG-Kanälen kann Droperidol das kardiale Aktionspotential verlängern. Die beobachtete Verkürzung des Aktionspotentials bei höheren Konzentrationen sprechen darüber hinaus für eine gleichzeitige Blockade von depolarisierenden Ionenströmen, wie beispielsweise Calciumkanälen. Die vorliegenden experimentellen Ergebnisse unterstützen daher die klinische Beobachtung, dass bei der Anwendung von Droperidol in antiemetischen Dosierungen bei herzgesunden Patienten nicht mit schwerwiegenden ventrikulären Arrhythmien zu rechnen ist.

Literatur

1. FDA. FDA strengthens warnings for droperidol. <http://www.fda.gov/bbs/topics/ANSWERS/2001/ANS01123.html>. 2001.
2. White PF, Song D, Abrao J, Klein KW, Navarette B. Effect of low-dose droperidol on the QT interval during and after general anesthesia: a placebo-controlled study. *Anesthesiology* 2005;102:1101-1105.
3. Siebrands CC, Binder S, Eckhoff U, Schmitt N, Friederich P. Long QT 1 Mutation KCNQ1A344V Increases Local Anesthetic Sensitivity of the Slowly Activating Delayed Rectifier Potassium Current. *Anesthesiology* 2006;105:511-520.

Korrespondenzadresse: schwore@uke.uni-hamburg.de

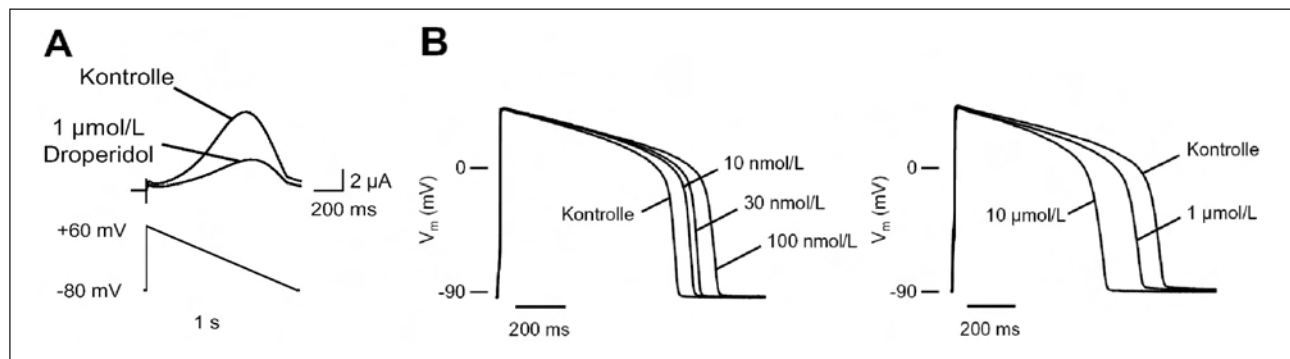


Abb. 1: (A) Blockade von HERG-Wildtyp-Kanälen durch 1 µmol/L Droperidol.

(B) Konzentrationsabhängige Veränderung der Aktionspotentialdauer in ventrikulären Kardiomyozyten von Meerschweinchen durch Droperidol.

Chaotisch variable pressure support ventilation (noisy PSV) – Evaluation einer neuen Beatmungsform

P.M. Spieth¹, P. Pelosi², P. Aikele², B. Neykova², K. Canani¹, A. Schreiber-Ferstl¹, T. Koch¹ und M. Gama de Abreu¹

¹ Klinik und Poliklinik für Anaesthesiologie und Intensivtherapie,

² Institut und Poliklinik für Radiologie,

Universitätsklinikum Dresden, Technische Universität Dresden

³ Dipartimento di Scienze Cliniche e Biologiche, Università degli Studi dell'Insubria, Varese, Italien

Fragestellung

Die Anwendung chaotisch variabler Beatmung und die Unterstützung der Spontanatmung im Rahmen des akuten Lungenversagens – acute respiratory distress syndrome (ARDS) – stellen Erfolg versprechende Ansätze in der Beatmungstherapie dar. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine neue Form der pressure support ventilation (PSV) zu entwickeln, welche die Variabilität des Atemmusters im Rahmen einer assistierten Spontanatmung unterstützt (noisy PSV) und diese im Vergleich zum etablierten Verfahren der biphasic intermittent positive airway pressure (BIPAP)-Beatmung in einem tierexperimentellen Modell des ARDS zu evaluieren.

Methodik

Zehn Hausschweine (25 - 30 kg) wurden nach Vorliegen der Tierversuchsgenehmigung durch die zuständige Landesbehörde intravenös analgosediert, orotracheal intubiert und volumenkontrolliert beatmet (Ausgangswert). Danach wurde eine akute Lungenschädigung mittels Surfactantdepletion induziert (Schädigung). Zur Induktion der Spontanatmung wurde die Analgosedierung reduziert und das Beatmungsgerät in den BIPAP-Modus umgestellt. In randomisierter Reihenfolge wurden die Tiere für jeweils eine Stunde sowohl mit BIPAP + Spontanatmung als auch mit noisy PSV beatmet. Für noisy PSV wurde das Beatmungsgerät in den PSV-Modus umgestellt und die Druckunterstützung durch einen externen Computer chaotisch variiert (stochastische Zufallsauswahl). Die Beatmungseinstellungen in den jeweiligen Phasen sind in Tabelle 1 illustriert.

Hämodynamik, Gasaustausch und Lungenmechanik wurden gemessen. Computertomographische (CT) Scans der Lunge wurden auf PEEP-Niveau durchgeführt und analysiert. Der Atmungskomfort wurde durch einen Beobachter anhand des Aachen Breathing Comfort Scores evaluiert. Die statistische Analyse erfolgte mit dem Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben, die Messdaten sind als Median und Interquartilen (Q1-Q3) angegeben, das Signifikanzniveau wurde bei $p<0,05$ definiert.

Ergebnisse

Noisy PSV führte zu einer Verbesserung des Gasaustausches, der Atemarbeit sowie des Atmungskomforts (Tab. 2). BIPAP + Spontanatmung war mit höheren totalen Gasvolumina und Anteilen von hyper- und normal belüfteten Lungenbezirken in der computertomographischen Analyse assoziiert (Tab. 3).

Interpretation

Wir haben eine Form der assistierten Spontanatmung entwickelt,

welche die Variabilität des Atemmusters – unabhängig von der inspiratorischen Anstrengung – unterstützt und zur Reduktion der Atemarbeit sowie zur Verbesserung der Lungenfunktion im Vergleich mit BIPAP + Spontanatmung führt. Die Effekte der noisy PSV auf die Lungenfunktion sind am ehesten durch ein verbessertes Ventilations/Perfusions-Verhältnis zu erklären.

Gefördert durch die European Society of Anaesthesiology.

Korrespondenzadresse: peter.spieth@uniklinikum-dresden.de

Tab. 1: Beatmungseinstellungen.

Variable	Ausgangswert	Schädigung	BIPAP	noisy PSV*	BIPAP+Spontan*
V_T (ml/kg)	12	12	8-10	nach P_{ASB} (6-8)	nach $CPAP_{high}$ (6-8)
FiO_2	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
PEEP bzw. $CPAP_{low}$ (cmH ₂ O)	5	5	5	5	5
I:E	1:1	1:1	1:1	–	Entsprechend vergleichbarem P_{mean} bei noisy PSV
RF(kontrolliert) (/min)	Nach $PaCO_2$ (30-45 mmHg)	Nach $PaCO_2$ (30-45 mmHg)	Nach $PaCO_2$ (50-60 mmHg)	–	Entsprechend vergleichbarem P_{mean} bei noisy PSV
$CPAP_{high}$ (cmH ₂ O)	–	–	15-20 (nach V_T)	–	15-20 (nach V_T)
P_{ASB} (cmH ₂ O)	–	–	–	Mittelwert = $CPAP_{high} - CPAP_{low}$, chaotisch variiert*	–

* = randomisierte Reihenfolge, • = Normalverteilung mit Standardabweichung = 1/3 des Mittelwerts

Tab. 2: Gasaustausch, Hämodynamik, respiratorische Parameter und Atmungskomfort.

Variable	Ausgangswert	Schädigung	noisy PSV	BIPAP+Spontan
PaO_2/FiO_2 (mmHg)	536,8 [528,9-551,1]	135,1 [108,0-153,3]	296,8 [182,4-340,6]*	208,5 [180,7-284,5]
Q_{wv}/Q_t (%)	5,5 [4,6-6,5]	30,5 [26,8-34,5]	18,9 [14,0-26,5]*	31,0 [22,9-36,5]
$PaCO_2$ (mmHg)	31,8 [30,2-36,9]	39,7 [32,2-43,6]	45,8 [38,5-54,4]*	61,6 [55,7-67,6]
CO (l/min)	2,92 [2,50-3,45]	3,16 [2,45-3,62]	4,11 [2,53-4,53]	4,45 [3,95-5,21]
HF (/min)	77,5 [69,0-87,8]	79,0 [67,5-86,5]	85,0 [66,0-108,3]*	97,0 [84,3-111,5]
MAP (mmHg)	73,0 [69,0-86,0]	73,5 [69,5-77,3]	72,0 [69,0-74,0]	71,0 [68,0-75,0]
MPAP (mmHg)	22,0 [18,5-23,5]	29,5 [25,0-32,0]	28,0 [25,0-31,0]*	33,5 [30,5-35,8]
MV (total) (l/min)	5,68 [4,66-6,84]	4,68 [3,98-5,50]	6,56 [5,82-7,39]	6,42 [4,79-7,49]
V_T (total) (ml)	323,0 [314-356]	323,0 [314-356]	199,0 [171-251]*	113,0 [94-140]
RF (total) (/min)	15,5 [14,3-18,0]	14,5 [12,3-15,0]	34,0 [25,8-38,0]*	55,0 [46,0-65,8]
Paw (cmH ₂ O)	10,6 [9,8-10,9]	14,7 [13,5-15,2]	8,5 [8,2-9,7]	9,7 [8,1-10,4]
PTP (cmH ₂ O.s/min)	–	–	2,4 [1,1-5,0]*	87,2 [42,6-126,4]
P0.1 (cmH ₂ O)	–	–	0,5 [0,4-0,6]*	3,0 [2,2-4,7]
ABC Score	–	–	53,5 [50,5-55,0]*	36,5 [29,0-39,3]

* = $P < 0,05$ vs. BIPAP+Spontan (Wilcoxon-Test).

Tab. 3: Computertomographische Analysen.

Variable	Ausgangswert	Schädigung	noisy PSV	BIPAP+Spontan
Totales Lungen-volumen (ml)	844,7 [704,5-1014,6]	873,1 [832,1-964,2]	789,9 [759,0-889,1]	858,6 [785,6-969,4]
Totales Gas-volumen (ml)	503,9 [399,6-645,1]	367,1 [280,6-454,1]	295,4 [249,4-341,5]	313,0 [274,8-395,2]†
überbelüfteter Anteil (% Vol)	1,75 [0,81-2,28]	0,76 [0,47-1,44]	0,64 [0,30-0,95]	0,96 [0,33-1,50] †
normal belüfteter Anteil (% Vol)	70,90 [67,91-75,15]	44,20 [39,17-53,35]	33,98 [26,49-41,83]	36,48 [34,08-39,67] †
minderbelüfteter Anteil (% Vol)	23,22 [17,56-27,13]	32,93 [30,84-39,18]	37,77 [30,45-47,13]	40,33 [30,60-45,75]
nicht belüfteter Anteil (% Vol)	3,96 [3,55-4,84]	20,13 [13,48-24,01]	24,34 [18,20-34,73]	24,63 [16,59-27,76]

† = $P < 0,05$ vs. noisy PSV (Wilcoxon Test).

Differentielle Regulation des Renin-Angiotensin-Rezeptorsystems nach experimentellem Schädelhirntrauma

S.C. Thal¹, S. Wyschkon¹, R. Trabold², N. Plesnila² und Ch. Werner¹

¹ Klinik für Anästhesiologie, Universitätsklinikum Mainz, Johannes Gutenberg-Universität Mainz

² Neurochirurgische Klinik und Poliklinik, Klinikum Großhadern, Ludwig-Maximilians-Universität München

Fragestellung

Verschiedene Studien haben den Einfluss des Renin-Angiotensin-Systems auf den sekundären Hirnschaden nach zerebraler Ischämie untersucht. Während der Angiotensin II-Rezeptor Typ 1 (AT1) eine Vergrößerung des zerebralen Schadens begünstigt, soll der Angiotensin II-Rezeptor Typ 2 (AT2) eine protektive Potenz besitzen und die Entstehung des sekundären Hirnschadens reduzieren. Die selektive Hemmung von AT1 führte bei Patienten mit Apoplex zu einer Verbesserung der neurologischen Funktion [1], während die Gabe von AT2-Agonisten im Tiermodell nach ischämischem Hirninfarkt eine Erhöhung der zerebralen Durchblutung bewirkte und das Infarktvolume verringerte [2]. Diese Daten deuten auf eine duale Rolle der Angiotensin-Rezeptoren in der zerebralen Ischämie hin. Diese Ansätze besitzen jedoch ein kurzes therapeutisches Fenster, welches vermutlich durch eine unterschiedliche Gen-Regulation der Rezeptormoleküle hervorgerufen wird. Während im Gehirn AT1 vorwiegend in Leukozyten, Endothelzellen, glatter Muskulatur und Astrozyten exprimiert wird, findet die AT2-Expression primär in Neuronen statt [2].

Beim Schädelhirntrauma (SHT) kommt es durch sekundäre inflammatorische und ischämische Prozesse zu einer Vergrößerung des primären mechanischen Parenchymschadens. Die Wirkung und die differentielle Regulation von AT1 und AT2 nach Schädelhirntrauma sind bisher nicht bekannt. Bisher wurde lediglich der Einfluss von AT1/AT2 auf Autoregulationsstörungen nach SHT untersucht [3]. Der zeitliche Verlauf der Expression von AT1 und AT2 nach experimentellem SHT wurde daher in der vorliegenden Studie im Mausmodell untersucht, um ein mögliches therapeutisches Fenster einzugrenzen.

Methode

Nach Genehmigung durch die Regierung von Oberbayern wurde ein standardisiertes SHT an männlichen C57Bl/6-Mäusen durchgeführt. Alle Tiere wurden mit Isofluran (1,4 Vol%) anästhesiert und rechts parietal ein pneumatisches Kontusionstrauma (Controlled Cortical Impact; CCI, 8m/s, 1mm Eindringtiefe) erzeugt. In Hirngewebe von Tieren nach CCI (15 min, 3, 6, 12 und 24 hr, je n=6) und von nativen Tieren (n=6) wurde die absolute AT1- und AT2-mRNA-Menge im traumatischen Fokus und in der kontralateralen Hemisphäre mit Hilfe der real-time Polymerasen-Kettenreaktion (real-time PCR) gemessen. Die Ergebnisse wurden mit der absoluten β 2M-mRNA-Menge als Kontroll-Gen normalisiert.

Statine regulieren die konstitutive Expression von monozytärem HLA-DR und CD74 herab

St.U. Weber, L.E. Lehmann, A. Hoeft und F. Stüber

Klinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin, Universitätsklinikum Bonn, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Statistik

Die Nullhypothese wurde mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit von unter 5% abgelehnt. Die mRNA-Expression wurden mit ANOVA on RANKS analysiert.

Ergebnisse

Nach SHT kommt es im Kontusionsareal zu einer deutlichen, signifikanten Reduktion der Expression von AT1 (15 min: -3%, 3 h: -15%, 6 h: -27%, 12 h: -55%, 24 h: -57%* vs. native Proben, * $p < 0,05$), während in der kontralateralen, nicht-traumatisierten Hemisphäre die AT1-Expression 15 min nach Trauma leicht abfällt, sich 3-12 h nach Trauma normalisiert und nach 24 hr erneut leicht abfällt (15 min: -3%, 3 h: +15%, 6 h: +5%, 12 h: +28%, 24 h: -17% vs. native Proben). Die Expression von AT2 im Kontusionsgebiet steigt im Vergleich zu gesunden Tieren 15 min bis 12 h nach Trauma tendenziell (15 min: +27%, 3 h: +43%, 6 h: +40%, 12 h: +29%) an, fällt aber 24 h nach CCI auf -19% gegenüber gesunden Tieren ab. In der kontralateralen Hemisphäre steigt die AT2-Expression ebenfalls tendenziell an (15 min: +43%, 3 h: +44%, 6 h: +44%, 12 h: +43%), sinkt dann im Verlauf nach 24 h auf 123% ab.

Interpretation

Das Schädelhirntrauma bewirkt keine signifikante Änderung der AT2-Expression. Im Gegensatz zu Modellen der fokalen zerebralen Ischämie wird dieser „protektive“ Angiotensin-II-Rezeptor nicht nach Trauma hoch reguliert. Im therapeutisch wichtigen Zeitraum zwischen 15 min und 12 h nach CCI trifft eine medikamentöse AT2-Intervention auf eine unveränderte Expression des Rezeptors und könnte eine Verringerung des sekundären Hirnschadens bewirken. Die mRNA-Expression von AT1 ist demgegenüber während des Beobachtungszeitraums reduziert und fällt im Zeitverlauf weiter ab. Das Expressionsprofil von AT1 deutet darauf hin, dass die Inhibition von AT1 beim Schädelhirntrauma lediglich ein sehr kurzes therapeutisches Fenster besitzt, da die Expression bereits 12 Stunden nach dem Trauma signifikant reduziert ist. Da bisher nur die mRNA der Rezeptorproteine ausgewertet wurde, werden in einem zweiten Schritt mit Hilfe der Westernblot-Technik die Angiotensin-II-Rezeptorproteine quantifiziert und die therapeutische Potenz der Inhibition und Stimulierung von AT1 und AT2 nach experimentellem SHT untersucht.

Literatur

1. Schrader J, Luders S, Kulschewski A, Hammersen F, Plate K, Berger J, et al. Morbidity and Mortality After Stroke, Eprosartan Compared with Nitrendipine for Secondary Prevention: principal results of a prospective randomized controlled study (MOSES). *Stroke* 2005;36:1218-1226.
2. Li J, Culman J, Hortnagl H, Zhao Y, Gerova N, Timm M, et al. Angiotensin AT2 receptor protects against cerebral ischemia-induced neuronal injury. *FASEB J* 2005;19:617-619.
3. Baranov D, Armstead WM. Selective blockade of AT1 receptor attenuates impairment of hypotensive autoregulation and improves cerebral blood flow after brain injury in the newborn pig. *Anesthesiology* 2003;99:1118-1124.

Korrespondenzadresse: thals@uni-mainz.de

Fragestellung

Es gibt erste Hinweise, dass Statine protektive Effekte bei Sepsis aufweisen [1]. Als potentielle Mechanismen werden hierbei über die reine Cholesterinsenkung hinausgehende, pleiotrope immunmodulatorische Effekte von Statinen diskutiert. Unter anderem inhibieren Statine die Interferon- γ -vermittelte Hochregulation von HLA-DR (MCH-II) auf dendritischen Zellen [2] und wirken so anti-inflammatorisch. Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, die Wirkung von Statinen auf die konstitutive Expression von HLA-DR auf Monozyten zu untersuchen.

Methodik

Durch negative Magnetbeadselektion gewonnene Monozyten gesunder Spender und die monozytäre Zelllinie Mono Mac 6 (MM6) wurden in der Gegenwart von verschiedenen Statinen (Simvastatin, Mevastatin, Pravastatin, Lovastatin und Fluvastatin) oder Kontrollen kultiviert. Inkubation mit Simvastatin erfolgte auch in Gegenwart von Mevalonat, dem Produkt der HMG-CoA-Reduktase. Es wurde mittels Durchflußzytometrie die Proteinexpression von HLA-DR, HLA-ABC, Interleukin-10 (IL-10), und IL-10-Rezeptor bestimmt sowie die Expression von intrazellulärem CD74 nach Blockade der membrangebundenen Fraktion durch unmarkierte Antikörper. Als Kontrollen zur Hoch- beziehungsweise Herabregulation von CD74 dienten Interferon- γ und Lipopolysaccharid (LPS). Apoptose wurde mittels Annexin-V-Bindung und Quantifizierung der Kaspase-3-aktiven Subpopulation durchflußzytometrisch bestimmt. Statistische Signifikanz wurde mittels ANOVA und Post-hoc-Testung nach Bonferroni geprüft.

Ergebnisse

Statine reduzierten dosisabhängig die konstitutive HLA-DR Expression auf Monozyten (Beispiel Simvastatin, Abb. 1a). Die HLA-DR Modulation ist ein Klasseneffekt der Statine: Mevastatin (-7,2 \pm 1,1% Reduktion, $p < 0,05$), Pravastatin (-14,1 \pm 2,5%, $p < 0,01$), Lovastatin (-14,4 \pm 2,2%, $p < 0,01$) und Fluvastatin (-29,5 \pm 5,3%, $p < 0,01$; alle $n = 3$, 20 μM für 24h) verminderten die HLA-DR Expression ebenfalls. Die Expression von MHC I (HLA ABC) hingegen wurde nicht signifikant durch Simvastatin reguliert. Die Wirkung von Simvastatin auf die HLA-DR-Expression ist möglicherweise durch die Hemmung der HMG-CoA-Reduktase vermittelt, denn der Statineffekt wurde durch 100 μM Mevalonat aufgehoben (Abb. 1b).

Um den molekularen Mechanismus der HLA-DR-Herabregulation genauer abzuklären, wurde (I) der IL-10-Signalweg, (II) ein mög-

licher unspezifischer Effekt auf die Proteinexpression im Rahmen der Statin-induzierten Apoptose und (III) die Expression des HLA-DR-Chaperons CD74 [3] untersucht. (I) In MM6-Zellen fand sich nach Statinbehandlung weder eine vermehrte IL-10-Produktion (1,8 \pm 1,1 IL-10% vs. Kontrolle 2,6 \pm 2,2, $n = 3$) noch eine Hochregulation des IL-10-Rezeptors (mittlere Fluoreszenzintensität 355 \pm 11 vs. Kontrolle 342 \pm 19, $n = 3$). (II) Die Kaspase-3-inaktive und Annexin-V-negative, also nicht apoptotische MM6-Populationen, zeigten eine verminderte HLA-DR Expression nach Inkubation mit Simvastatin (20 μM). (III) Während Interferon- γ (400 U/ml) intrazelluläres CD74 hochregulierte, reduzierte Simvastatin (20 μM) die intrazelluläre Expression von CD74 analog zu dem Priming mit LPS (2 ng/ml, Abb. 1c).

Interpretation

Die beobachtete Herunterregulation von CD74 durch Statine behindert möglicherweise die Reifung und Expression von HLA-DR, da das Chaperon CD74 für die Prozessierung der MHC-Klasse II notwendig ist [3]. Autokrine Wirkung von IL-10 und Apoptose kommen hingegen als Mechanismus nicht in Frage. Die Reduktion der konstitutiven HLA-DR-Expression auf Monozyten unterstreicht die eher antiinflammatorische immunmodulierende Wirkung von Statinen.

Literatur

1. Hackam DG, Mamdani M, Li P, Redelmeier DA. Statins and sepsis in patients with cardiovascular disease: a population-based cohort analysis. *Lancet* 2006;367:413-418.
2. Kwak B, Mulhaupt F, Myit S, Mach F. Statins as a newly recognized type of immuno-modulator. *Nature* 2000;6:1399-1402.
3. Wolk K, Kunz S, Crompton NEA, Volk HD, Sabat R. Multiple Mechanisms of Reduced Major Histocompatibility Complex Class II Expression in Endotoxin Tolerance. *J Biol Chem* 2003;278:18030-18036.

Korrespondenzadresse: stefan.weber@ukb.uni-bonn.de

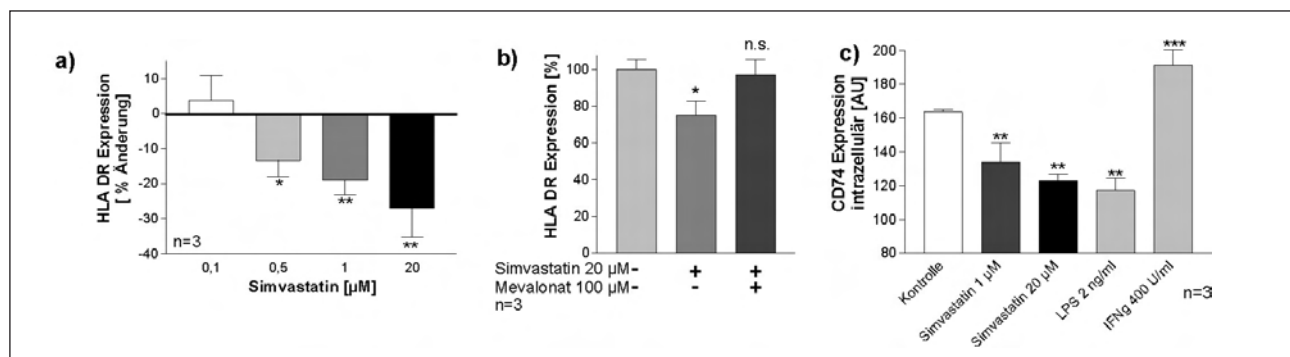


Abb. 1: Statine regulieren HLA-DR und intrazelluläres CD74 herunter. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Der Einfluss von post-ischämischer Hypothermie auf die Neuroprotektion und die Neurogenese nach zerebraler Ischämie der Ratte

U. Winkelheide, K. Engelhard, M. Lörcher, N. Benz, F. Kornes und C. Werner

Klinik für Anästhesiologie, Universitätsklinikum Mainz, Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Fragestellung

Eine postischämische Kältebehandlung wird derzeit als neuroprotektive Maßnahme bei Patienten nach Apoplex diskutiert. Der

Einfluss postischämischer Hypothermie auf die adulte endogene Neurogenese ist bisher nicht bekannt. In der vorliegenden Studie wird der Einfluss einer postischämischen therapeutischen Hypothermie auf die Regenerationsfähigkeit des Gehirns nach zerebraler Ischämie untersucht.

Methodik

Nach Genehmigung durch die Regierung von Rheinland-Pfalz wurden 50 männliche Sprague-Dawley-Ratten anästhesiert (3,0 - 3,5 Vol% Sevofluran), intubiert, beatmet und instrumentiert. Nach Anpassung der endexpiratorischen Sevoflurankonzentration auf 0,9 Vol% in Kombination mit 2,5 $\mu\text{g/kg/h}$ Sufentanil i.v. wurden die Tiere in 4 Gruppen ($n = 10$) randomisiert: Gruppen A + C: keine zerebrale Ischämie; Gruppen B + D: zerebrale Ischämie. In den

► Gruppen A und B wurde die perikranielle Temperatur bei 37 °C konstant gehalten, in den Gruppen C und D nach der Ischämie auf 33 °C gesenkt. Die Frontalhirnischämie (14 min) wurde über eine bilaterale Okklusion der Aa. carotides communes und eine hämorrhagische Hypotension auf einen arteriellen Mitteldruck von 40 mmHg induziert. Zwischen dem 1. und 7. Tag wurde 5-Bromodeoxyuridin (BrdU, Marker für neu gebildete Zellen) i.p. verabreicht. Nach 28 Tagen wurden die Tiere in Narkose perfundiert, die Gehirne entnommen und geschnitten. Mittels HE-Färbung wurde der histopathologische Schaden im Hippokampus mittels eines vier Punkte-Wertesystems (HE-Index) bestimmt: 0: kein Schaden; 1: 1 - 10 % Schaden; 2: 11 - 50 % Schaden und 3: über 50 % Schaden. Mittels Immunfluoreszenz-Doppelfärbung wurden im Gyrus dentatus BrdU-positive Neurone ausgezählt (Coexpression von BrdU und NeuN, Marker für neuronale Zellen). Zusätzlich wurden 10 weitere Ratten, ohne zerebrale Ischämie und Operation untersucht (Gruppe E, Naiv-Tiere).

Statistik

2-Wege ANOVA; $p < 0,05$.

Ergebnisse

Tiere ohne Ischämie (Gruppen A, C und E) zeigten keinen histopathologischen Schaden im Hippokampus (HE-Index: 0), während nach zerebraler Ischämie der Hippokampus unabhängig von der Temperatur zu über 50 % geschädigt war (HE-Index: 3; Gruppen B und D). Die natürliche Neurogeneserate der naiven und der scheinoperierten Tiere betrug durchschnittlich 3.300 ± 1.800 neue

Neurone (Gruppen A und C, E). Nach zerebraler Ischämie generierten Tiere der normothermen Gruppe (B) durchschnittlich 12.500 ± 5.800 , Tiere der hypothermen Gruppe (D) durchschnittlich 6.600 ± 3.300 neue Neurone ($p < 0,05$).

Interpretation

In Übereinstimmung mit anderen Studien zeigen die Ergebnisse, dass eine postischämische Hypothermiebehandlung den Hippokampus nicht vor histopathologischem Schaden schützt. Darüber hinaus wird durch postischämische Hypothermie die Neurogeneserate reduziert (Gruppe B vs. D). Eine verminderte Proliferation neuronaler Stammzellen nach Kälteexposition konnte auch bei neonatalen Ratten gezeigt werden [1]. Im Gegensatz zur verminderten Proliferation bei post-ischämischer Hypothermie konnte bei präischämischem Kühlungsbeginn kein Effekt auf die Neurogenese nachgewiesen werden [2]. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass eine Hypothermiebehandlung nach zerebraler Ischämie bei Ratten keinen neuroprotektiven Effekt besitzt und darüber hinaus die Neurogenese reduziert.

Literatur

1. Kanagawa T, Fukuda H, Tsubouchi H, Komoto Y, Hayashi S, Fukui O, et al. A decrease of cell proliferation by hypothermia in the hippocampus of the neonatal rat. *Brain Research* 2006;1111:36-40.

2. Winkelheide U, Engelhard K, Benz N, Loerscher M, Werner C. Effect of intraischemic hypothermia on cerebral neurogenesis. *Anesthesiology* 2006;A290.

Korrespondenzadresse: stegema@uni-mainz.de

Thrombozytenhemmung und Prognose der Sepsis: Klinische Bedeutung und molekulare Mechanismen

J. Winning¹, W. Lösche¹, R.A. Claus¹, I. Winning¹, M. Kohl² und M. Bauer¹

¹ Klinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie, Universitätsklinikum Jena, Friedrich-Schiller-Universität Jena

² SIRS-Lab GmbH, Winzerlaer Strasse 2, 07743 Jena

Fragestellung

Im Rahmen der systemischen Inflammation der Sepsis kommt es zu einer Aktivierung der Thrombozyten, die wahrscheinlich zur Entwicklung des Multiorganversagens beiträgt. In der vorliegenden Studie untersuchten wir den Einfluss von Thrombozytenaggregationshemmern (TFH) auf den klinischen Verlauf von stationär aufgenommenen Pneumoniepatienten sowie die pathophysiologischen Zusammenhänge auf molekularer Ebene im Tiermodell.

Methodik

Nach Zustimmung der Ethikkommission wurde in einer klinischen, retrospektiven Studie der Einfluss einer Medikation mit TFH im Rahmen einer Sekundärenprävention auf die Entwicklung und den Verlauf einer Sepsis untersucht. Es wurden 241 Patienten (davon 52 mit TFH), die aufgrund „community acquired pneumonia“ (CAP) akut stationär behandelt wurden, eingeschlossen. Ausgewertet wurden Dauer der intensivstationären Behandlung, Inzidenz von Organversagen und Letalität.

Parallel wurden nach behördlicher Genehmigung in einer begleitenden tierexperimentellen Studie zur Analyse der Pathomechanismen BALB/c-Mäuse mit Clopidogrel (187,5 mg/l Trinkwasser) für 4 Tage vorbehandelt und im Anschluß ein Endotoxinschock (200 µl Lipopolysaccharid, E. coli, Serotyp 0111:B4; 2 mg/ml, i.p.) induziert. Die Analyse umfasste in mehre-

ren Versuchsreihen eine invasiv-hämodynamische, laborchemische und transkriptomische Untersuchung des Einflusses von Clopidogrel auf Organschäden und Überleben. Daten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichungen angegeben, Signifikanzen wurden mittels t-Test und Fisher's exact test berechnet.

Ergebnisse

In der klinischen Studie waren die Patienten mit TFH deutlich älter als die Patienten ohne TFH (69 ± 7 vs. 58 ± 13 Jahre, $p < 0,0001$), zeigten aber am Tag der stationären Aufnahme keine Unterschiede im SOFA-Score ($2,94 \pm 1,61$ vs. $2,95 \pm 2,01$), CRP-Spiegel (196 ± 123 vs. 189 ± 133 µg/ml) sowie den Leukozyten- und Thrombozytenzahlen ($13,3 \pm 6,6 \times 10^9/\text{ml}$ vs. $13,6 \pm 5,9 \times 10^9/\text{ml}$ bzw. $2,70 \pm 1,14 \times 10^9/\mu\text{l}$ vs. $2,83 \pm 1,35 \times 10^9/\mu\text{l}$). Ein signifikant positiver Einfluss der TFH-Medikation konnte jedoch bezüglich Dauer der stationären Behandlung ($14,7 \pm 7,1$ vs. $17,2 \pm 10,7$ d; $p < 0,05$) und der Entwicklung eines Organversagens, gemessen an der Notwendigkeit einer intensivtherapeutischen Behandlung (9,6% vs. 24,9%; $p < 0,01$), nachgewiesen werden.

In der tierexperimentellen Studie fand sich innerhalb der ersten 48h kein Unterschied, gemessen an den hämodynamischen Parametern oder der Letalität zwischen Tieren mit und ohne TFH. Bereits 6 Stunden nach LPS-Schock wurde jedoch ein deutlicher Thrombozytenabfall (Kontrolle: $3,77 \pm 1,38 \times 10^8/\text{ml}$, Clopidogrel: $5,91 \pm 1,47 \times 10^8/\text{ml}$; $p < 0,05$), begleitet von Thrombenbildung z.B. in der Lungenstrombahn ($11,5 \pm 4,4$ vs. $6,1 \pm 2,3$ Thromben/Gesichtsfeld; $p < 0,025$), beobachtet. Die Genexpressionsanalyse mittels Microarray ($n=3$) dokumentierte nach 12 h eine signifikante antiinflammatorische Wirkung von Clopidogrel (z.B. Abnahme bzgl. Arachidonsäurestoffwechsel, Leukotrien-B4-Rezeptor und Arachidonat-5-Lipoxygenase aktivierendes Protein).

Im Beobachtungszeitraum von 7 Tagen waren von je 26 Tieren/Gruppe nach 48 Stunden noch 14 Tiere in der Clopidogrelgruppe und 13 Tiere in der Kontrollgruppe am Leben. In der Folge ver-

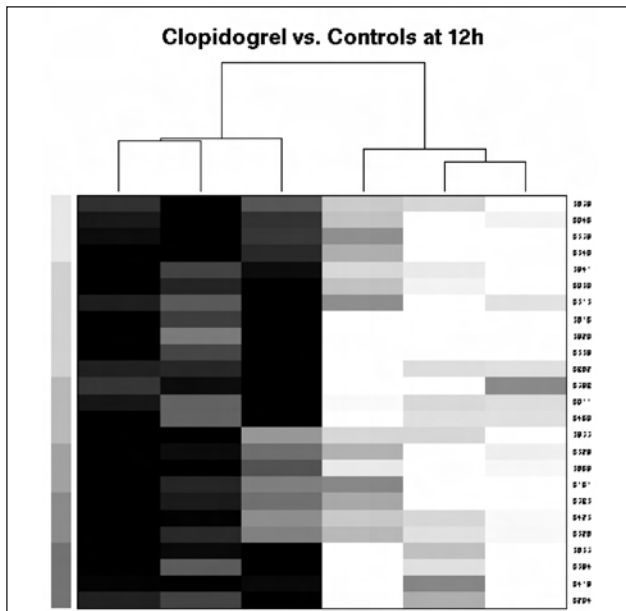


Abb. 1

► starben in der Clopidogrelgruppe jedoch nur 4 Tiere (28,6%) vs. 7 Tiere (53,8%) in der Kontrollgruppe unter dem histologischen Bild des Mehrorganversagens.

Interpretation

Die Ergebnisse zeigen einen potenziell positiven Einfluss einer TFH-Medikation auf den klinischen Verlauf bei CAP-Patienten. Im Tiermodell scheint eine reduzierte Thrombozytenaktivierung und -verbrauch unter TFH-Medikation sowie die Entwicklung einer sepsisassoziierten DIC weniger ausgeprägt zu sein als bei Kontrolltieren. Daneben besteht ein antiinflammatorischer Effekt von Clopidogrel. In Folge zeigt sich eine Verbesserung des Überlebens in der Spätphase nach LPS-Schock, während der frühe Schockverlauf unbeeinflusst zu sein scheint. Damit erscheinen weitere Untersuchungen zur Hemmung der Thrombozytenaktivierung als therapeutische Option bei Sepsis, zumindest bei Patienten ohne Blutungsgefährdung, als interessant.

Korrespondenzadresse: johannes.winning@med.uni-jena.de

Ausreibung des DGAI-Forschungsstipendiums der Fresenius-Stiftung

Die 22. **Wissenschaftlichen Arbeitstage der Deutschen Gesellschaft für Anästhesiologie und Intensivmedizin (DGA)** werden vom **15. – 16.02.2008** in Würzburg, Festung Marienberg, Hofstuben, veranstaltet.

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

Bewerbungen um das Forschungsstipendium bitten wir, entsprechend den Vorgaben auf der u.g. Internetseite nach Annahme des Abstracts einzureichen.

2008 wird das DGAI-Forschungsstipendium der Fresenius-Stiftung für eine hervorragende Forschungsarbeit mit 15.000 € dotiert. Grundlagenforschung und klinische Forschung sollen gleichermaßen gefördert werden.

Einsendeschluss: 06.01.2008

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

Anschrift: Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie, Universitätsklinikum Würzburg (Sekretariat Frau K. Geier),
Direktor: Prof. Dr. N. Roewer, Oberdürrbacher Straße 6, 97080 Würzburg, Deutschland,
Tel.: 0931 20130015, Fax: 0931 20130019.

* siehe: Anästh Intensivmed 2001;42:805-807

Ankündigung

1. Congress International Society of Intraoperative Neurophysiology

Termin: 15. - 17.11.2007 **Ort:** Luzern, Schweiz

Weitere Informationen: <http://www.neurophysiology.org/isin>
International Society for Intraoperative Neurophysiology (ISIN)

<http://www.imk.ch/ION2007/home/>
First Congress of ISIN

<http://www.imk.ch/ION2007/login/>
Abstract submission

