

# Einfluss unterschiedlicher Glukose- und Insulin-Konzentrationen auf Apoptose und Nekrose humaner Endothelzellen\*

Influence of various glucose and insulin concentrations on apoptosis and necrosis in cultivated endothelial cells

**C. Weilbach<sup>1</sup>, N. Rahe-Meyer<sup>2</sup>, D. Scheinichen<sup>2</sup>, M. Przemeck<sup>2</sup>, D. Breitmeier<sup>2</sup>, S. Piepenbrock<sup>2</sup> und M. Winterhalter<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Anästhesieabteilung, St. Josefs-Hospital Cloppenburg (Chefarzt: Dr. C. Weilbach)

<sup>2</sup> Zentrum Anästhesiologie, Medizinische Hochschule Hannover (Direktor: Prof. Dr. S. Piepenbrock)

## ► Zusammenfassung:

**Fragestellung:** Für die Ernährung von Intensivpatienten wurde die intensivierte Insulintherapie (IIT) 2001 von van den Berghe et al. erstmals anhand eines Kollektivs septischer Patienten beschrieben.

Nachdem diese Arbeit eine signifikante Reduktion der Patientensterblichkeit hatte zeigen können, erbrachten weitere Studien (z.B. VISEP-Studie) uneinheitliche Ergebnisse. Ziel dieser Studie ist die Untersuchung des Einflusses unterschiedlicher Glukose- und Insulinkonzentrationen auf die Viabilität von Endothelzellen *in vitro*.

**Methodik:** Endothelzellen (HUVEC = human umbilical vein endothelial cells) wurden in Versuchsan-sätzen mit Insulin (0 sowie 0,005 und 0,01 iE/ml) und Glukose [0 sowie 5 mmol/ml (~90 mg/dl) und 10 mmol/ml (~180 mg/dl)] inkubiert. Im Durchfluszytometer wurden Nekrose (Propidiumjodid) und Apoptose (Annexin) der Zellen gemessen.

**Ergebniss:** Die Untersuchungen zeigen, dass in dem gewählten Zellmodell bei Einsatz verschiedener Insulin- und Glukosekonzentrationen kein signifikanter Unterschied für die gemessene Rate an Apoptose/Nekrose der Endothelzellen nachzuweisen ist.

**Schlussfolgerungen:** Der nach unseren Untersuchungsergebnissen beobachtete fehlende Nachweis eines Einflusses von Glukose- und Insulinkonzentrationen auf die Apoptose/Nekroserate der kultivierten Endothelzellen ist also entweder ein methodisches Problem (nicht relevante Endothelzellsubpopulationen, Nachweisverfahren für Apoptose nicht sensitiv genug) oder es besteht in der Tat kein pathophysiologischer Einfluss verschiedener Insulin- und Glukosekonzentrationen auf die Apoptose- und Nekroserate von stimulierten Endothelzellen.

► **Schlüsselwörter:** Glukose – Insulin – Endothelialzellen – Apoptose – Nekrose.

## ► Summary:

**Background:** In patients with severe sepsis/septicaemia, intensive insulin therapy (IIT) – introduced by van den Berghe et al. in 2001 – represents a new the-

rapeutic principle. Although that study showed a significant reduction in patient mortality through the use of IIT, the findings of further studies (e.g. the VISEP study) were not conclusive. The aim of the present study was to investigate the influence of various concentrations of glucose and insulin on the viability of endothelial cells *in vitro*.

**Method:** Endothelial cells were isolated from human umbilical veins (HUVEC) and cultured in standard media. Cells from the 3rd - 5th passage were then incubated with insulin (0, 0.005 and 0.01 iE/ml) and/or glucose (0, 5, 10 mmol/ml). The relative percentage of necrotic (propidium iodide) or apoptotic (Annexin) cells were analysed in a flow cytometer.

**Results:** The results obtained revealed no significant influence of various insulin and glucose concentrations on the rate of apoptosis/necrosis of HUVEC cells.

**Conclusion:** The absence of any significant influence of insulin and/or glucose concentrations on necrosis/apoptosis might reflect a methodological problem (i.e. non-relevant endothelial cell subpopulation, insufficient sensitivity of the methodology for the detection of apoptosis) or it might reveal an absence of any influence of insulin and glucose concentrations on the viability of endothelial cells.

► **Keywords:** Glucose – Insulin – Endothelial Cells – Apoptosis – Necrosis.

## Einleitung

Die Sepsis stellt derzeit die Haupttodesursache von intensivpflichtigen Patienten in Europa dar. In der letzten Dekade sind nur wenige durchgreifend neue Behandlungsverfahren beschrieben worden, die sich als robust genug für den Einzug in die klinische Routinetherapie der Sepsis erwiesen haben. Neben einer Weiterentwicklung der Beatmungsmethoden [1,2,3] und der Einführung von rekombinantem

\* Rechte vorbehalten

► Protein C (Xigris<sup>®</sup>) ist hier insbesondere die „Intensivierte Insulintherapie“ (IIT), welche im Jahre 2001 durch van den Berghe et al. erstmals beschrieben wurde, zu nennen [4,5,6]. Diese Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass eine engmaschige Kontrolle und Stabilisierung des Glukosespiegels („Glucose-Clamp“) durch Zufuhr von Insulin eine signifikante Reduktion der Gesamt mortalität im Vergleich mit der Kontrollgruppe erbrachte.

Konsequenterweise wurden in den letzten fünf Jahren in der Mehrheit der Intensivstationen in Nordamerika und Europa Protokolle zur IIT implementiert. Neuere Studien allerdings waren nicht in allen Fällen in der Lage, den protektiven Effekt der IIT zu reproduzieren [7,8,9,10]. Eine in Deutschland initiierte prospektive, randomisierte Multicenter-Studie wurde wegen einer erhöhten Inzidenz von Hypoglykämien im Verum-Arm abgebrochen [11].

Der pathophysiologische Hintergrund für den postulierten protektiven Effekt der IIT ist nicht klar. Insulin hat anti-inflammatorische Effekte, exogenes Insulin kann in geeigneten In-vitro-Zell-Essays die Zytokinproduktion unterdrücken, schließlich hat Insulin auch unspezifische zellstabilisierende Effekte, sowohl auf undifferenzierte Zellen als auch auf Endothelzellen [12]. Daher könnte einer der möglichen pathophysiologischen Wirkmechanismen in der Suppression einer endothelialen Apoptose liegen.

In der vorliegenden Arbeit wurden frisch kultivierte humane Nabelschnurvenen-Endothelzellen verwendet (HUVEC). Mit diesen Zellen wurde eine Reihe verschiedener Insulin- bzw. Glukosekonzentrationen mit nachfolgender Kostimulation mit TNF-alpha hinsichtlich ihres Effektes auf die Zellviabilität getestet. Postuliert man einen möglichen zytoprotektiven Effekt von Insulin auf Endothelzellen, würde zu erwarten sein, dass in dem hier verwendeten Zell-Assay selbiger abbildbar sein müsste.

## Methodik

### Präparation der Endothelzellen

Frische (<36h) humane Nabelschnüre wurden durch die Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH) zur Verfügung gestellt. Zur Zellisolation wurden 0,008 g Kollagenase in 20 ml Cord Puffer (0,358 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> \* H<sub>2</sub>O + 0,165 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> \* 2 H<sub>2</sub>O + 8,190 g NaCl + 1,736 g MgCl<sub>2</sub> \* 6 H<sub>2</sub>O + 1,980 g Glukose ad 1 l Aqua bidest.) aufgenommen. Beide Enden der Nabelschnur wurden unter Verwendung einer sterilen Schere angefrischt. In die Nabelschnurvene wurde dann auf beiden Seiten eine 21G-Braunüle einligiert.

Zur Entfernung von Blutresten wurde die Nabelschnurvene zunächst mit 15 ml PBS-Puffer gespült. Nach der Spülung wurde die Nabelschnur mit Kollagenase bis zur leichten Distension der Vene aufgefüllt und für 25 Minuten bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Nabelschnurveneninhalt in ein 50 ml Zentrifugenrörchen überführt. Die Nabelschnur wurde dann nochmals mit 10 ml gespült, um verbliebene Zellen auszuwaschen. Die erhaltenen Zellen wurden sodann für 5 Minuten bei 300 g und 4° C zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in 1 ml Endothelzell-Medium / 10 % FCS (Promocell Heidelberg, Germany) resuspendiert und in eine 25 ml Zellkulturflasche mit 4 ml Endothelzell-Medium überführt. Nach 2 und nach weiteren 24 h Inkubation erfolgte jeweils ein Medienwechsel; die Inkubation wurde bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub> durchgeführt. Weitere Medienwechsel erfolgten alle 2 Tage unter Verwendung von Endothelzellmedium + 5 % FCS. Nach Erreichen eines konfluierenden Zelllayers (i.d.R. 3-5 Tage) wurden die Zellen trypsinisiert und in eine 75 ml Kulturflasche verbracht. Zellen aus der 3. bis 5. Passage wurden für die Stimulationsexperimente verwendet, die verbleibenden Zell-aliquots wurden in 75 ml Kulturflaschen weiterkultiviert.

### Stimulationsexperimente

Für die Stimulationsexperimente wurden ausschliesslich Zellen aus der 3. bis 5. Passage benutzt. Die Zellen wurden in 24 Well-Platten (1 \* 105 per well) ausgesät. Auch für die Stimulationsexperimente wurde Endothelzell-Medium + 5 % FCS verwendet. Die Zellen wurden zunächst zweimal gewaschen und in 1.500 µl Endothelzell-Medium aufgenommen. Glukose (Endkonzentration 5 mM und 10 mM) und/oder Insulin (Endkonzentration 0,005 und 0,01 IE/ml) wurden hinzugegeben und die Zellen für 16 Stunden bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann trypsinisiert, gewaschen und in PBS (500 µl) mit 5 % FCS resuspendiert.

Nach einer Erholungsphase (2h bei 37° C) wurden im Rahmen einer Pilotstudie (Tab. 1 und 2) als Ko-Stimulans 50 µl TNF-alpha, LPS 1.000 µg/L oder ein E.coli-Membran-Homogenisat hinzugegeben.

Nach 30-minütiger Inkubation bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub> wurde für die spätere flow-cytometrische Analyse 20 µl Annexin (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) hinzugegeben, gevortext und die Proben 30 Minuten bei Raumtemperatur in der Dunkelheit inkubiert. Die Zellen wurden dann gewaschen (5 min 300 g, 4° C), in 750 µl PBS resuspendiert, 50 µl Propidiumjodid (PI) [Sigma, Deisenhofen, Germany] ►

Tab. 1: Relativer Anteil PI oder Annexin-positiver HUVEC-Zellen nach Stimulation mit TNF-alpha oder LPS.

| Exp. | Anzahl            | MFI |                 |              |                  |         |     |
|------|-------------------|-----|-----------------|--------------|------------------|---------|-----|
|      |                   | No. | Endothel-Zellen | TNF (1µg/ml) | LPS (1000 µg/ml) | Annexin | PI  |
| 3    | $1 \cdot 10^5$    |     |                 | 10 ng        |                  | 3,49    | 344 |
| 4    | $5 \cdot 10^4$    |     |                 | 20 ng        |                  | 2,97    | 359 |
| 5    | $1,25 \cdot 10^5$ |     |                 | 50 ng        |                  | 3,08    | 336 |
| 6    | $5 \cdot 10^4$    |     |                 |              | 10 µg            | 3,42    | 334 |
| 7    | $7,5 \cdot 10^4$  |     |                 |              | 20 µg            | 3,41    | 314 |
| 8    | $1 \cdot 10^5$    |     |                 |              | 50 µg            | 3,36    | 327 |

MFI = mean fluorescence intensity; PI = Propidiumjodid; LPS = Lipopolysaccharide.

► wurden hinzugefügt. Nach Vortexen wurden die Proben in FACS-Röhrchen überführt und bis zur Analyse auf Eis gelagert.

Als Positivkontrolle (Abb. 1) wurde eine Doppelstimulation mit 50 ng TNF-alpha und 50 µg LPS für 30 min bei 37° C durchgeführt. Hiernach waren in der Annexin-Färbung 13,5 % der Zellen apoptotisch sowie (in der Propidium-Jodid-Färbung) 24,6 % der Zellen nekrotisch.

### Durchflusszytometrische Analyse

Die hier eingesetzte durchflusszytometrische Technik ermöglicht eine quantitative und qualitative Analyse der Wirkung von Glukose und Insulin auf Apoptose und Nekrose von Endothelzellen. Das Durchflusszytometer ist mit einem Argon-Laser ausgerüstet und auf eine Wellenlänge von 488 nm justiert.

Als sensitive Untersuchung für Apoptose wird nach Färbung mit FITC (Fluoreszeinisothiocyanat) der Anteil der apoptotischen Endothelzellen durch Annexin-V markiert. Annexin-V bindet an Phosphatidylserine, welches an der Oberfläche von apoptotischen Zellen exprimiert wird. Die grüne Fluoreszenz des FITC-gebundenen Annexin-V wird durch den korrespondierenden Photomultiplier (FL1, 530 nm) gemessen (Abb. 1).

Zur Messung der nekrotischen Zellen wurde der DNA-Farbstoff PI (Propidiumjodid) eingesetzt. Der Farbstoff kann die perforierte Zellmembran von toten Zellen, doch nicht die intakte Zellmembran von lebenden Zellen durchdringen, es resultiert eine Rot-

fluoreszenz des Zellkerns. Die PI-Fluoreszenz wird mit dem Photomultiplier FL2 (585 nm) gemessen (Abb. 2).

Die Flow-Zytometrie erfolgte mit dem Coulter EPICS XL. Das verwendete Endothelzell-Gate basierte auf den Streulicht-Eigenschaften der Zellen. Pro Probe wurden 1.000 Ereignisse aquiriert; zur Auswertung wurde die Software WinMDI 2.8 eingesetzt. Zur statistischen Analyse wurde die Software SPSS® 11.0 verwendet.

### Ergebnisse

Zunächst wurden in geeigneten Vorversuchen drei verschiedene Stimuli (TNF-alpha, LPS, E.coli-, Membran-Homogenisate) bezüglich ihrer kostimulatorischen Kapazität auf HUVEC-Zellen ausgetestet. Diese Experimente wurden durchgeführt, um einen direkten Einfluss der drei verschiedenen Stimuli auf die Apoptose/Nekrose der Zellen auszuschließen. Wie in Tabelle 1 und 2 gezeigt, fand sich kein direkter Einfluss der getesteten Stimuli auf die Viabilität der Zellen. Für die weiteren Experimente wurde TNF-alpha als Kostimulanz verwendet.

Die Ergebnisse der Stimulationsexperimente unter Verwendung von verschiedenen Glukose- und Insulinkonzentrationen sowie TNF als Kostimulanz sind in Tabelle 3 und 4 gezeigt sowie in den Abbildungen 2 und 3 graphisch dargestellt. Es zeigte sich durchgehend (11 verschiedene Experimente unter Verwendung von 11 verschiedenen Nabelschnurvenen- ►

Tab. 2: Relativer Anteil PI oder Annexin-positiver HUVEC-Zellen nach Stimulation mit TNF-alpha- oder E.coli-Membran-Homogenisaten.

| Exp. | Anzahl            | MFI |                 |              |        |         |     |
|------|-------------------|-----|-----------------|--------------|--------|---------|-----|
|      |                   | No. | Endothel-Zellen | TNF (1µg/ml) | E.coli | Annexin | PI  |
| 1    | $2 \cdot 10^5$    |     |                 | 2 ng         |        | 2,9     | 105 |
| 2    | $1 \cdot 10^5$    |     |                 | 5 ng         |        | 2,5     | 119 |
| 3    | $2,25 \cdot 10^5$ |     |                 | 10 ng        |        | 2,8     | 98  |
| 4    | $1,5 \cdot 10^5$  |     |                 |              | 10 µl  | 2,8     | 106 |
| 5    | $5 \cdot 10^5$    |     |                 |              | 20 µl  | 2,9     | 116 |
| 6    | $2,25 \cdot 10^5$ |     |                 |              | 50 µl  | 3,1     | 128 |

MFI = mean fluorescence intensity; PI = Propidiumjodid.

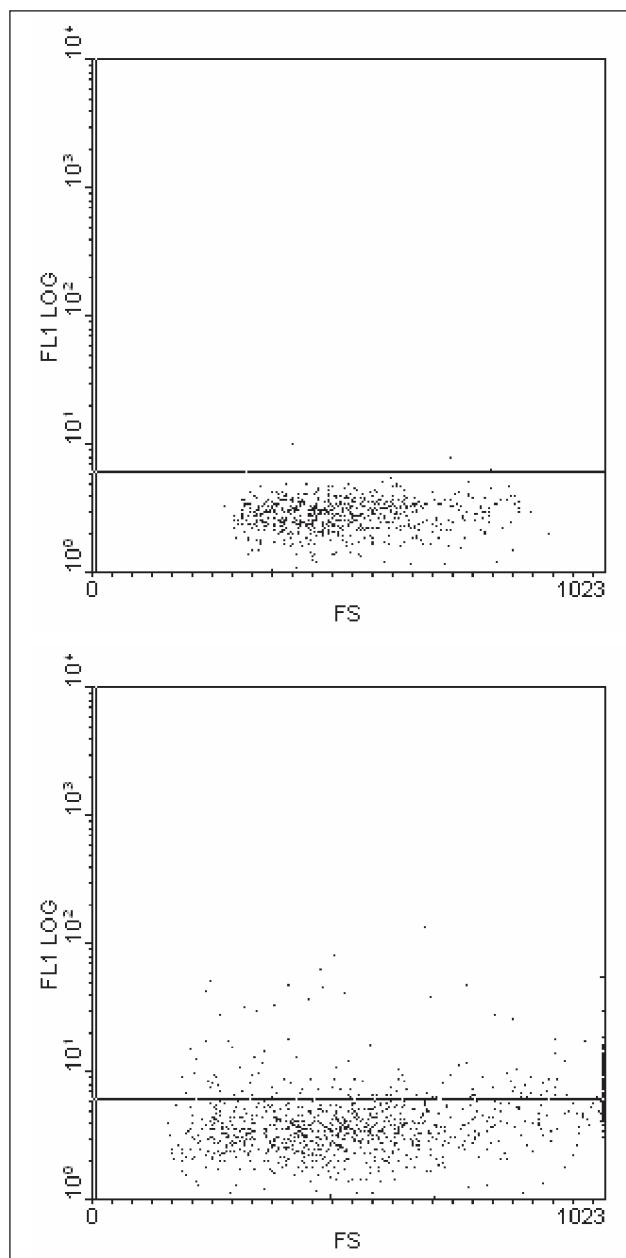


Abb. 1a: Anteil der apoptotischen Endothelzellen nach maximaler Stimulation.  
 Oben: Ohne Stimulation (1,2 % positive Zellen);  
 Unten: Nach Stimulation durch TNF-alpha/LPS (13,5 % positive Zellen).

► Präparationen) eine ausgeprägte Heterogenität der gemessenen Anteile an Annexin- bzw. PI-positiven Zellen. Eine einheitliche Tendenz, z.B. dahingehend, dass unter hoher Glukose- und Insulinkonzentration ein erhöhter Anteil nekrotischer oder apoptotischer Zellen nachweisbar war, zeigte sich nicht. In einigen Experimenten (Versuch 2, Versuch 3, Versuch 6, Versuch 7, Versuch 9) zeigte sich sogar ein, im Vergleich zur Negativkontrolle, geringerer Anteil Annexin-positiver Zellen.

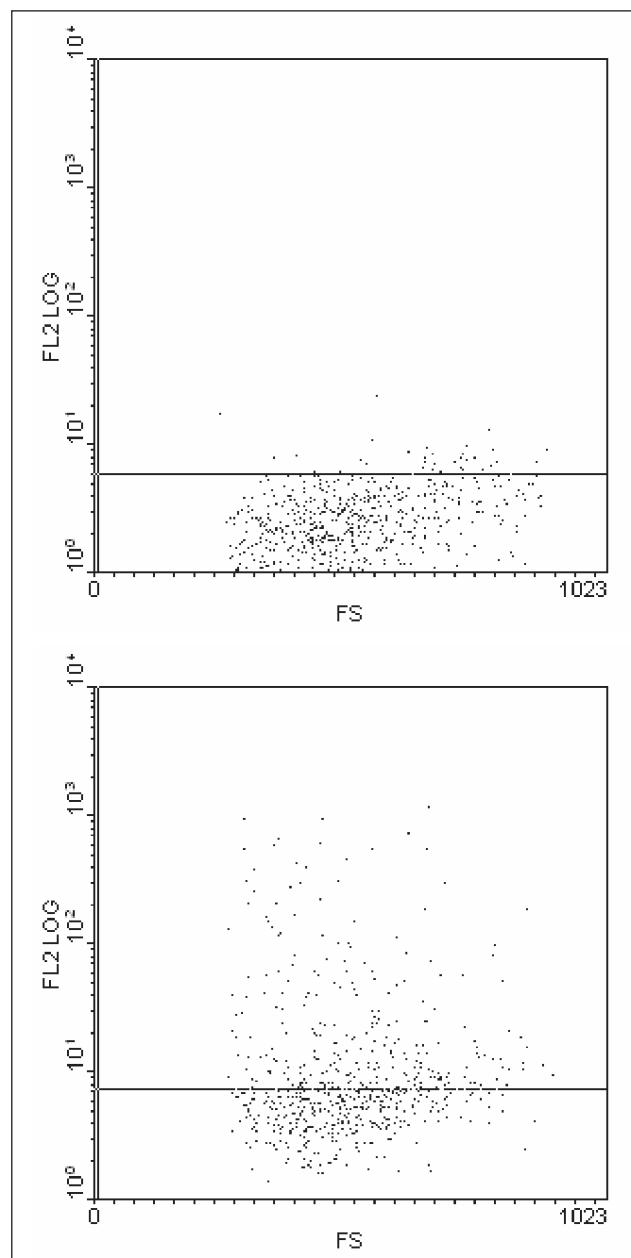


Abb. 1b: Anteil der nekrotischen Endothelzellen nach maximaler Stimulation.  
 Oben: Ohne Stimulation (5,9 % positive Zellen);  
 Unten: Nach Stimulation durch TNF-alpha/LPS (24,6 % positive Zellen).

## Diskussion

Seit der Erstbeschreibung der „Intensivierten Insulintherapie“ (IIT) durch van den Berghe et al. 2001 wurden Glukose-/Insulintherapieschemata in einer großen Zahl von Intensivbehandlungseinheiten in Nordamerika und Europa eingeführt. In der jüngeren Vergangenheit mehrten sich allerdings Studienergebnisse, welche die Wirksamkeit der IIT infrage stellten. Eine in Deutschland initiierte multizentrische, ran-

Tab. 3: Relativer Anteil (PI=Propidiumjodid-Färbungen) nekrotischer Zellen nach Stimulation durch Kombinationen aus TNF, Glukose und Insulin.

| Versuch    | Negativ-Kontrolle | TNF + Glukose 5 mmol + Insulin 0,005 IE/ml | TNF + Glukose 10 mmol + Insulin 0,005 IE/ml | TNF + Glukose 5 mmol + Insulin 0,01 IE/ml | TNF + Glukose 10 mmol + Insulin 0,01 IE/ml |
|------------|-------------------|--|---|---|--|
| 1          | 100,0 %           | 124,3 %                                    | 129,2 %                                     | 122,2 %                                   | n.d.                                       |
| 2          | 100,0 %           | 109,3 %                                    | 92,5 %                                      | 100,4 %                                   | n.d.                                       |
| 3          | 100,0 %           | 107,4 %                                    | 85,6 %                                      | 117,5 %                                   | 112,3 %                                    |
| 4          | 100,0 %           | 179,8 %                                    | 172,9 %                                     | 151,2 %                                   | 149,6 %                                    |
| 5          | 100,0 %           | 166,3 %                                    | 212,1 %                                     | 185,9 %                                   | 232,7 %                                    |
| 6          | 100,0 %           | 83,7 %                                     | 113,9 %                                     | 71,5 %                                    | 86,6 %                                     |
| 7          | 100,0 %           | 80,1 %                                     | 336,6 %                                     | 80,6 %                                    | 86,0 %                                     |
| 8          | 100,0 %           | 108,8 %                                    | 123,4 %                                     | 140,9 %                                   | 214,6 %                                    |
| 9          | 100,0 %           | 80,7 %                                     | 71,7 %                                      | 66,4 %                                    | 118,0 %                                    |
| 10         | 100,0 %           | 169,6 %                                    | 132,3 %                                     | n.d.                                      | n. d.                                      |
| 11         | 100,0 %           | 132,3 %                                    | 129,2 %                                     | 114,9 %                                   | 118,0 %                                    |
| Mittelwert | 100,0 %           | 122,0 %                                    | 145,4 %                                     | 114,3 %                                   | 139,7 %                                    |

Die angegebenen Werte repräsentieren die jeweilige mittlere MFI als % der jeweiligen Negativkontrolle.

► dominiert prospektive Studie musste wegen einer erhöhten Inzidenz von hypoglykämischen Episoden im Verum-Arm bei gleichzeitig fehlendem Wirksamkeitsnachweis abgebrochen werden [11].

Eines der prinzipiellen Probleme der IIT liegt darin, dass ein eindeutiger Wirkmechanismus auf zellulärer Ebene bisher nicht gezeigt werden konnte. Die endotheliale Zellauskleidung, insbesondere der postkapillären Venolen, hat in der pathophysiologischen Kaskade der Sepsis (z.B. Invasion von Mikroorganismen, erhöhte Vasopermeabilität, Entgleisung der Gerinnung bis hin zu Mikrothrombosen) eine überragende Bedeutung. Es war deshalb sinnvoll, in unseren Untersuchungen die Endothelzelle als Prototypzelle zum Nachweis oder Ausschluss für einen der möglichen Wirkmechanismen des Insulins, nämlich der Hemmung der Apoptose, zu verwenden.

Für diesen Zweck verwendeten wir frisch kultivierte

HUVEC-Zellen als Endothelzellquelle. Das HUVEC-Zellsystem ist für die Untersuchung einer Vielzahl von Fragestellungen seit langem international etabliert, es wird z.B. auch als Read-out-System zur Untersuchung von Endothelzellaktivierungsvorgängen verwendet. Im Rahmen unserer Fragestellung untersuchten wir flowzytometrisch den Anteil von nekrotischen bzw. apoptotischen Zellen nach Stimulation der HUVEC mittels verschiedener Glukose- und Insulinkonzentrationen. Um die Suszeptibilität der untersuchten Zellpopulationen weiter herauszusetzen, wurden die HUVEC-Zellen zusätzlich mit TNF-alpha kostimuliert. In einer Vielzahl von individuellen Experimenten konnten wir zeigen, dass kein Zusammenhang zwischen den gestesteten Glukose- und Insulinkonzentrationen und der Zellviabilität, gemessen mittels Annexin- und PI-Färbung im Durchflusszytometer, bestand.

Tab. 4: Relativer Anteil (Annexin-Färbungen) apoptotischer Zellen unter Stimulation durch Kombinationen aus TNF, Glukose und Insulin.

| Versuch    | Negativ-Kontrolle | TNF + Glukose 5 mmol + Insulin 0,005 IE/ml | TNF + Glukose 10 mmol + Insulin 0,005 IE/ml | TNF + Glukose 5 mmol + Insulin 0,01 IE/ml | TNF + Glukose 10 mmol + Insulin 0,01 IE/ml |
|------------|-------------------|--|---|---|--|
| 1          | 100,0 %           | 157,6 %                                    | 146,8 %                                     | 129,5 %                                   | n.d.                                       |
| 2          | 100,0 %           | 92,8 %                                     | 75,4 %                                      | 100,0 %                                   | n.d.                                       |
| 3          | 100,0 %           | 102,5 %                                    | 86,1 %                                      | 115,4 %                                   | 112,4 %                                    |
| 4          | 100,0 %           | 114,3 %                                    | 100,0 %                                     | 115,6 %                                   | 89,1 %                                     |
| 5          | 100,0 %           | 98,8 %                                     | 91,9 %                                      | 93,3 %                                    | 95,6 %                                     |
| 6          | 100,0 %           | 85,0 %                                     | 83,2 %                                      | 79,1 %                                    | 87,3 %                                     |
| 7          | 100,0 %           | 96,6 %                                     | 124,5 %                                     | 85,1 %                                    | 104,2 %                                    |
| 8          | 100,0 %           | 104,8 %                                    | 121,5 %                                     | 115,4 %                                   | 162,3 %                                    |
| 9          | 100,0 %           | 116,7 %                                    | 100,5 %                                     | 114,8 %                                   | 112,0 %                                    |
| 10         | 100,0 %           | 99,6 %                                     | 108,3 %                                     | n.d.                                      | n.d.                                       |
| 11         | 100,0 %           | 80,6 %                                     | 78,3 %                                      | 78,3 %                                    | 73,6 %                                     |
| Mittelwert | 100,0 %           | 114,9 %                                    | 111,6 %                                     | 102,7 %                                   | 104,6 %                                    |

Die angegebenen Werte repräsentieren die jeweilige mittlere MFI als % der jeweiligen Negativkontrolle.

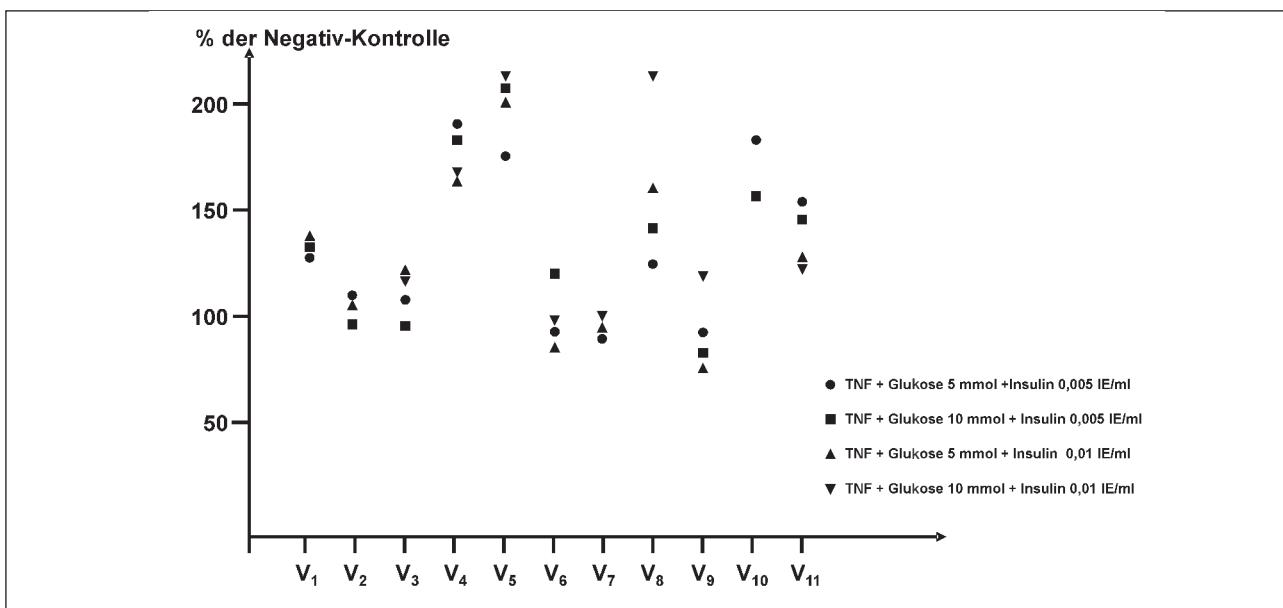


Abb. 2: Relativer Anteil nekrotischer (PI-positiver) Zellen in 11 Stimulationsexperimenten.

► Das Fehlen eines Einflusses von Insulin bzw. Glukose auf die Endothelzellviabilität kann naturgemäß die Ursache auch darin haben, dass der Read-out-Parameter „Zelltod“ zu robust war, um einen signifikanten Effekt sichtbar zu machen. Denkbar wären auch Beeinflussungen von Zellaktivierungsvorgängen (z.B. Adhäsionsexpression, Permeabilitätsänderungen, Gerinnungsaktivierung) unterhalb der Schwelle des Zelltodes, welche in unserem System dann konsequenterweise nicht sichtbar wären. Hierfür würde sprechen, dass Insulin eine Reihe von endothelzellaktivierenden Effekten (ICAM- oder VICAM-Expression), Beeinflussung der neutrophilen

Chemotaxis und Phagozytose haben kann [12]. Andererseits konnte in einem Tiermodell (Schwein) gezeigt werden, dass eine prothaktierte Hyperinsulinämie in der Tat die LPS-induzierte Apoptose von porcinen PME-stimulierten Lymphozyten hemmen konnte [13].

Unsere Ergebnisse könnten allerdings auch dahingehend interpretiert werden, dass es in vivo keinen direkten Einfluss der verabreichten Insulinmenge bzw. der resultierenden Glukosekonzentration auf die Endothelzellviabilität gibt. Dieses würde implizieren, dass der zumindest in den initialen klinischen Studien beobachtete benefizielle Effekt einer IIT

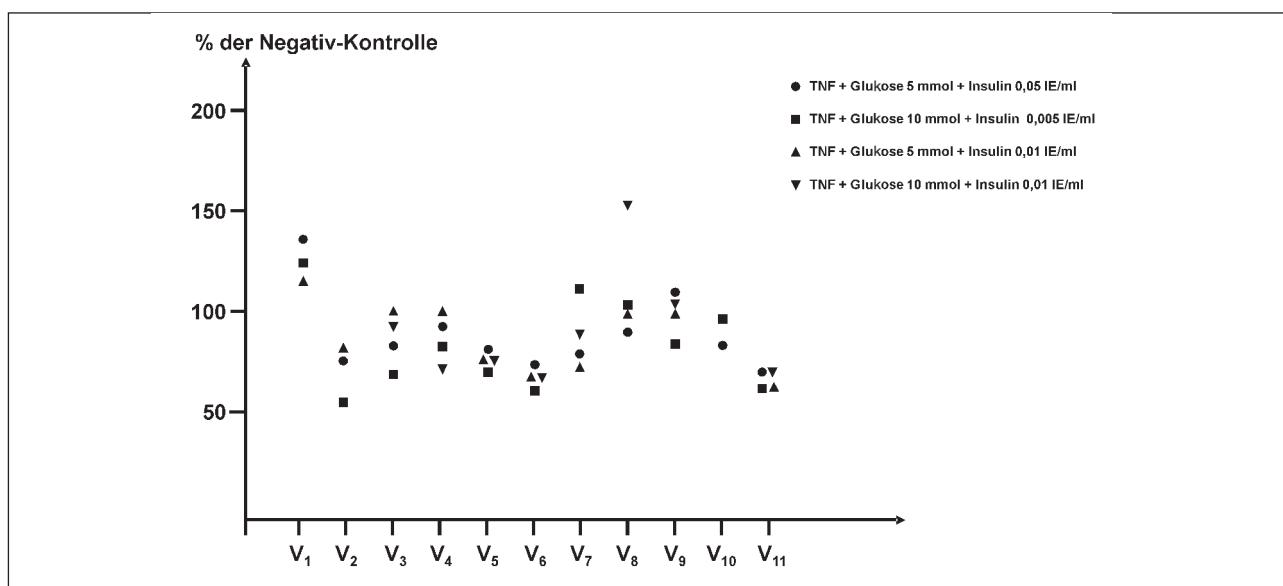


Abb. 3: Relativer Anteil apoptotischer (Annexin-positiver) Zellen in 11 Stimulationsexperimenten.

► nicht über die Endothelzellachse bzw. zumindest nicht über einen direkten protektiven Effekt des gegebenen Insulins auf die Endothelzelle mediert würde. Hier wäre dann ein anderer Wirkmechanismus, z.B. auf andere Zellpopulationen oder auf, wie oben diskutiert, Endothelzellaktivierungsvorgänge unterhalb der Schwelle des Zelltodes zu postulieren. Schließlich wäre aber auch denkbar, dass der gesamte klinische Effekt der IIT lediglich ein Epiphänomen darstellt und nicht Ausdruck eines spezifischen pathophysiologischen Mechanismus auf Endothelzellebene ist. So könnte zum Beispiel der Morbiditäts- und Mortalitätsunterschied zwischen den Patientengruppen in den initialen klinischen Studien zur IIT lediglich Ausdruck einer unterschiedlichen Häufung von anderen pathophysiologischen Vorgängen wie z.B. der „Critical illness“-Neuropathie sein. Hierfür würden auch die Daten der abgebrochenen prospektiv randomisierten Multicenter-Studie [11] sprechen, die den initialen Daten aus den frühen monozentrischen Studien widersprechen.

Zusammenfassend zeigen unsere Daten, dass ein Einfluss verschiedener Glukose- und Insulinkonzentrationen auf die Apoptose/Nekroserate kultivierter Endothelzellen nicht nachweisbar ist. Dieses kann seine Ursache entweder in methodischen Problemen haben (nicht relevante Endothelzellsubpopulationen, Nachweisverfahren für Apoptose nicht sensitiv genug) oder es besteht in der Tat kein pathophysiologischer Einfluss verschiedener Insulin- und Glukosekonzentrationen auf die Apoptose- und Nekroserate von Endothelzellen.

#### Literatur

1. (Author not listed) Acute Respiratory Distress Syndrome Network: Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 2000; 342: 1301–8.

2. Kopp R, Kuhlen R, Max M, Rossaint R. Evidenzbasierte Medizin des akuten Lungenversagens. *Anaesthesia* 2003; 52: 195–203.
3. Tremblay LN, Slutsky AS. Ventilator induced lung injury: from the bench to the bedside. *Intensive Care Med* 2006; 32: 24–33.
4. Van den Berghe G, et al. Intensive insulin therapy in the critically ill patient. *N Engl J Med* 2001; 345(19): 1359–67.
5. Van den Berghe G, et al. Outcome benefit of intensive insulin therapy in the critically ill: Insulin dose versus glycemic control. *Crit Care Med* 2003; 31(2): 359–66.
6. Chaudhuri A, et al. Anti-inflammatory and profibrinolytic effect of insulin in acute ST-segment-elevation myocardial infarction. *Circulation* 2004; 109(7): 849–54.
7. Holzinger U, et al. Metabolic inefficacy of a short-term low-dose insulin regimen in critically ill patients: a randomized, placebo-controlled trial. *Wien Klin Wochenschr* 2004; 116(17–18): 603–7.
8. Lacherade JC, Jabre P, Bastuji-garin S, et al. Failure to achieve glycemic control despite intensive insulin therapy in a medical ICU: incidence and influence on ICU mortality. *Intensive Care Med* 2007; 33(5):814–821.
9. Schultz MJ, Wolthuis EK, Moeniralam HS, et al. Struggle for implementation of new strategies in intensive care medicine: anti-coagulation, insulin, and lower tidal volumes. *J Crit Care* 2005; 20: 199–204.
10. Marik PE, Varon J. Intensive insulin therapy in the ICU: Is it now time to jump off the bandwagon? *Resuscitation* 2007;74(1): 191–193.
11. Marx G. Intensivierte Insulintherapie bei Intensivpatienten – Contra. *Dtsch Med Wochenschr* 2006; 131: 2481
12. Andersen SK, Gjedsted J, Christiansen C, Tonnesen E. The roles of insulin and hyperglycemia in sepsis pathogenesis. *J Leukocyte Biol* 2004; 75: 413–421.
13. Brix-Christensen V, Andersen SK, Andersen R, et al. Acute hyperinsulinemia restrains endotoxin induced systemic inflammatory response. *Anesthesiology* 2004; 100: 861–870.

#### Korrespondenzadresse:

Dr. med. Christian Weilbach  
St. Josefs-Hospital Cloppenburg  
Krankenhausstraße 13  
49661 Cloppenburg  
Deutschland  
Tel.: 04471 161500  
Fax: 04471 161507  
E-Mail: c.weilbach@kh-clp.de