

Abstracts der 24. Wissenschaftlichen Arbeitstage der DGAI

26. - 27.02.2010, Würzburg

Inhalt

- S. Bergt · O. Boehm · M. Heidrich · P. Paulus · G. Nöldge-Schomburg · B. Vollmar · K. Zacharowski · J. Roesner** 390
Hydrocortison reduziert das Überleben von TLR2-defizienten Mäusen in einem Modell der polymikrobiellen Sepsis
- T. Brandenburger · H. Grievink · N. Heinen · B. Pannen · H. Hermanns · I. Bauer** 391
Ischämische Fernpräkonditionierung des Herzens und frühe myokardiale Ischämie reduzieren die Expression der microRNA-1 in der Ratte
- S. Dömming · R.A. Claus · G. Wolf · T. Schürholz · G. Marx** 392
Hydroxyethylstärke induziert konzentrationsabhängig Apoptose und hemmt die Proliferation in einem Nierenzellmodell
- B. Drexler · S. Zinser · H. Hentschke · B. Antkowiak** 393
Diazepam induziert eine biphasische Hemmung der kortikalen Netzwerkaktivität in C57BL/6-Mäusen
- N. Foadi · A. Eberhardt · J. de la Roche · V. Buchholz · K. Krampfl · R. Dengler · M. Mühlenhoff · R. Gerardy-Schahn · G. Haeseler · M. Leuwer · J. Ahrens** 394
Einfluss veränderter Sialylierung auf das Gating-Verhalten von spannungsgesteuerten Natriumkanälen
- U.H. Frey · E. Kottenberg · H. Jakob · W. Siffert · J. Peters** 396
Genetische Interaktionen im β -adrenergen Signalweg und Einjahres-Überleben nach aortokoronarer Bypass-Operation: eine Pilot-Studie
- C. Fröhlich · F. Jans · T. Loop · M. Rösslein** 397
Dobutamin wirkt in vitro zytoprotektiv durch eine Induktion der Hitzeschockantwort
- U. Goebel · M. Siepe · C.I. Schwer · C. Schlensak · T. Loop** 398
Therapeutisch inhalativ appliziertes Kohlenmonoxid vermindert den Lungenschaden nach kardiopulmonalem Bypass im Schwein
- F.A. Gonnert · R. Bauer · R.A. Claus · R. Wetzker · M. Bauer** 399
Rolle der Phosphoinositol-3-Kinase- γ in der Pathogenese der Peritonitis-induzierten Sepsis – Untersuchungen am murinen Sepsismodell
- K. Heckel · M. Strunden · K.J. Kirsche · I. Dralle · R. Kieffmann · A.E. Goetz** 400
Die Glykokalyx vermittelt eine H_2O_2 -induzierte Kalzium-Signaltransduktion im pulmonalen Endothel über einen Heparansulfat-CD44-Mechanismus
- A. Johannes · B. Zollhöfer · N. Schlegel · M. Kredel · C. v. Kirschbaum · N. Roewer · J. Brederlau · R.M. Muellenbach** 402
Reduzieren minimale Tidalvolumina bis hin zur Apnoe-ventilation die beatmungs-assoziierte Lungenschädigung im tierexperimentellen Lungenversagen?
- I. Kaufmann · V. van der Heide · M. Thiel** 403
Rolle des Adenosin- A_{2A} -Rezeptor-Signalweges im murinen Sepsismodell
- S. Kreth · J. Heyn · C. Ledderose · E. Limbeck** 404
Die Expression des humanen Adenosin- A_{2A} -Rezeptors wird in polymorphkernigen Leukozyten posttranskriptionell durch die Micro-RNA-214 reguliert
- J. Larmann · A. Hahnenkamp · M. Schmitz · J. Chun · J. Stypmann · G. Theilmeier** 405
Der S1P-Rezeptor-Agonist FTY720 reduziert die Infarktgröße, aber induziert eine ventrikuläre Dilatation im Myokardischämie- und Reperfusionsmodell der Maus
- I. Lautenschläger · H. Dombrowsky · J. Sarau · Y.L. Wong · P. Zabel · I. Frerichs · S. Uhlig · N. Weiler** 406
Mechanismen der PAF-induzierten Perfusions- und Permeabilitätsänderungen am isoliert perfundierten Dünndarm der Ratte
- A. Lorenz · C. Herzog · J. Larmann · H. Janßen · M. Schmitz · E. Conway · G. Theilmeier** 408
HMGB1- und TLR2-Blockade schützen im In-vivo-Mausmodell der Myokardischämie mit Reperfusion vor Apoptose und myokardialer Schädigung
- B. Luchting · S. Kreth · M. Thiel** 409
Die Deletion von HIF-1 α in T-Zellen bewirkt eine pulmonale Hyperinflammation und eine erhöhte Letalität in einem murinen ARDS-Modell

Die Vorträge, deren Abstracts nachfolgend publiziert werden, wurden in einem verblindeten Verfahren von sieben Gutachtern ausgewählt und auf den Wissenschaftlichen Arbeitstagen der DGAI vom 26. -27.02.2010 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 2011 der Fresenius-Stiftung und das DGAI-Forschungsstipendium der Fresenius-Stiftung finden Sie auf der Seite 388.

- J. Mersmann · K. Iekushi · H. Milting · S. Dimmeler · K. Zacharowski** 410
Das Matrixprotein Biglykan ist essentiell für die Integrität der Ventrikelwand während experimenteller hypertensiver Kardiomyopathie bei der Maus
- P. Meybohm · J. Cremer · T. Becher · M. Jonigkeit · T. Schuett · D. Maahs · I. Möller · K. Zacharowski · M. Steinfath · B. Bein** 411
Ischämische Remote-Präkonditionierung - Eine neue Option zur perioperativen Organprotektion bei herzchirurgischen Patienten
- V. Mirakaj · D. Gatidou · C. Pötzsch · K. Westner · K. Unertl · P. Rosenberger** 412
Netrin-1 reduziert die Entzündungsreaktion bei Zymosan-A-induzierter Peritonitis
- T. Muders · H. Lüpschen · T. Meier · S. Leonhardt · C. Putensen · H. Wrigge** 413
Einfluss unterschiedlicher PEEP-Strategien auf die regionalen Ventilations- und Perfusionsverhältnisse bei experimentellem Lungenschaden im Schweinemodell
- M. Müller · Ch. Herzog · J. Larmann · J.E. Gessner · D. Hilfiker-Kleiner · M. Schmitz · G. Theilmeier** 415
Der Rezeptor für den aktivierten Komplementfaktor V (C5a) ist im post-ischämischen Myokard der Maus induziert und spielt eine kausale Rolle für den Reperfusionsschaden
- A. Redel · J. Stumpner · M. Lange · N. Roewer · F. Kehl** 416
eNOS vermittelt das erste und iNOS das zweite Fenster der Desfluran-induzierten Präkonditionierung gegen Myokardinfarkt
- M. Roesslein · C. Froehlich · V. Miltenberger · T. Loop** 418
Thiopental wirkt in humanen SK-N-SH-Zellen in vitro zytotoxisch durch die Induktion einer Hitzeschockantwort
- N. Schallner · T. Loop · U. Göbel** 419
Die zytotoxischen Wirkungen von Carbon-monoxide-releasing-molecule-2 (CORM-2) werden in vitro über eine Induktion der Hitzeschockantwort vermittelt
- M.A. Schick · C. Wunder · N. Roewer · C.T. Germer · J. Waschke · N. Schlegel** 420
Phosphodiesterase-IV-Hemmer verbessert die kapilläre Schrankenstörung und Mikrozirkulation bei der LPS-induzierten Inflammation der Ratte
- M.D. Schmittner · U. Lorenz · C. Weiss · G. Beck** 421
Einfluss des lumbalen Eröffnungsdrucks auf den postspinalen Kopfschmerz nach Sattelblockanästhesie
- L. Schulte-Uentrop · K. Heckel · S. Tank · A.E. Goetz · R. Kiefmann** 422
Erythrozyten induzieren mittels ATP ein Calciumsignal in kapillaren Endothelzellen der Rattenlunge nach linksatrialer Druckerhöhung
- A.P. Schwoerer · J. Kebernik · H. Ehmke · P. Friederich** 423
Subtypenspezifische Effekte von Droperidol in LQT1- und LQT2-In-vitro- und -In-silico-Modellen
- B. Sinner · O. Friedrich · Y. Zausig · M. Gruber · B.M. Graf** 424
Die Neurotoxizität von Midazolam bzw. Thiopental auf die Synaptogenese des unreifen Rattengehirns lässt sich über die Suppression neuronaler Ca^{2+} -Oszillationen erklären
- K.M. Strosing · S. Faller · A. Hoetzel** 425
Isofluran vermindert den Ventilator-induzierten Lungenschaden über den Phosphatidylinositol-3-Kinase/Akt (PI3K/Akt)-Signaltransduktionsweg
- J. Stumpner · S. Sommer · A. Redel · St. Sommer · J. Richl · N. Roewer · M. Lange** 426
Die ischämische Postkonditionierung gegen Myokardinfarkt: Bedeutung des Ca^{2+} -aktivierten Kalium-Kanals mit großer Leitfähigkeit (BK_{Ca})
- R. Timaru-Kast · C. Luh · K. Engelhard · C. Werner · S.C. Thal** 428
Einfluss des Alters auf den neuronalen Schaden nach experimentellem Schädel-Hirn-Trauma der Maus
- A. Tzabazis** 429
Stimulation und Blockade der Freisetzung von Calcitonin-gene-related peptide (CGRP) aus kutanen Nozizeptoren der Ratte und des Menschen
- A. Zarbock · H. Mueller · A. Stadtmann · H. Van Aken** 430
Die Bruton-Tyrosin-Kinase (Btk) reguliert die Selektin-vermittelte Integrinaktivierung und die Rekrutierung von Leukozyten

Ausschreibung des DGAI-Forschungsstipendiums der Fresenius-Stiftung

Die 25. Wissenschaftlichen Arbeitstage der Deutschen Gesellschaft für Anästhesiologie und Intensivmedizin (DGA) werden vom **26. - 27.02.2011** 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.

2011 wird das DGAI-Forschungsstipendium der Fresenius-Stiftung für eine hervorragende Forschungsarbeit mit 15.000 € dotiert. Grundlagenforschung und klinische Forschung sollen gleichermaßen gefördert werden.

Einsendeschluss:

06.01.2011

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

Hydrocortison reduziert das Überleben von TLR2-defizienten Mäusen in einem Modell der polymikrobiellen Sepsis

S. Bergt¹ · O. Boehm² · M. Heidrich¹ · P. Paulus³ · G. Nöldge-Schomburg¹ · B. Vollmar⁴ · K. Zacharowski³ · J. Roesner¹

- 1 Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie, Universität Rostock
- 2 Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin, Universität Bonn
- 3 Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie, Universität Frankfurt/M
- 4 Institut für Experimentelle Chirurgie, Universität Rostock

Korrespondenz: stefan@bergt.de

Fragestellung

Toll-like-Rezeptoren (TLR) spielen eine entscheidende Rolle in der Abwehr mikrobieller Infektionen. Polymorphismen von TLR2 kommen in 10–12 % der Bevölkerung vor. Funktionelle TLR2-Defekte sind mit einer gesteigerten Anfälligkeit für septische Komplikationen durch grampositive Bakterien, Viren und Pilze assoziiert [1]. Zusätzlich gibt es Hinweise darauf, dass eine TLR2-Defizienz mit einer relativen Nebenniereninsuffizienz assoziiert ist [2]. Die Wertigkeit einer Therapie von Patienten mit schwerer Sepsis und septischem Schock mit Hydrocortison wurde kürzlich durch die CORTICUS-Studie wieder in Frage gestellt [3]. Wir prüften die Hypothese, ob TLR2-defiziente Mäuse unter den Bedingungen einer polymikrobiellen Sepsis von einer Therapie mit Hydrocortison profitieren.

Methodik

Nach behördlicher Genehmigung schlossen wir insgesamt 120 männliche C57BL/6J-Mäuse (WT) und 120 männliche B6.129-Tlr^{2tm1Kir}/J-Mäuse (TLR2^{-/-}) in die Versuche ein. Die Tiere wurden in jeweils 4 Gruppen (je 2 mit Sham-Op bzw. 2 mit Sepsis) eingeteilt. Den TLR2-Status unserer Versuchstiere überprüften wir durch PCR-Analyse. Zur Induktion der Sepsis nutzten wir die Technik der Zökum-Ligatur und Punktion (CLP). Die Tiere wurden randomisiert entweder der Kochsalz- oder der Hydrocortisontherapie zugeordnet. 6 h nach Induktion der Sepsis erhielten die Tiere 5 mg/

kg Hydrocortison oder ein äquivalentes Volumen NaCl 0,9% (0,25 ml) intravenös. Die Injektion wurde alle 12 h wiederholt. Während der 48-stündigen Beobachtungszeit wurde das Überleben der Tiere überwacht und dokumentiert. Von je 10 Tieren einer Gruppe wurde nach einer 24-stündigen Beobachtungszeit das Blutbild analysiert sowie die Konzentrationen von Corticosteron, IL 1 β und IL 6 im Plasma mittels ELISA bestimmt. Ergebnisse sind als MW $\pm$ SEM bzw. als Median [25 - 75 Percentile] dargestellt. Statistik: Kolmogorov-Smirnov-Test; Student's t-Test; Mann-Whitney-Rangsummentest; statistische Signifikanz bei $p < 0,05$.

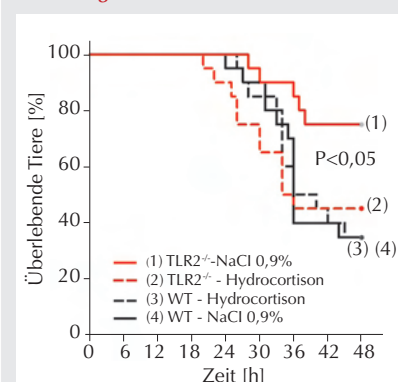
Ergebnisse

Unter Kontrollbedingungen (Sham-OP) zeigten die WT-Mäuse, nicht aber die TLR2^{-/-}-Tiere nach Gabe von Hydrocortison eine ausgeprägte Lymphozytopenie ($4,5 \pm 0,3$ vs. $1,5 \pm 0,2 \cdot 10^9/L$; $p < 0,05$). Hinsichtlich der Plasmaspiegel für IL-1 β und IL-6 gab es keine Unterschiede zwischen den Kontrollgruppen. Im Vergleich zu den WT-Tieren führte die intraperitoneale Injektion von Lipoteichonsäure, einem spezifischen Liganden des TLR2, bei den TLR2^{-/-}-Tieren zu einer signifikant geringeren Freisetzung von Corticosteron (834 vs. 513 nmol/l; $p < 0,05$). 24 Stunden nach Induktion der Sepsis gab es keinen Unterschied in der Plasmakonzentration des Corticosterons zwischen den Versuchsgruppen. Zudem wiesen die TLR2^{-/-}-Tiere gegenüber den WT-Mäusen signifikant höhere Werte für IL-6 (3594 [3115 6798] vs. 2575 [1139 4183] pg/ml; $p < 0,05$) und niedrigere Plasmaspiegel für IL 1 β ($2,7$ [2,0-3,7] vs. $5,3$ [4,2 10,3] pg/ml; $p < 0,05$) auf. Dies war mit einem deutlich besseren Überleben der TLR2^{-/-}-Tiere im Vergleich zu den WT-Tieren assoziiert (75 vs. 35 %; $p < 0,05$). Dieser Überlebensvorteil der TLR2^{-/-}-Mäuse wurde durch die Therapie mit Hydrocortison dramatisch auf das Niveau der WT-Tiere reduziert (45 % vs. 35 %; Abb. 1). Der Effekt von Hydrocortison auf die TLR2^{-/-}-Tiere war mit einer signifikanten Reduktion von IL-6 verbunden (3594 [3315 6798] vs. 1685 [1434 3059] pg/ml; $p < 0,05$).

Interpretation

Die vorliegende Untersuchung widerlegt die Hypothese, dass eine TLR2-Defizienz unter

Abbildung 1



Überlebenszeit der Tiere innerhalb von 48 h nach Induktion der Sepsis.

den Bedingungen einer schweren polymikrobiellen Sepsis mit einer relativen NNR-Insuffizienz einhergeht. Die Defizienz von TLR2, aber auch die schwere Sepsis, scheinen zu einer Störung der Rückkopplung innerhalb der Hypothalamus-Hypophysen-NNR-Achse zu führen. Diese Befunde waren mit einem erhöhten Plasmaspiegel des Zytokins IL-6 assoziiert. In Übereinstimmung mit der Klinik hatte Hydrocortison keinen Einfluss auf das Überleben der WT-Mäuse. Im Gegensatz dazu beeinflusste Hydrocortison den benefiziellen Effekt der TLR2-Defizienz auf das Überleben der Versuchstiere. Es bleibt zu überprüfen, ob der TLR2-Status von septischen Patienten vor einer geplanten Hydrocortisontherapie diagnostiziert werden sollte, um negative Auswirkungen dieser Therapie zu vermeiden.

Literatur

1. Texereau J, Chiche JD, Taylor W. The importance of Toll-like receptor 2 polymorphisms in severe infections. Clin Infect Dis 2005;41(Suppl 7):408-415.
2. Bornstein S, Zacharowski P, Schumann R. Impaired adrenal stress response in Toll-like receptor 2-deficient mice. Proc Natl Acad Sci U S A 2004;101:16695-16700.
3. Sprung CL, Annane D, Keh D. Hydrocortisone therapy for patients with septic shock. N Engl J Med 2008;358:111-124.

Ischämische Fernpräkonditionierung des Herzens und frühe myokardiale Ischämie reduzieren die Expression der microRNA-1 in der Ratte

T. Brandenburger · H. Grievink · N. Heinen · B. Pannen · H. Hermanns · I. Bauer

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

Korrespondenz:

timo.brandenburger@med.uni-duesseldorf.de

Fragestellung

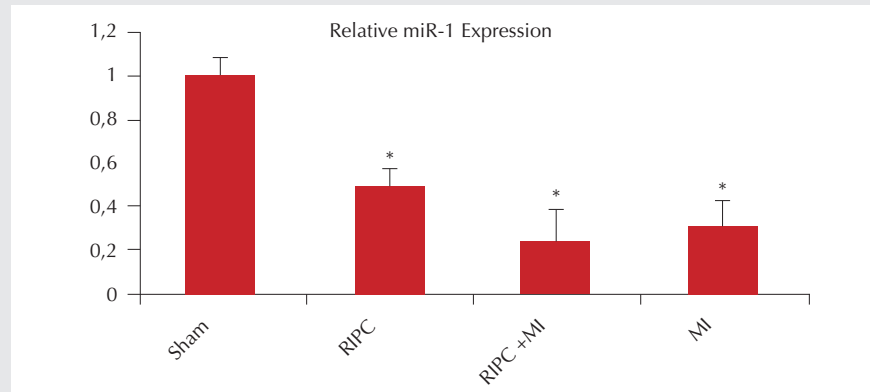
Die ischämische Fernpräkonditionierung des Herzens (Remote Ischemic Preconditioning, RIPC) durch periphere Ischämie einer Extremität mittels Tourniquet verringert den Ischämie-Reperfusionsschaden des Herzgewebes. Die molekularen Mechanismen dieser Protektion durch RIPC sind weitgehend unbekannt. MicroRNAs (miRs) sind kleine nicht-kodierende RNA-Moleküle, die die Repression oder Degradation von Ziel-mRNAs regulieren. Die quantitativ wichtigste miR des Herzens ist mit etwa 40 % aller miRs die miR-1 [1].

Es war Ziel der vorliegenden Untersuchung, die Frage zu beantworten, ob die Expression der miR-1 durch RIPC und myokardiale Ischämie beeinflusst wird, und potentielle Ziel-mRNAs der miR-1 zu identifizieren.

Methodik

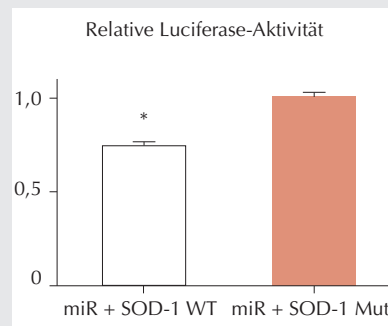
Nach Genehmigung durch das zuständige Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz wurden männliche Wistar-Ratten in 4 Gruppen eingeteilt. Gruppe 1 erhielt eine Scheinoperation (Sham), Gruppe 2 erhielt 4 Zyklen einer RIPC durch jeweils 5-minütige Ischämie beider Hinterläufe ohne nachfolgende Ischämie (RIPC), bei Gruppe 3 schloss sich eine 30-minütige Ischämie durch Okklusion der linken Koronararterie an, gefolgt von einer zweistündigen Reperusionsphase (RIPC+MI). Gruppe 4 erhielt eine Ischämie ohne vorhergehende RIPC (MI). Die relative miR-Expression im Herzgewebe wurde mit qPCR-basierten miR-Arrays analysiert. Signifikante Veränderungen der miR-1-Expression wurden durch qPCR-miR-Assays verifiziert. Diese Daten sind als Mittelwerte±Standardabweichung dargestellt und wurden nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode mit anschließendem One-way-ANOVA und ungepaartem Student's T-Test analysiert. Potentielle Ziel-mRNAs der miR-1 wurden mittels TargetScan (www.targetscan.org) ermittelt. Eine Interaktion der miR-1 mit der potentiellen Ziel-mRNA wurde durch einen spezifischen Luciferase-Reporter-Assay an HEK293-Zellen untersucht.

Abbildung 1



Im Vergleich zur Sham-Gruppe ist die Expression der miR-1 sowohl nach RIPC als auch nach RIPC mit nachfolgendem Infarkt als auch nach Infarkt ohne vorangegangene RIPC reduziert. (MW±SD, je n=6, * p < 0,05 vs. Sham).

Abbildung 2



Luciferase-Assay zum Nachweis einer Interaktion zwischen miR-1 und SOD-1 3'-UTR. Links: Die relative Luciferase-Aktivität nimmt durch Kotransfektion von miR-1 und SOD-1 3'-UTR im Vergleich zu einer Kotransfektion mit einer mutierten SOD-1 3'-UTR (rechts) ab. Eingesetzt wurden jeweils 10 µg miR-1-Vektor und 0,5 µg Luciferase-Vektor.

Ergebnisse

Verglichen mit scheinoperierten Tieren waren 20 miRs nach RIPC und 25 miRs nach RIPC+MI differentiell exprimiert, hierunter auch die miR-1. Im Vergleich zur Sham-Gruppe war die Expression der miR-1 in allen Interventionsgruppen reduziert (Abb. 1). Als Zielgen mit potentieller funktioneller Relevanz wurde die Superoxiddismutase-1 (SOD-1) im TargetScan identifiziert. Zum Nachweis einer Interaktion zwischen SOD-1 und miR-1 wurde die miR-1-Bindungssequenz im Bereich der 3'-UTR des SOD-1-Gens (SOD-1 WT) sowie eine Mutante dieser Sequenz (SOD-1 Mut) in einen Luciferase-Expressionsvektor kloniert. Gleichzeitig erfolgte eine Kotransfektion mit einem miR-1-Transfektionsvektor. Im

Vergleich zur mutierten SOD-1 3'-UTR zeigte sich bei Kotransfektion von miR-1 und SOD-1 WT eine Abnahme der relativen Luciferase-Aktivität (Abb. 2). Als Referenz wurde ein β -Galaktosidase-Vektor eingesetzt.

Interpretation

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen erstmals, dass die Expression der miR-1 durch RIPC im Myokard der Ratte signifikant reduziert wird. Das Ausmaß der Reduktion der miR-1-Expression nach RIPC alleine unterscheidet sich zu diesem Zeitpunkt nicht signifikant von der Reduktion nach MI oder RIPC+MI. In der Literatur finden sich erste Hinweise für eine frühe Reduktion der kardialen miR-1-Spiegel nach Infarkt [2], wohingegen nach Tagen bis Wochen post MI die miR-1 hochreguliert ist [3]. Unsere Daten können daher als weiterer Hinweis auf den dynamischen Verlauf der miR-1-Regulation im Herzen gedeutet werden. Darüber hinaus konnten wir die SOD-1 als potentielles Zielgen für die Vermittlung miR-1-abhängiger kardioprotektiver Effekte identifizieren.

Literatur

1. Rao PK, Toyama Y, Chiang HR, Gupta S, Bauer M, Medvid R, Reinhardt F, Liao R, Krieger M, Jaenisch R, et al. Loss of Cardiac microRNA-Mediated Regulation Leads to Dilated Cardiomyopathy and Heart Failure. *Circ Res* 2009;105(6):585-594.
2. Bostjancic E, Zidar N, Stajer D, Glavac D. MicroRNAs miR-1, miR-133a, miR-133b and miR-208 Are Dysregulated in Human Myocardial Infarction. *Cardiology* 2009;115(3):163-169.
3. Shan ZX, Lin QX, Fu YH, Deng CY, Zhou ZL, Zhu JN, Liu XY, Zhang YY, Li Y, Lin SG, et al. Upregulated expression of miR-1/miR-206 in a rat model of myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;381(4):597-601.

Hydroxyethylstärke induziert konzentrationsabhängig Apoptose und hemmt die Proliferation in einem Nierenzellmodell

S. Dömming¹ · R.A. Claus² · G. Wolf³ · T. Schürholz¹ · G. Marx¹

- 1 Klinik für Operative Intensivmedizin, Universitätsklinikum Aachen, RWTH Aachen
- 2 Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin, Universitätsklinikum Aachen, RWTH Aachen
- 3 Klinik für Innere Medizin III, Universitätsklinikum Jena, Universität Jena

Korrespondenz: SDömming@ukaachen.de

Fragestellung

Volumenersatztherapie mit hyperonkotischer Hydroxyethylstärke (HES) ist bei septischen Patienten mit Nierendysfunktion assoziiert [1]. In einem isolierten Ex-vivo-Nierenperfusionmodell konnte gezeigt werden, dass eine 10 % HES 200/0,5 im Gegensatz zu einer 6 % HES 130/0,42 eine vermehrte Proinflammation induziert und zu einem stärkeren tubulären Schaden führt [2].

In einem murinen Nierenzellmodell sollte untersucht werden, ob die Gabe von unterschiedlichen HES-Lösungen zu einer Beeinträchtigung der Proliferation oder zu einer vermehrten Apoptose von Nierenzellen führt.

Methodik

Proximale Tubuluszellen der Maus (mouse tubulus cells, MTC) und murine Podozyten wurden mit 10 % HES 200/0,5 in 0,9 % Natriumchlorid (NaCl; Hemohes 10 %, BBraun, Melsungen) oder 6 % HES 130/0,42 in 0,9 % NaCl (Venofundin 6 %, BBraun, Melsungen) über 12 Stunden in einem Nährmedium (Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), GlutaMax und fetales Kälberserum (FKS)) inkubiert. Dabei wurde für beide Lösungen eine HES 40- (n=6), eine HES 80- (n=6) und eine HES 90-Gruppe (n=6) gebildet. Dazu wurde eine 40 %, eine 80 % und eine 90 % Konzen-

tration an HES basierend auf den Stammlösungen, die als 100 % angesehen wurden, hergestellt. Bei Einsatz der 10 % HES 200/0,5 ergab sich in der HES 40-Gruppe eine Menge von 40 mg/ml, in der HES 80 von 80 mg/ml und in der HES 90 von 90 mg/ml. Bei Verwendung der 6 % HES 130/0,42 wurde HES in der Menge 24 mg/ml in der HES 40-Gruppe, 48 mg/ml in der HES 80 und 54 mg/ml in der HES 90-Gruppe eingesetzt. Als Kontrolle wurden Zellen mit Nährmedium verwendet (n=6). Die Fähigkeit der Zellen zur Proliferation wurde mithilfe eines MTT-Assays untersucht, bei dem nur metabolisch aktive Zellen in der Lage sind, das gelbe Tetrazoliumsaz (MTT) zu violetten Kristalle spalten. Das Ausmaß der Färbänderung kann photometrisch zwischen 550 und 600 nm bestimmt werden. Für die Beurteilung der Apoptose wurde ein Caspase-3-Assay durchgeführt, bei dem es durch einen enzymatischen Abbau zum Auftreten von fluoreszierendem Rhodamin kam, falls aktivierte Caspase-3 vorhanden war. Die Ergebnisse wurden als prozentuale Abweichung zur Kontrollgruppe analysiert und mit einer 1-way-ANOVA mit Dunnett t-Test für multiple Vergleiche oder einem T-Test bei Vorliegen einer Normalverteilung untersucht. $p < 0,05$ wurde als signifikant angesehen.

Ergebnisse

Erst der Zusatz von 90 mg/ml HES 200/0,5 reduziert die Proliferation der MTC signifikant (39 ± 8 %; $p < 0,001$). Podozyten wurden durch den Zusatz von 80 mg/ml HES 200/0,5 um 39 ± 5 % ($p < 0,001$) und durch 90 mg/ml um 51 ± 3 % ($p < 0,001$) im Vergleich zur Kontrollgruppe gehemmt. Die Zugabe von HES 130/0,42 reduzierte in der HES 90-Gruppe die Proliferation bei MTC um 34 ± 13 % ($p < 0,001$). Die Podozyten waren in allen drei HES-Konzentrationen durch HES 130/0,42 gehemmt (HES 40: 7 ± 8 %, $p = 0,039$; HES 80: 27 ± 4 %, $p < 0,001$; HES 90: 44 ± 4 %, $p < 0,001$).

Die Proliferationsfähigkeit der Podozyten war durch Inkubation mit HES 200/0,5 signifikant

stärker in der HES 80-Gruppe ($p = 0,012$) und in der HES 90-Gruppe ($p = 0,017$) im Vergleich zu HES 130/0,42 gehemmt.

Die Apoptose der Tubuluszellen wurde durch HES 200/0,5 erst bei 90 mg/ml signifikant erhöht (286 ± 145 %; $p = 0,002$). Geringere Mengen an HES 200/0,5 führten zu einer nicht signifikanten Steigerung der Apoptose (HES 40: 25 ± 85 %; HES 80: 148 ± 100 %).

Podozyten wiesen unter Zugabe von HES 200/0,5 in der HES 80-Gruppe eine Steigerung um 108 ± 44 % ($p = 0,026$) auf und für HES 90 eine Steigerung um 211 ± 95 % ($p < 0,001$). HES 130/0,42 steigerte die Apoptoserate nicht signifikant in den Zellkulturen sowohl von MTC (HES 40: 59 ± 85 %; HES 80: 160 ± 75 %; HES 90: 8 ± 46 %) als auch von Podozyten (HES 40: 37 ± 24 %; HES 80: 173 ± 99 %; HES 90: 46 ± 40 %). Die Apoptose war signifikant niedriger bei Inkubation in der HES 90-Gruppe mit HES 130/0,42 im Vergleich zur HES 200/0,5 sowohl bei Podozyten ($p = 0,006$) als auch bei Tubuluszellen ($p = 0,036$).

Interpretation

In murinen Tubuluszellen und Podozyten wurde konzentrationsabhängig durch HES die Proliferation beeinträchtigt und Apoptose induziert. In höheren Dosierungen wurde durch HES 200/0,5 im Vergleich zu HES 130/0,42 eine signifikant zunehmende Apoptose und gesteigerte Proliferationshemmung induziert.

Literatur

1. Brunkhorst FM, Engel C, Bloos F, Meier-Hellmann A, Ragaller M, Weiler N, et al. Intensive insulin therapy and pentastarch resuscitation in severe sepsis. *New Engl J Med* 2008;358:125-139.
2. Huter L, Simon TP, Weinmann L, Schuerholz T, Reinhart K, Wolf G, et al. Hydroxyethylstarch impairs renal function and induces interstitial proliferation, macrophage infiltration and tubular damage in an isolated renal perfusion model. *Crit Care* 2009;13:R23.

Diazepam induziert eine biphasische Hemmung der kortikalen Netzwerkaktivität in C57BL/6-Mäusen

B. Drexler · S. Zinser · H. Hentschke · B. Antkowiak

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

Korrespondenz:

berthold.drexler@uni-tuebingen.de

Fragestellung

Benzodiazepine zeichnen sich durch eine große therapeutische Breite aus. Sie werden in der Anästhesie zur Anxiolyse, Sedierung und Narkoseeinleitung verwendet. Benzodiazepine modulieren GABA_A-Rezeptoren, wodurch die Erregbarkeit zentralnervöser Neurone vermindert wird. In der vorliegenden Studie wird die Hypothese getestet, dass den klinisch bedeutsamen Wirkungen von Diazepam verschiedene molekulare Wirkmechanismen zugrunde liegen.

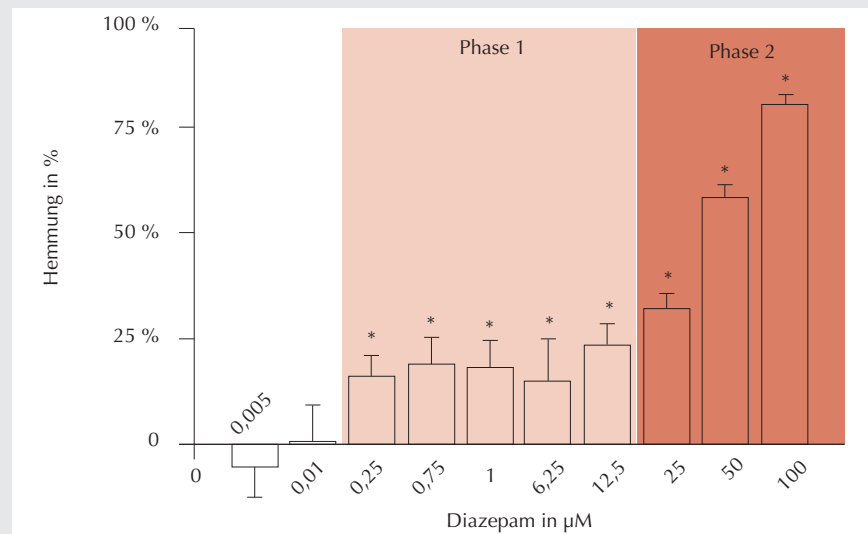
Methodik

Die Organentnahme wurde dem zuständigen Regierungspräsidium angezeigt. Gewebeschnitte aus dem Neokortex von Mäusen (postnataler Tag 2-4) wurden kultiviert. Das nach zwei Wochen weitgehend ausgereifte neuronale Netzwerk zeigte spontane elektrische Aktivität, welche mittels extrazellulärer Elektroden registriert wurde. Die Rate an Aktionspotenzialen diente als Maß für den Erregungszustand des neuronalen Netzwerkes. Zunächst wurden die Effekte von Diazepam über einen weiten Konzentrationsbereich ermittelt. Im Folgenden wurde die Frage untersucht, inwiefern der Benzodiazepin-Antagonist Flumazenil die Wirkung von Diazepam zu unterdrücken vermag. Die Wirkung von Diazepam wurde als Hemmung bezogen auf die Grundaktivität in Prozent erfasst. Als statistisches Maß wurde der t-test verwendet.

Ergebnisse

Die Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von Diazepam zeigte einen biphasischen Verlauf. Über einen weiten Bereich von 250 μ M bis 12,5 μ M dämpfte Diazepam die kortikale Aktivität um ungefähr 20 % ($n \geq 12$, $p < 0,05$; EC₅₀ 19,6 $\pm$ 8,4 μ M, Phase 1). Bei höheren Konzentrationen erfolgte eine weitere, konzentrationsabhängige Hemmung der neuro-

Abbildung 1



Biphasische Hemmung der kortikalen Netzwerkaktivität durch Diazepam. In Phase 1 erfolgt über einen weiten Konzentrationsbereich nur eine geringe Hemmung von ca. 20 % (* $p < 0,05$). Erst darüber hinaus zeigt sich eine ausgeprägte, konzentrationsabhängige Hemmung (Phase 2), wie sie für intravenöse und volatile Anästhetika in diesem Modellsystem typisch ist [2].

nen Aktivität ($n \geq 17$, Phase 2). Die Wirkung einer niedrigen Konzentration (250 μ M) Diazepam war in Gegenwart von Flumazenil (250 μ M, $n = 24$) aufgehoben, wohingegen die Wirkung einer hohen Konzentration Diazepam (25 μ M) von Flumazenil (25 μ M, $n = 16$) nicht beeinflusst wurde.

Interpretation

Kortikale GABA_A-Rezeptoren sind maßgebliche Zielstrukturen für die sedierende und hypnotische Wirkung von Benzodiazepinen [1]. In Konzentrationen, welche Bewusstlosigkeit induzieren, unterdrücken intravenöse und volatile Anästhetika die Aktivität kortikaler Neurone [2]. In der vorliegenden Untersuchung wurde eine entsprechende Wirkung von Diazepam im mikromolaren Konzentrationsbereich beobachtet. Hiervon unterscheiden lässt sich eine nanomolare Wirkkomponente, die durch eine moderate Hemmung der neuronalen Aktivität gekennzeichnet ist und in diesem Konzentrationsbereich keine Dosisabhängigkeit zeigt. Diese nanomolare, nicht aber die mikromolare Wirkkomponente wird durch Flumazenil antagonisiert. Diese Befunde implizieren die Existenz von zwei

unterschiedlichen molekularen Wirkorten von Diazepam am GABA_A-Rezeptor. Diese Schlussfolgerung wird durch Untersuchungen an exprimierten GABA_A-Rezeptoren gestützt [3]. Beide Bindungsstellen sind möglicherweise von klinischer Bedeutung. Während die nanomolare Wirkkomponente wahrscheinlich für die anxiolytischen und sedierenden Eigenschaften von Benzodiazepinen ursächlich ist, könnte die mikromolare Komponente den anästhesierelevanten Wirkungen von Benzodiazepinen wie Hypnose und Dämpfung motorischer Reflexe zugrunde liegen.

Literatur

1. Zeller A, Crestani F, Camenisch I, Iwasato T, Itohara S, Fritschy JM, Rudolph U. Cortical glutamatergic neurons mediate the motor sedative action of diazepam. *Molec Pharmacol* 2008;73:282-291.
2. Antkowiak B. Different actions of general anaesthetics on the firing patterns of neocortical neurons mediated by the GABA(A) receptor. *Anesthesiology* 1999;91:500-511.
3. Walters RJ, Hadley SH, Morris KD, Amin J. Benzodiazepines act on GABA(A) receptors via two distinct and separable mechanisms. *Nat Neurosci* 2000;3:1274-1281.

Einfluss veränderter Sialylierung auf das Gating-Verhalten von spannungsgesteuerten Natriumkanälen

N. Foadi¹ · A. Eberhardt¹ · J. de la Roche¹ · V. Buchholz¹ · K. Krampff² · R. Dengler² · M. Mühlenhoff³ · R. Gerardy-Schahn³ · G. Haeseler⁴ · M. Leuwer⁵ · J. Ahrens¹

- 1 Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin, Medizinische Hochschule Hannover
- 2 Neurologie und Klinische Neurophysiologie, Medizinische Hochschule Hannover
- 3 Institut für Zelluläre Chemie, Medizinische Hochschule Hannover
- 4 Klinik für Anästhesie und Intensivmedizin, St. Elisabeth Krankenhaus, Dorsten
- 5 Department of Anaesthesia, University of Liverpool, U.K.

Korrespondenz: Foadi.Nilufar@mh-hannover.de

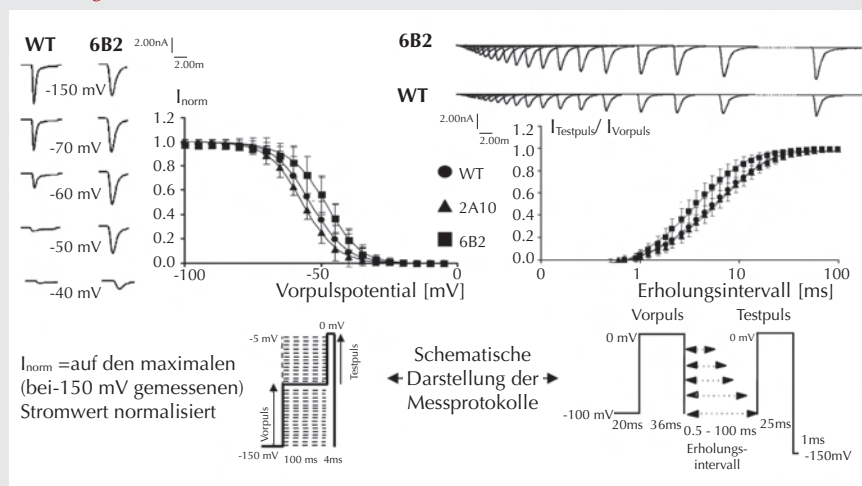
Fragestellung

Sialinsäure beeinflusst durch ihre negative Ladung das elektrische Feld nahe des Spannungssensors des Natriumkanals. In einem Rattenmodell des neuropathischen Schmerzes konnte gezeigt werden, dass eine Entfernung der Sialinsäure ektope Erregungen verringert[1]. Diese Studie hat zum Ziel, den Einfluss des kompletten Fehlens von Sialinsäure oder Polysialinsäure, einem großen, negativ geladenen Homopolymer[2], auf die Gatingprozesse des Natriumkanals getrennt in vitro zu untersuchen.

Methodik

Die α -Untereinheit des skelettmuskulären Natriumkanals NaV1.4 wurde transient in Chinese-Hamster-Ovary (CHO)-Zellen transfiziert. Untersucht wurden Zelllinien mit unveränderter Sialinsäurebildung (Wildtyp, WT) sowie fehlender Sialinsäure. Dabei wurde zum einen eine Zelllinie mit fehlender Polysialyltransferase IV analysiert (im folgenden 2A10 genannt), bei der der Prozess der Bildung von Polysialinsäure bei sonst intakter Sialinsäure gestört war. Zum anderen wurde eine Zelllinie mit fehlendem CMP-Sialinsäure-Transporter und damit komplett fehlender Sialinsäure (Zelllinie 6B2) untersucht. Nach Depolarisation der Membran wurden Natrium-Einwärtsströme mittels der Patch-Clamp-Technik in der „Whole-Cell“-Konfiguration gemessen. Analysiert wurde die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung, der schnellen Inaktivierung sowie der Einfluss auf die Erholung von der schnellen Inaktivierung.

Abbildung 1



Linke Seite: Kurven der Spannungsabhängigkeit der schnellen Inaktivierung, gemessen mittels eines Doppel-Puls-Protokolls: Repräsentative Spuren (links) zeigen die höhere Kanalverfügbarkeit bei der Zelllinie mit komplett fehlender Sialinsäure (6B2) im Vergleich zum Wildtyp (WT).

Rechte Seite: Erholung von der schnellen Inaktivierung bei einem Membranpotential von -70 mV. Der auf den beim Vorpuls verfügbaren Strom normalisierte Teststromwert (Ordinate) ist gegenüber der Erholungszeit zwischen Vor- und Testpuls auf einer logarithmischen Skala (Abszisse) für jeweils 38 (Zelllinie WT), 51 (Zelllinie 2A10) und 32 (Zelllinie 6B2) Experimente dargestellt. Das Zeitintervall zwischen Vor- und Testpuls variierte von 0,5 bis 100 ms.

Ergebnisse

Die gestörte Sialinsäurebildung beeinflusste die erfolgreiche Expression der α -Untereinheit des Natriumkanals nicht. Form und Amplitudengröße der makroskopischen Natriumeinwärtsströme blieben unverändert. Bei komplett fehlender Sialinsäurebildung (6B2-Zelllinie) lagen die Wendepunkte bei der spannungsabhängigen Aktivierung ($V_{0,5}$ -17 $\pm$ 5 mV; $p=0,003$; $n=44$) und Inaktivierung ($V_{0,5}$ -49 $\pm$ 6 mV; $p=0,0003$; $n=32$) bei positiven Werten im Vergleich zum Wildtyp ($V_{0,5}$ ak -20 $\pm$ 5 mV; $n=52$; $V_{0,5}$ inak -54 $\pm$ 4 mV; $n=36$). Die Erholung von der schnellen Inaktivierung (Recovery) war bei dieser Zelllinie bei einem Haltepotential von -70 mV im Vergleich zum Wildtyp beschleunigt (τ_{rec} 4,5 $\pm$ 1,4 ms; $n=32$; wt τ_{rec} 7,4 $\pm$ 2,5 ms; $n=38$; $p<0,0001$). Bei der Zelllinie mit defekter Bildung von Polysialinsäure (2A10) lagen die Wendepunkte für Aktivierung ($V_{0,5}$ -26 $\pm$ 7 mV; $p<0,00001$; $n=42$) und Inaktivierung ($V_{0,5}$ -57 $\pm$ 3 mV; $p=0,0002$; $n=50$) entgegengesetzt bei negativeren Werten im Vergleich zum Wildtyp.

Interpretation

Die vorliegende Studie zeigt, dass eine komplette Unterbrechung der Sialinsäurebildung oder eine gestörte Bildung des Polymers Polysialinsäure unabhängig voneinander die Gatingeigenschaften spannungsgesteuerter Natriumkanäle verändern. Angesichts der Rolle von veränderten Feuermustern des Natriumkanals in pathologischen Zuständen wie dem neuropathischen Schmerz könnte eine Modifikation der Sialinsäuresynthese und -expression ein mögliches therapeutisches Mittel zur Beeinflussung pathologisch veränderter Membranerregbarkeit darstellen.

Literatur

1. Zhang X-L, Peng X-Q, Jing Y-L, et al. Sialic acid contributes to generation of ectopic spontaneous discharges in rats with neuropathic pain. *Neurosci Lett* 2003;346(1-2):65-68.
2. Windfuhr M, Manegold A, Mühlenhoff M, et al. Molecular defects that cause loss of polysialic acid in the complementation group 2A10. *J Biol Chem* 2000;275(42):32861-32870.

Genetische Interaktionen im β -adrenergen Signalweg und Einjahres-Überleben nach aortokoronarer Bypass-Operation: eine Pilot-Studie

U.H. Frey¹ · E. Kottenberg¹ · H. Jakob² · W. Siffert³ · J. Peters¹

- 1 Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin, Universitätsklinikum Essen, Universität Duisburg-Essen
- 2 Klinik für Thorax- und kardiovaskuläre Chirurgie, Universitätsklinikum Essen, Universität Duisburg-Essen
- 3 Institut für Pharmakogenetik, Universitätsklinikum Essen, Universität Duisburg-Essen

Korrespondenz: Ulrich.Frey@uk-essen.de

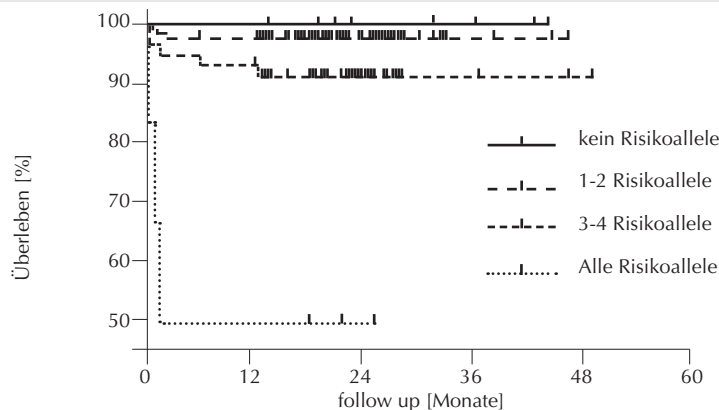
Fragestellung

Das β -adrenerge Signaltransduktionssystem ist zentraler Regulator kardiovaskulärer Funktionen. Stimulation von β -Adrenorezeptoren (β AR) führt zu Aktivierung des $G_{\alpha s}$ -Proteins mit konsekutiver Steigerung von Inotropie und Chronotropie, ihre anhaltende Stimulation jedoch führt zur Rezeptor-Desensibilisierung. Therapiekonzept bei Herzinsuffizienz ist daher eine β -Adrenorezeptor-Blockade. Polymorphismen in β -Adrenorezeptorgenen (*ADRB*) in Bezug auf individuellen therapeutischen Erfolg einer β AR-Blockade wurden vielfältig untersucht, indes mit widersprüchlichen Ergebnissen [1]. Wir identifizierten im humanen *G_{\alpha s}*-Gen (*GNAS*) einen Haplotypen und zeigten, dass vermehrte *G_{\alpha s}*-Expression zu Steigerung der β -adrenergen Signaltransduktion sowie verbesserter kardialer Funktion führt [2]. Im Blick auf die gesamte Signalkette prüften wir nun die Thesen, dass „haplotype tagging“ Single-Nucleotide-Polymorphismen (htSNP) a) molekularbiologisch allel-spezifisch aktiv sind, b) Überleben nach aortokoronarer Bypass (ACVB)-Operation beeinflussen und c) eine Interaktion mit *ADRB*-SNPs zeigen und somit widersprüchliche Ergebnisse erklären.

Methodik

Das *GNAS*-Intron-1 wurde nach Amplifizierung mittels „Slowdown“-PCR sequenziert [3] und die Reporter-Aktivität nach Klonierung des Introns-1 mit dem alkalischen Phosphatase-Reporter-Assay (pSEAP) in HEK-293-Zellen bestimmt. Haplotypen wurden mit der Software HaploView bestimmt. Für Western-Blot-Experimente wurden humane Erythrozyten-Zellmembranen von 31 gesunden Probanden präpariert. Electrophoretic mobility shift Assays (EMSA) wurden an nukleären Extrakten von HEK293- und HeLa-Zellen durchgeführt. Nach Zustimmung der Ethikkommission wurden prospektiv 185 Patienten unter chronischer β AR-Blockade eingeschlossen, die sich einer ACVB-Operation unterzogen. Follow-

Abbildung 1



Kaplan-Meier Kurve für Risikoallele

Tabelle 1

Multivariate Cox-Regression.

Gen	HR	95% CI	P-Wert
GNAS Diplotyp	3,9	1,6-9,8	0,003
ADRB2 Gly 16Arg	4,5	1,5-12,9	0,006
Risikoallele	7,9	2,6-23,3	0,0002

up-Daten wurden mittels Telefoninterview der Patienten und/oder deren Hausärzten erhoben. Statistik: Kontinuierliche Variablen wurden mittels ANOVA, kategoriale Variablen mittels χ^2 -Test verglichen, Überlebensanalysen erfolgten mittels Kaplan-Meier-plots und Log-rank-Test univariat bzw. multivariat (Cox-proportional-Hazard-Modell); $p < 0,05$.

Ergebnisse

Durch Resequenzierung des Intron-1 identifizierten wir einen htSNP, der einen neuen Haplotypen bildet (*GNAS* *2). *2-Reporter-Konstrukte zeigen eine im Vergleich zu *1- und *3-Konstrukten intermediäre Reporteraktivität, und EMSA-Experimente zeigten ein allel-spezifisches Bindungsverhalten der htSNPs. Unterschiede bei der Reporteraktivität in vitro wurden in vivo bestätigt: *3-Haplotypen zeigten eine erhöhte *G_{\alpha s}*-Proteinkonzentration, gefolgt von *2- und *1-Haplotypen ($p = 0,019$). Die Nachbeobachtungszeit der Patienten betrug 21 Monate (Median, Spanne: 0-50). 14 Patienten verstarben, wobei eine kardiale Ursache bei 3 ausgeschlossen werden konnte. Die kardial spezifische Einjahresletalität war diplotypabhängig und betrug: *3/*3: 0 %; *3/*3(*2): 3 %, *2/*2(*1): 8 %, *1/*1: 21 % ($p = 0,002$). Für *ADRB1*-SNPs konnte kein Effekt nachgewiesen werden, jedoch zeigten *ADRB2*-Arg16-Allelträger erhöhte Letalität im Vergleich zu Gly16-Trägern ($p = 0,008$). Aufgrund der direkten Signalweiterleitung von β -AR auf *G_{\alpha s}* testeten wir die Gen-Inter-

aktion, indem wir Risikoallele der einzelnen Gene zusammenfassten, und wiesen additive Effekte im β -adrenergen Signalweg nach ($p = 0,0002$, Abb. 1).

Interpretation

GNAS-htSNPs sind funktionell aktiv, führen zu einer Haplotyp-abhängigen *G_{\alpha s}*-Expression und sind mit Überleben nach ACVB assoziiert. Des Weiteren führt die kombinierte Analyse funktioneller Genvarianten im β -adrenergen Signalweg zu einer besseren Risikostratifizierung als die Analyse einzelner Gene. Unsere Ergebnisse beleuchten somit erstmals die genetische Interaktion zwischen β -AR und *G_{\alpha s}*, bieten eine mögliche Erklärung für zuvor widersprüchliche Daten von *ADRB*-SNPs-Effekten und mögen den therapeutischen Erfolg einer β AR-Blockade künftig besser vorhersagen.

Literatur

1. Brodde OE. Beta1- and beta2-adrenoceptor polymorphisms and cardiovascular diseases. *Fundam Clin Pharmacol* 2008;22:107-125.
2. Frey UH, Adamzik M, Kottenberg-Assenmacher E, et al. A novel functional haplotype in the human *GNAS* gene alters $G_{\alpha s}$ expression, responsiveness to beta-adrenoceptor stimulation, and peri-operative cardiac performance. *Eur Heart J* 2009;30:1402-1410.
3. Frey UH, Bachmann HS, Peters J, et al. PCR-amplification of GC-rich regions: „slowdown PCR“. *Nature Protoc* 2008;3:1312-1317.

Dobutamin wirkt in vitro zytoprotektiv durch eine Induktion der Hitzeschockantwort

C. Fröhlich¹ · F. Jans³ · T. Loop¹ · M. Rösslein²

- 1 Anästhesiologische Universitätsklinik, Universitätsklinikum Freiburg, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau
- 2 Klinik für Anästhesiologie, Ludwig-Maximilians-Universität München
- 3 Physiologisches Institut, Universität Hasselt, Diepenbeek, Belgien

Korrespondenz:

christian.froehlich@uniklinik-freiburg.de

Fragestellung

Die Stimulation von β -Adrenorezeptoren durch Agonisten wie Dobutamin führt am Herzen zu einer positiven Inotropie und Chronotropie und präkonditionierend an der Niere zu renoprotektiven Effekten [1]. Diese protektiven Effekte werden neben den verbesserten hämodynamischen Bedingungen auch über antiinflammatorische Wirkungen vermittelt, denen ursächlich eine Hemmung des Transkriptionsfaktors NF- κ B und damit der Expression proinflammatorischer Zytokine zugrunde liegt [2,3]. Da Inhibitoren von NF- κ B auch Induktoren der Hitzeschockantwort sein können, stellten wir die Hypothese auf, dass eine durch Dobutamin induzierte Hitzeschockantwort für die Zytoprotektion in vitro verantwortlich ist.

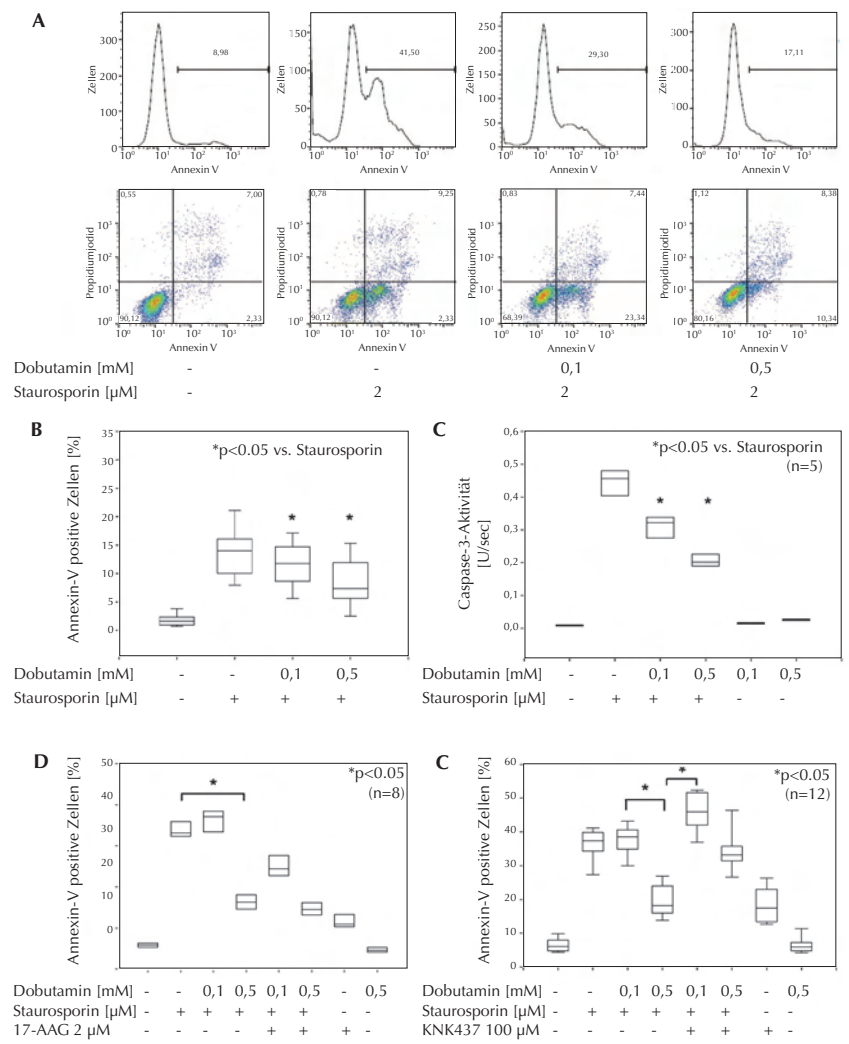
Methodik

Jurkat-T-Lymphomzellen (2×10^6 in 5 ml RPMI1640 + 10% FCS) wurden mit Dobutamin (100 bzw. 500 μ M, 4 h) inkubiert. Anschließend wurde die Apoptose mit Staurosporin (2 μ M, 2 h) induziert. Die Analyse der Apoptose erfolgte mittels Durchflußzytometrie nach Annexin-V-FITC-Färbung und durch Bestimmung der Caspase-3-Aktivität mittels flurogenem Substrat (Ac-DEVD-AMC). Die Hitzeschockantwort wurde jeweils nach Vorbehandlung mit KNK437, einem spezifischen Inhibitor des Hitzeschockproteins HSP70, und 17-AAG, einem spezifischen Inhibitor des Hitzeschockproteins HSP90, gehemmt. Die Messwerte wurden statistisch mittels Varianzanalyse (ANOVA und Student-Newman-Keuls-Test, Signifikanzniveau $p < 0,05$) verglichen.

Ergebnisse

Dobutamin reduzierte dosisabhängig die durch Staurosporin induzierte Apoptose und Caspase-3-Aktivität in Jurkat-T-Lymphomzellen (Abb. 1, A[n=1] + B[n=44] + C[n=5]).

Abbildung 1



Während die Vorinkubation mit 17-AAG den antiapoptotischen Effekt nicht aufheben konnte (Abb. 1, D [n=8]), führte eine Inkubation mit KNK437 zu einer nahezu vollständigen Aufhebung des antiapoptotischen Effekts von Dobutamin. (Abb. 1, E [n=12]).

Interpretation

Dobutamin besitzt antiapoptotische Wirkungen, die über eine Induktion der Hitzeschockantwort vermittelt werden und in vitro zytoprotektiv sind.

Dieses Forschungsprojekt wurde durch die European Society of Anaesthesiology (Research Grant 2007) unterstützt.

Literatur

1. Gottmann U, Brinkkoetter PT, Bechtler M, Hoeger S, Karle C, Schaub M, et al. Effect of pre-treatment with catecholamines on cold preservation and ischemia/reperfusion-injury in rats. *Kidney Int* 2006;70:321-328.
2. Loop T, Bross T, Humar M, Hoetzel A, Schmidt R, Pahl HL, et al. Dobutamine inhibits phorbol-myristate-acetate-induced activation of nuclear factor- κ B in human T lymphocytes in vitro. *Anesth Analg* 2004;99:1508-1515.
3. Newman WH, Castresana MR, Webb JG, Detmer K, Wang Z. Isoproterenol inhibits transcription of cardiac cytokine genes induced by reactive oxygen intermediates. *Anesthesiology* 2002;96:947-954.

Therapeutisch inhalativ appliziertes Kohlenmonoxid vermindert den Lungenschaden nach kardiopulmonalem Bypass im Schwein

U. Goebel¹ · M. Siepe² · C.I. Schwer¹ · C. Schlensak² · T. Loop¹

¹ Anästhesiologische Universitätsklinik, Universitätsklinikum Freiburg, Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg im Breisgau

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

Korrespondenz:

ulrich.goebel@uniklinik-freiburg.de

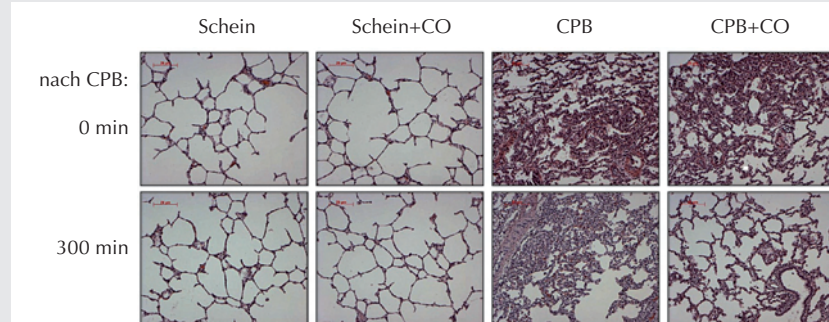
Fragestellung

Inhalatives Kohlenmonoxid (CO) vermittelt über antiinflammatorische und antiapoptotische Eigenschaften organprotektive Effekte [1,2]. Bei der präkonditionierenden Inhalation von CO wird der durch den kardiopulmonalen Bypass (CPB) induzierte Lungenschaden bei Schweinen durch eine Induktion der Hitzeschockantwort verhindert [3]. Die Hypothese dieser Untersuchung war, ob inhalatives CO therapeutisch nach einem CPB beim Schwein den Lungenschaden reduziert.

Methodik

Nach Genehmigung des Regierungspräsidiums wurden Schweine der Deutschen Landrasse (30±1,5 kg) mit Fentanyl und Propofol anästhesiert, mit Cis-Atracurium relaxiert, kontrolliert beatmet (FiO₂=0,5, PEEP=5 cm H₂O, V_T=8 ml/kg, f/min=14) und invasiv hämodynamisch überwacht (u.a. Swan-Ganz-Katheter). Die Tiere wurden prospektiv nach einer Poweranalyse in 4 Gruppen randomisiert: Scheinoperierte Tiere [Schein, n=5]; Scheinoperation und Inhalation von CO [250 ppm, 1 h] nach 2 h [Schein+CO, n=5]; Tiere mit jeweils kardiopulmonalem Bypass [CPB, n=10] und kardiopulmonalem Bypass und Inhalation von CO [250 ppm, 1 h] nach dem CPB [CPB+CO, n=10]. Die Tiere mit CPB wurden für 2 h an eine Herz-Lungenmaschine (Stöckert, München) angeschlossen. Die Tiere mit CO-Applikation inhalierten nach Beendigung des CPB (bzw. nach 2 h in der Schein-Gruppe) für eine Stunde 250 ppm CO. Die Beobachtungsdauer nach dem CPB betrug 5 h. Zu den Messzeitpunkten (vor CPB, 0, 60, 120, 180, 240 und 300 min nach dem CPB)

Abbildung 1



Hämatoxylin/Eosin-Färbung (40-fache Vergrößerung).

wurden Gewebeproben der Lunge und Blut zur Analyse entnommen. Die Expressionen von TNF- α , IL-6 und IL-10 und die Expression der Hitzeschockproteine HSP-70 und HSP-90 wurden mittels 'Enzyme linked immunosorbent assay' (ELISA) untersucht. Die Caspase-3-Aktivität wurde mit einem fluorigenen Caspase-Aktivitäts-Assay quantifiziert (Ac-DEVD-AMC-Substrat). Zur Darstellung pathologischer Veränderungen wurden histologische Präparate der Lunge angefertigt und mit Hämatoxylin-Eosin und immunhistochemisch mit Calprotectin, einem spezifischen Antikörper gegen Makrophagen, gefärbt. Die Ergebnisse wurden statistisch durch eine Varianzanalyse (ANOVA mit Post-hoc-Holm-Sidak-Test) verglichen (Signifikanzniveau $p < 0,05$; Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung).

Ergebnisse

Der CPB induzierte die pulmonale Expression von TNF- α und IL-6, welche durch die Inhalation von CO nach dem CPB signifikant reduziert wurde (300 min post CPB: 821±97 vs. 521±77 und 860±153 vs. 304±81 pg/ml; $p < 0,001$). Inhalatives CO induzierte nach dem CPB die pulmonale Expression von IL-10 und HSP-70 im Vergleich zu den scheineroperierten Tieren (300 min post CPB: 63±20 vs. 278±40 pg/ml und 36±9 vs. 79±14 ng/ml; $p < 0,001$). Die Proteinexpression von HSP-90 zeigte keine Unterschiede zwischen den Gruppen. Die Caspase-3-Aktivität wurde durch inhalatives CO nach dem CPB inhibiert, während bei den Tieren in der CPB-Gruppe die Aktivität weiter anstieg (300 min post CPB: 0,73±0,11

vs. 0,99±0,1; RFU; $p < 0,05$). Histologisch zeigten sich in der Lunge eine CO-abhängige Reduktion des Ödems und ein geringeres Ausmaß an Atelektasen (Abb. 1). Inhalatives CO reduzierte die Anzahl der eingewanderten Makrophagen nach dem CPB (145±34 vs. 78±39; $p < 0,001$).

Interpretation

Unsere Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass therapeutisch appliziertes, inhalatives CO nach einem CPB den Lungenschaden bei Schweinen reduziert. Diese therapeutischen Eigenschaften werden möglicherweise über die Induktion von HSP-70 vermittelt.

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

Literatur

1. Goebel U, et al. Carbon monoxide inhalation reduces pulmonary inflammatory response during cardiopulmonary bypass in pigs. *Anesthesiology* 2008;108(6):1025-1036.
2. Goebel U, et al. Reduced pulmonary inflammatory response during cardiopulmonary bypass: effects of combined pulmonary perfusion and carbon monoxide inhalation. *Eur J Cardiothorac Surg* 2008;34(6):1165-1172.
3. Goebel U, et al. Protective effects of inhaled carbon monoxide in pig lungs during cardiopulmonary bypass are mediated via an induction of the heat shock response. *Br J Anaesth* 2009;103(2):173-184.

Rolle der Phosphoinositol-3-Kinase- γ in der Pathogenese der Peritonitis-induzierten Sepsis – Untersuchungen am murinen Sepsismodell

F.A. Gonnert¹ · R. Bauer² · R.A. Claus¹ · R. Wetzker² · M. Bauer¹

1 Klinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie, Universitätsklinikum Jena

2 Institut für Molekulare Zellbiologie, Zentrum für molekulare Biomedizin, Friedrich-Schiller-Universität Jena

Korrespondenz: Falk.Gonnert@med.uni-jena.de

Fragestellung

Das intrazelluläre Multifunktions-Signalprotein Phosphoinositol-3-Kinase- γ (PI3K γ) gilt als entscheidender Regulator inflammatorischer Prozesse wie beispielsweise der Leukozytenaktivierung und -migration [1]. In Tiermodellen chronisch entzündlicher Erkrankungen konnte durch genetische und pharmakologische PI3K γ -Inhibition eine massive Verbesserung des Krankheitsverlaufes gezeigt werden [2].

Im Rahmen einer Peritonitis ist das Leukozytenrecruitment einerseits essentiell zur Fokussanierung, andererseits stellt die Invasion

hämatopoetischer Entzündungszellen des angeborenen Immunsystems mit konsekutiver (überschießender) Immunantwort einen wesentlichen pathogenetischen Faktor der Sepsis dar. Ziel des vorgestellten Projekts ist es daher, die Rolle der PI3K γ in der Pathogenese der Sepsis näher zu untersuchen.

Methodik

In PI3K γ -defizienten Mäusen und Wildtypen mit identischem Background (CL67/B6) sowie in mit einem spezifischen Inhibitor der PI3K γ (AS-605240) (vor-)behandelten Wildtypen erfolgte die Induktion einer polymikrobiellen Sepsis mittels Injektion einer mikrobiologisch charakterisierten, humanen Stuhlsuspension (Peritoneal Contamination and Infection-Sepsismodell). In den Versuchen mit pharmakologischer Inhibition erfolgte auch eine Antibiotikabehandlung der Tiere. Anschließend erfolgte eine Beobachtung des Krankheitsverlaufes der Tiere. Sechs Stunden nach Insult erfolgte in ko-Tieren die Bestimmung verschiedener Zytokine sowie der Nachweis der Phagozytoseaktivität asservierter Granulozyten und Makrophagen mittels durchflusszytometrischer Analyse (Multiplex Immuno Bead Assay, Phagotest). Die Leukozyten-Endothel-Interaktion wurde in der Leber mittels Intravitalmikroskopie bestimmt.

Ergebnisse

Eine PI3K γ -Deletion führte im Vergleich zu Wildtypen zu einer erhöhten Morbidität. Bei pharmakologischer Inhibition war der septische Verlauf zusätzlich mit einer erhöhten Mortalität assoziiert, die jedoch nicht statistisch signifikant war. Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interleukin-6 (IL-6), Interferon-gamma und das monozytäre chemotaktische Protein-1 (MCP-1) waren bei erkrankten Tieren mit genetischer PI3K γ -Deletion im Vergleich zu Wildtypen signifikant erhöht. Die Phagozytoseaktivität von Granulozyten und Monozyten war bei ko-Tieren vermindert. Untersuchungen zur Leukozyten-Endothel-Interaktion in der Leber weisen darauf hin, dass das Leukozytenrecruitment bei ko-Tieren deutlich reduziert ist.

Interpretation

PI3K γ ist in immunkompetenten Zellen konstitutiv exprimiert und bestimmt wesentlich die Migration von Leukozyten sowie die Freisetzung von Entzündungsmediatoren. Die Rolle von PI3K γ wird als paradox beschrieben [2,3], da deren Inhibition bei einigen chronischen Entzündungskrankheiten einen Benefit aufweist, bei akuten Inflammationsgeschehen hingegen ein schlechteres Outcome beschrie-

Abbildung 1

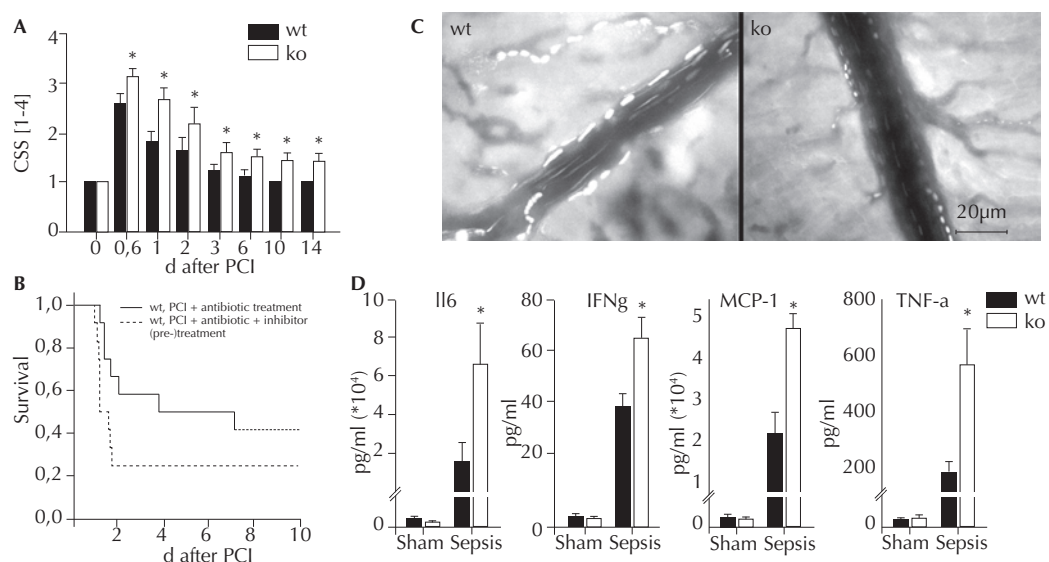


Abb. A: Clinical-Severity-Score (CSS) als Maß der Morbidität-überlebenden Tiere (wt- und PI3K γ -ko) nach PCI; MW $\pm$ SEM; MWU. *p<0.05 vs. wt; n=12-32 pro Gruppe und Zeitpunkt. **Abb. B:** Überlebensanalyse nach PCI + Antibiose bei Tieren mit und ohne pharmakologischer Inhibition der PI3K γ ; Log-rank; n.s.; n=12-15 pro Gruppe. **Abb. C:** Repräsentative intravitalmikroskopische Aufnahme einer Lebersammelvene 6h nach PCI in wt- und PI3K γ -ko. Misch-Ansicht einer 20-Sek-Filmsequenz nach CFDA-SE-Färbung der Leukozyten. **Abb. D:** Zytokinspiegel, ermittelt 6 h nach PCI in wt- und PI3K γ -ko. MW $\pm$ SEM; MWU. *p<0.05 vs. wt; n=4-8 pro Gruppe.

ben wurde. In dem klinisch relevanten Sepsis-modell der polymikrobiellen Peritonitis konnte gezeigt werden, dass eine PI3K γ -Deletion zu einer erhöhten systemischen Zytokinantwort führte. Darüber hinaus war das in der Leber evaluierte Leukozytenrecruitment als auch die Phagozytoseaktivität zirkulierender Leukozyten reduziert. Sowohl eine genetische als auch eine pharmakologische Inhibition der PI3K γ war mit einer Zunahme der Krankheitsschwere selbst unter Antibiotikatherapie assoziiert. Die offensichtlich durch die Inhi-

bition fehlende Balance zwischen Pro- und Anti-Inflammation könnte darauf hinweisen, dass PI3K γ einen endogenen negativen Feedback-Mechanismus aufweist, der bei akuter Inflammation zur Aufrechterhaltung und Integrität des Immunsystems von entscheidender Bedeutung ist.

Literatur

1. Hawkins PT, Stephens LR. PI3Kgamma is a key regulator of inflammatory responses and

cardiovascular homeostasis. Science 2007 (Oct 5);318(5847):64-66.

2. Rückle T, Schwarz MK, Rommel C. PI3Kgamma inhibition: towards an „aspirin of the 21st century“? Nature Reviews Drug Discovery 2006 (Nov 5);11:903-918.
3. Williams DL, Ozment-Skelton T, Li C. Modulation of the phosphoinositide 3-kinase signaling pathway alters host response to sepsis, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. Shock 2006;25(5):432-439.

Die Glykokalyx vermittelt eine H₂O₂-induzierte Kalzium-Signaltransduktion im pulmonalen Endothel über einen Heparansulfat-CD44-Mechanismus

K. Heckel · M. Strunden · K.J. Kirsche · I. Dralle · R. Kiefmann · A.E. Goetz

Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Universität Hamburg

Korrespondenz: k.heckel@uke.uni-hamburg.de

Fragestellung

H₂O₂ wird während entzündlicher Erkrankungen ubiquitär freigesetzt und fungiert als wichtiger proinflammatorischer Stimulus für das Endothel. Die gängige Vorstellung ist, dass H₂O₂ unspezifisch über die Zellmembran diffundiert und intrazellulär zu einer Aktivierung der Zellen führt [1]. Die anatomische Schicht zwischen in der Zirkulation befindlichem H₂O₂ und der Oberfläche des Endothels ist die endotheliale Glykokalyx, die Zuckerverbindungen wie Heparansulfate enthält [2]. Da die Rolle der Glykokalyx bei der inflammatorischen Signaltransduktion bisher unklar ist, haben wir die Hypothese generiert, dass die H₂O₂-induzierte endotheliale Stimulation auch über einen spezifischen rezeptorvermittelten Mechanismus vermittelt sein könnte. Dabei könnte H₂O₂ mit Heparansulfat reagieren und konsekutiv über den Rezeptor CD44 eine intrazelluläre Kalzium-Signaltransduktion auslösen.

Methodik

Humane pulmonale mikrovaskuläre Endothelzellen wurden mit dem Kalzium-sensitiven Fluorochrom Fura-2AM (9 µg/ml, 30 min), inkubiert. In randomisierten Beobachtungsarealen wurde mittels Epifluoreszenzmikroskopie das relative Fluoreszenz-Intensitäts-Verhältnis F340/F380 zwischen den Anregungs-Wellenlängen bei 340 und 380 nm, das mit der zy-

tosolischen Kalziumkonzentration korreliert, quantifiziert. Ebenso wurde im subpleuralen Endothel von Venolen *in situ* isoliert perfundierter Mäuselungen die zytosolische Kalziumkonzentration anhand von F340/F380 quantifiziert [3]. Die Werte sind als Median mit Quartilsintervallen angegeben. Die statistische Analyse erfolgte mittels ANOVA on Ranks / Dunn's sowie mittels Wilcoxon-Signed-Rank-Test (p < 0,05).

Ergebnisse

In vitro war F340/F380 in den Endothelzellen unter Kontrollbedingungen 0,7 (0,6 - 0,7), n=10. Die Stimulation der Zellen mit H₂O₂ (200, 400 oder 800 µM) erhöhte F340/F380 auf 2,8 (2,1-3,5), n=10, p < 0,05. Die Vorbehandlung der Zellen mit Heparinase-III (15 mU/ml, 60 min), einem spezifischen Heparansulfat-spaltenden Enzym, blockierte den H₂O₂-induzierten Anstieg von F340/F380: 0,8 (0,7-1,1), n=15, p < 0,05. Die Applikation von Heparinase-III alleine hatte keinen Effekt auf F340/F380, n=5. Im nächsten Schritt applizierten wir natives Heparansulfat (200 µg/ml). Dieses veränderte F340/F380 der Endothelzellen nicht, n=5. Wurde Heparansulfat hingegen vor der Applikation für 10 min mit H₂O₂ und anschließend mit Katalase bis zur vollständigen Inaktivierung von H₂O₂ inkubiert, generierte dieses oxidierte Heparansulfat (HSox) (10, 20 oder 40 µg/ml) bei den Endothelzellen erneut einen signifikanten Anstieg von F340/F380 auf 3,3 (2,8-3,4), n=5, p < 0,05. Die Inkubation der chemisch verwandten Verbindungen Dextran, Heparin und Hyaluronsäure mit H₂O₂ und anschließend mit Katalase führte zu keinem Anstieg von F340/F380, je n=5. Die Behandlung der Endothelzellen mit einem blockenden monoklonalen Antikörper gegen CD44 (Clone IM7, Rat IgG2b, 10min) vor der Stimulation mit H₂O₂ (200, 400 oder 800 µM) oder HSox (10, 20 oder 40 µg/ml) verhinderte den Anstieg von F340/F380: 0,8 (0,8-0,8), je n=5, p < 0,05. Der blockende Antikörper alleine hatte keinen Ef-

fekt auf F340/F380, n=5. Die Vorbehandlung der Zellen mit einem nicht-blockenden monoklonalen Antikörper gegen CD44 (Clone B-F24, 10min) hatte keinen hemmenden Effekt auf die H₂O₂- und HSox-induzierte F340/F380-Reaktion der Endothelzellen, je n=5. Um zu untersuchen, ob diese Mechanismen auch am Gesamorgansystem eine Rolle spielen, wurden die Experimente an der isoliert perfundierten Mäuselunge wiederholt. Hier war F340/F380 unter Kontrollbedingungen konstant bei 0,5, n=4. Die Applikation von HSox (40 µg/ml) führte zu einem Anstieg von F340/F380 im pulmonalen Endothel auf 0,8, n=4. Die Vorbehandlung der Lungen mit dem blockenden monoklonalen Antikörper gegen CD44 verhinderte den HSox-induzierten Anstieg von F340/F380: 0,5, n=4.

Interpretation

In vitro induziert H₂O₂ eine endotheliale Kalzium-Signaltransduktion. Unsere Ergebnisse lassen einen bisher unbeschriebenen rezeptorvermittelten Mechanismus vermuten, in dem der proinflammatorische Mediator H₂O₂ über Heparansulfat der endothelialen Glykokalyx und konsekutiv über CD44 zu einer intrazellulären Kalzium-Reaktion führt. Die Ergebnisse an der *in situ* isoliert perfundierten Lunge scheinen diesen Mechanismus zu bestätigen. Die klinische Relevanz bei inflammatorischen Erkrankungen muss in Nachfolgestudien aufgeklärt werden.

Literatur

1. Hecquet CM, Malik AB. Role of H(2)O(2)-activated TRPM2 calcium channel in oxidant-induced endothelial injury. Thromb Haemost 2009;101:619-625.
2. Chappell D, Westphal M, Jacob M. The impact of the glycocalyx on microcirculatory oxygen distribution in critical illness. Curr Opin Anaesthesiol 2009;22:155-162.
3. Kiefmann R, Rifkind JM, Nagababu E, Bhattacharya J. Red blood cells induce hypoxic lung inflammation. Blood 2008;111:5205-5214.

Reduzieren minimale Tidalvolumina bis hin zur Apnoe-ventilation die beatmungsassoziierte Lungenschädigung im tierexperimentellen Lungenversagen?

A. Johannes¹ · B. Zollhöfer¹ · N. Schlegel² · M. Kredel¹ · C. v. Kirschbaum¹ · N. Roewer¹ · J. Brederlau³ · R.M. Muellenbach¹

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

² Chirurgische Klinik, Universitätsklinikum Würzburg, Julius-Maximilians-Universität Würzburg

³ Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin, Klinikum Hanau

Korrespondenz:

Johannes_a@klinik.uni-wuerzburg.de

Fragestellung

Durch eine lungenprotektive Beatmung mit reduziertem Tidalvolumen (VT) konnte sowohl die Mortalität als auch die beatmungsassoziierte Lungenschädigung (VALI) bei Patienten im akuten Lungenversagen (ARDS) gesenkt werden [1]. Allerdings kann es trotz Anwendung dieser reduzierten VTs in gesunden Lungenarealen zu einer zyklischen inspiratorischen Überdehnung und konsekutiv zu einer Zunahme der Lungenschädigung kommen. Durch den Einsatz einer arteriovenösen extrakorporalen Lungenassistenz (av-ECLA) konnte in tierexperimentellen Untersuchungen eine weitere Erniedrigung der VTs bis hin zur Apnoe-ventilation erzielt werden [2]. Der Einfluss einer derartigen Beatmungsstrategie auf die VALI wurde jedoch noch nicht evaluiert. Wir testeten im 24 Std.-Großtier-ARDS-Modell die Hypothese, dass die Minimierung der VTs auf 3 bzw. 0 ml/kg KG („Lung at rest“) unter av-ECLA zu einer Reduktion der VALI führt.

Methodik

Nach behördlicher Genehmigung wurde bei 24 Pietrain-Schweinen (Gewicht: 52,9±3,6 kg) ein akutes Lungenversagen (T_{ARDS}) durch repetitive Kochsalzlavage (30 ml/kg KG) induziert. Nach einer einstündigen Stabilisierungsphase

wurden die Tiere in folgende Gruppen randomisiert: Gruppe 1: PCV (VT=6 ml/kg KG); Gruppe 2: PCV/av-ECLA (VT=3 ml/kg KG); Gruppe 3: CPAP/av-ECLA (VT=0 ml/kg KG). In den Gruppen 2 und 3 wurden die A. und V. femoralis kanüliert und eine Membranlunge mit niedrigem Flusswiderstand (iLA, Novalung, Talheim) interponiert. In allen Gruppen wurde zu Beginn des 24-stündigen Versuchs ein Rekrutierungsmanöver durchgeführt und der positiv endexpiratorische Druck (PEEP) 3 cmH₂O über den unteren Inflektionspunkt der Druck-/Volumen-Kurve gesetzt. Während des Versuchszeitraums wurden ein PaO₂ von 80-110 mmHg und ein PaCO₂ von 55-65 mmHg angestrebt. Am Ende der Untersuchung wurden die Tiere euthanasiert. HE-gefärbte Schnitte aus Ober- und Unterlappen der rechten Lunge wurden lichtmikroskopisch anhand eines semiquantitativen Punktesystems (von 0=nicht vorhanden bis 3=stark ausgeprägt) nach folgenden Kriterien beurteilt: Inflammation, Überdehnung, alveoläres Exsudat und Atelektase. Statistik: Two-Way ANOVA für Messwertwiederholungen mit Student-Newman-Keul's Test, und Kruskal-Wallis One-Way-ANOVA für nicht-parametrische (Median (25 %-75 %-Perzentile)) Daten; (p<0,05).

Ergebnisse

Alle 24 Tiere waren bezüglich des Gasaustauschs und der Hämodynamik vor Versuchsbeginn miteinander vergleichbar. Nach pulmonaler Rekrutierung und Erhöhung des PEEP kam es während des 24-stündigen Versuchszeitraums in allen drei Gruppen zu einer signifikanten Verbesserung des PaO₂/FiO₂-Index gegenüber dem Zeitpunkt nach Lungenschädigung. Die Reduktion der VTs in den Gruppen 2 und 3 führte zu einer signifikanten Verschlechterung des PaO₂/FiO₂-Indexes gegenüber der Gruppe 1 (Gr. 3: 169±54 und Gr. 2: 225±27 vs. Gr. 1: 357±26 mmHg). Die FiO₂ konnte in den Gruppen 1 und 2 signifikant reduziert werden (0,3±0 und 0,47±0,05 vs 1,0±0 T_{ARDS}), hingegen war dies in der Gruppe 3 nicht möglich (0,92±0,09). Der PaCO₂ wurde in allen Gruppen im Zielbereich gehalten. Analog zum VT waren die

Spitzendrücke in den Gruppen 2 und 3 signifikant erniedrigt (Gr. 3: 22±2 und Gr. 2: 28±1 vs. Gr. 1: 32±2 cmH₂O). Der PEEP (20±1 cmH₂O) war in allen Gruppen vergleichbar. Hämodynamisch waren alle Tiere unter vergleichbarer kontinuierlicher Volumen- und Noradrenalininfusion stabil.

In den apikalen Lungenabschnitten zeigte sich eine signifikante Reduktion der alveolären Überdehnung in der Gruppe 3 (1(1-1,25)) gegenüber der Gruppe 1 ((3(2-3))). In den basalen Lungenabschnitten kam es in den Gruppen 2 und 3 gegenüber der Gruppe 1 zu einer signifikanten Zunahme der Atelektasen (Gr. 2: 2 (2-2,25), Gr. 3: 2 (1-2) vs. Gr. 1: 0 (0-0)). Außerdem waren in der Gruppe 2 gegenüber der Gruppe 1 sowohl die Inflammation als auch das Ausmaß der alveolären Exsudation signifikant erhöht (Infl.: 3 (2-3) vs 1 (0-1), alv. Exsudat: 2,5 (2-3) vs. 1 (1-1)).

Interpretation

Bei hocheffektiver CO₂-Elimination ermöglichte die av-ECLA eine Minimierung der VTs auf 0 ml/kg. Die beatmungsassoziierte Lungenschädigung erschien jedoch trotz dieser weiteren Ruhigstellung der Lunge nicht reduziert. Zwar wurde die zyklische alveoläre Überdehnung in den apikalen Lungenarealen verringert, in den basalen Anteilen nahmen jedoch die Inflammation sowie die intraalveoläre Exsudation zu. Außerdem beinhaltete die Minimierung des VTs trotz hoher PEEP-Werte eine signifikante Zunahme der Atelektasen in den basalen Arealen und resultierte in einer verschlechterten Oxygenierung.

Literatur

1. Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. The Acute Respiratory Distress Syndrome Network. N Engl J Med 2000;342:1301-1308.
2. Muellenbach RM, Kredel M, Kuestermann J, et al. Combining "open-lung" ventilation and arteriovenous extracorporeal lung assist: Influence of different tidal volumes on gas exchange in experimental lung failure. Med Sci Monit 2009 Aug;15(8):BR213-20.

Rolle des Adenosin-A_{2A}-Rezeptor-Signalweges im murinen Sepsismodell

I. Kaufmann¹ · V. van der Heide¹ · M. Thiel²

- 1 Klinik für Anaesthesiologie, Ludwig-Maximilians-Universität München
- 2 Institut für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin, Universitätsklinikum Mannheim

Korrespondenz: lkaufman@gmx.de

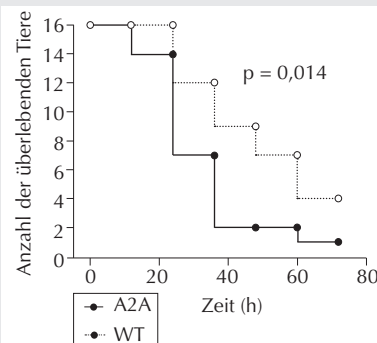
Fragestellung

Die unkontrollierte Aktivierung von polymorphkernigen Leukozyten (PMN) nimmt in der Pathogenese Sepsis-induzierter Organschäden eine zentrale Rolle ein. In früheren Arbeiten konnte in verschiedenen Modellen einer sterilen Inflammation gezeigt werden, dass der Adenosin → Adenosin-A_{2A}-Rezeptor (A_{2A}R)-Signalweg einer überschießenden Aktivierung von Immunzellen entgegenwirkt [1]. Folglich sollte der A_{2A}R-Signalweg auch bei einer bakteriellen Infektion die Entstehung von inflammatorischen Organschäden limitieren bzw. ein Fehlen oder die verminderte Aktivität dieses Signalweges zu Hyperinflammation und erhöhter Letalität führen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, diese Hypothese am Modell der murinen septischen Peritonitis in vivo zu prüfen.

Methodik

Nach Genehmigung durch die Tierschutzkommission (Aktenzeichen 209.1/211-2531-111/03) wurde nach zökaler Ligatur und Punktion (CLP; 4/5-Ligatur und 19G-Doppelpunktion des Zökums) die Überlebensrate von Adenosin-A_{2A}-Rezeptor-defizienten (A_{2A}-

Abbildung 1



KO)- und Wildtyp-Mäusen (C57/Bl6) mittels Kaplan-Meier-Methode verglichen (n=16/Gruppe, männlich, 8-12 Wochen alt). Zwölf Stunden nach CLP wurden proinflammatorische Zytokine im Plasma und in der Peritoneallavage mittels Luminex xMap-Technologie[®] bestimmt und die potenziell zytotoxischen und mikrobiziden Partialfunktionen von PMN aus dem Blut und der Peritonealhöhle durchflußzytometrisch analysiert. Darüber hinaus wurde die peritoneale Keimlast quantifiziert (n=7-8/Gruppe). Alle Variablen wurden auch bei scheinoperierten, d.h. laparotomierten, aber nicht zökal punktierten und ligierten C57/Bl6-Mäusen gemessen (n=6). Die Ergebnisse sind als Mittelwerte±Standardfehler angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem SPSS-Programm 15.0.

Ergebnisse

Die A_{2A}-KO-Mäuse zeigten im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren nach CLP ein statistisch

signifikant geringeres Überleben (p=0.014) (Abb. 1). Zwölf Stunden nach Induktion der septischen Peritonitis wurden bei den A_{2A}-KO Mäusen signifikant niedrigere proinflammatorische Zytokine (IL-6, IL-12 p70, MIP-1α) im Plasma und der Peritoneallavage gemessen (Abb. 2).

Interpretation

In Übereinstimmung mit unserer Hypothese zeigen die Ergebnisse, dass das Fehlen des A_{2A}R zu einer verkürzten Überlebenszeit im bakteriellen Modell der murinen Sepsis führt. Dafür ist jedoch nicht, wie ursprünglich postuliert, eine überschießende Inflammation, sondern eine Immunsuppression mit einer vermehrten Keiminvansion verantwortlich.

Dieses Projekt wurde von der DFG (TH 733/4-1) gefördert.

Literatur

1. Sitkovsky MV, Lukashev D, Apasov S, et al. Physiological control of immune response and inflammatory tissue damage by hypoxia-inducible factors and adenosine A_{2A} receptors. *Annu Rev Immunol* 2004;22:657-682.

Abbildung 3

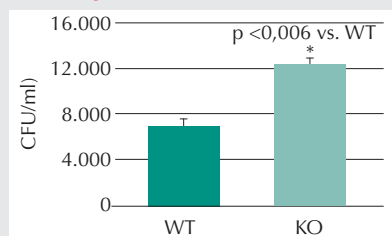
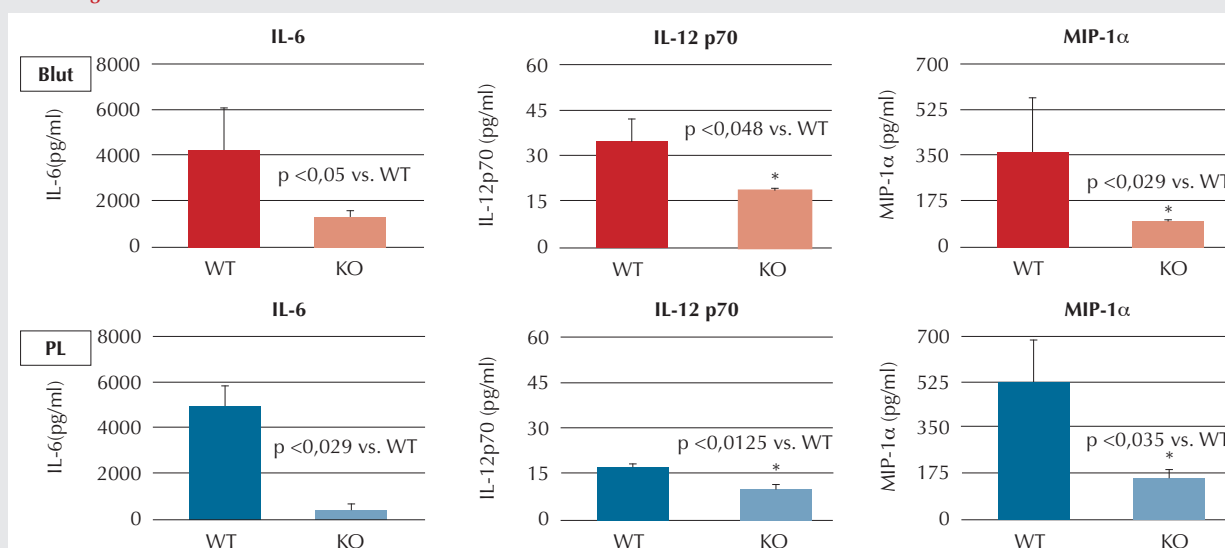


Abbildung 2



Die Expression des humanen Adenosin-A_{2A}-Rezeptors wird in polymorphkernigen Leukozyten posttranskriptionell durch die Micro-RNA-214 reguliert

S. Kreth · J. Heyn · C. Ledderose · E. Limbeck

Klinik für Anaesthesiologie, Ludwig-Maximilians-Universität München

Korrespondenz:

simone.kreth@med.uni-muenchen.de

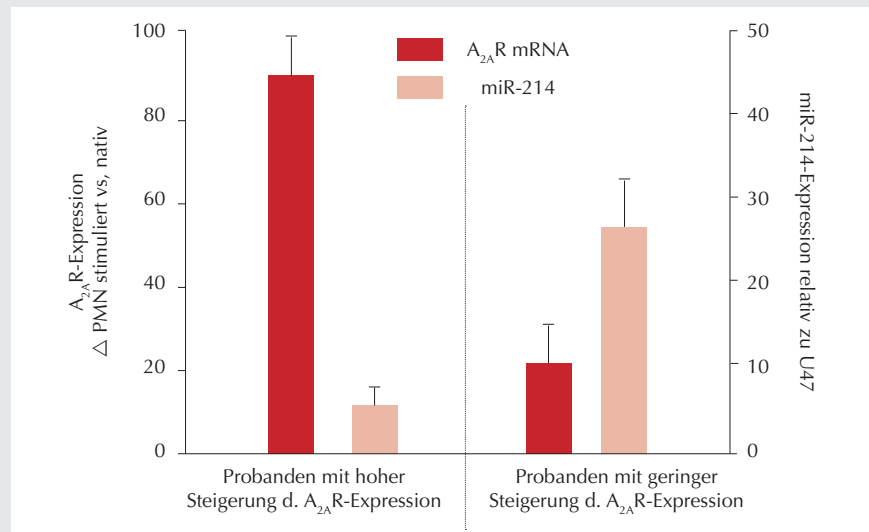
Fragestellung

Die unkontrollierte Aktivierung polymorphkerniger Leukozyten (PMN) ist in der Pathogenese hyperinflammatorischer Krankheitsbilder, wie z.B. der Sepsis, von zentraler Bedeutung. Da der Adenosin-A_{2A}-Rezeptor (A_{2A}R) wichtige anti-inflammatorische Zellantworten zur Limitierung von Kollateralschäden durch überschießende Immunreaktionen vermittelt [1], ist die Regulation seiner Genexpression in PMN von besonderem Interesse. Neben den bereits bekannten Mechanismen differentiellen Splicings des komplexen 5'-untranslatierten Bereichs (UTR) des A_{2A}R-Gens [2] könnten zudem Micro-RNAs eine wichtige regulatorische Rolle auf der posttranskriptionellen Ebene spielen: Micro-RNAs wirken durch Bindung an spezifische Erkennungssequenzen im 3'-UTR von Ziel-mRNAs inhibierend auf deren Genexpression. Wir haben daher untersucht, ob die Expression des A_{2A}R einer Regulation durch Micro-RNAs unterliegt.

Methodik

Mittels eines mi-RNA-Zielsequenz-Erkennungsprogramms (TargetScan) wurde der 3'-UTR des A_{2A}R-Gens auf potenzielle Micro-

Abbildung 2



A_{2A}R mRNA- und mi-RNA-214 Expression in humanen PMN (Probanden mit hoher (1) und niedriger(2) Steigerung der mRNA-Expression).

RNA-Bindungsstellen hin untersucht. Nach RNA-Isolation aus PMN gesunder Probanden (Blutentnahme durch Ethikkommission genehmigt) und reverser Transkription wurde der 3'-UTR des A_{2A}R-Gens mittels PCR amplifiziert und in einen Luciferase-Reporter-Vektor kloniert. Ein Kontrollkonstrukt mit deletierter mi-RNA-Bindungsstelle wurde mittels gerichteter Mutagenese erstellt. Beide Vektorkonstrukte wurden - als Co-Transfektion mit der entsprechenden Vorläufer-miRNA - in HEK293-Zellen transfiziert (Lipofektion). Die Luciferase-Aktivität der verschiedenen Transfektionsansätze wurde mittels Luminometrie quantifiziert. Die statistische Auswertung erfolgte mittels T-Test. Die physiologische Relevanz der so identifizierten mi-RNA wurde in nativen und LPS-stimulierten PMN (5 µg/ml, 37° C, 6 h) gesunder Probanden überprüft: mittels quantitativer RT-PCR wurden die Expressionsraten der mi-RNA sowie die mRNA-Expression des A_{2A}R bestimmt und miteinander korreliert (Bestimmung r nach Pearson).

Ergebnisse

Bioinformatische Untersuchungen identifizierten eine potentielle Bindungsstelle für die mi-RNA-214 im 3'-UTR des A_{2A}R-Gens. In Zellkultur-Transfektionsexperimenten konnte gezeigt werden, dass die mi-RNA-214 tatsächlich über ihre spezifische Bindungsstelle die Expression des vorgeschalteten Gens reguliert: Im Vergleich zum Kontrollkonstrukt (mit deletierter Bindungsstelle) fand sich für das den originären A_{2A}R-3'-UTR enthaltende Konstrukt eine um 45 % reduzierte Luciferase-Aktivität (n=10, p<0,01, Abb. 1). In nativen

humanen PMN konnte eine interindividuell unterschiedliche Expression der mi-RNA-214 nachgewiesen werden, die sich nach LPS-Stimulation nicht signifikant änderte. Die mRNA Expression des A_{2A}R war nach LPS-Stimulation signifikant gesteigert (p<0.001, n=20); es fand sich hierbei eine negative Korrelation zwischen dem Ausmaß der Hochregulation des A_{2A}R und der Menge vorhandener mi-RNA-214 (r = 0.8, p<0.01, n=6, Abb. 2).

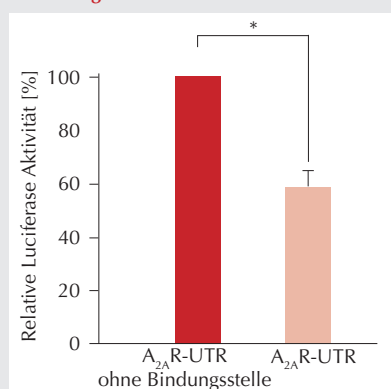
Interpretation

Unsere Transfektionsexperimente identifizieren einen neuen Mechanismus zur Regulation der A_{2A}R-Genexpression in humanen PMN: diese ist posttranskriptionell durch die mi-RNA-214 kontrolliert. Die Existenz von mi-RNA-214 in humanen PMN, die zudem interindividuell unterschiedlich und Aktivierungszustand-unabhängig ist, sowie deren inverse Korrelation mit der Hochregulation der A_{2A}R-Expression nach LPS-Stimulation legen einen wichtigen epigenetischen Regulationsweg nahe, der ein interindividuell unterschiedliches anti-inflammatorisches Potential, z.B. bei Sepsis-Patienten, erklären könnte.

Literatur

1. Ohta A, Sitkovsky MV. Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. *Nature* 2001;414:916-920.
2. Kreth S, et al. Differential expression of 5'-UTR splice variants of the adenosine A_{2A} receptor gene in human granulocytes: identification, characterization, and functional impact on activation. *FASEB J* 2008;22:3276-3286.

Abbildung 1



Luciferase-Aktivität der Vektorkonstrukte in HEK293-Zellen.

Der S1P-Rezeptor-Agonist FTY720 reduziert die Infarktgröße, aber induziert eine ventrikuläre Dilatation im Myokardischämie- und Reperusionsmodell der Maus

J. Larmann¹ · A. Hahnenkamp² · M. Schmitz³ · J. Chun⁴ · J. Stypmann⁵ · G. Theilmeier¹

- 1 Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin, Medizinische Hochschule Hannover, Hannover
- 2 Institut für klinische Radiologie, Universitätsklinikum Münster, Münster
- 3 Institut für Anatomie, Westfälische Wilhelms Universität Münster, Münster
- 4 Department of Molecular Biology, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA
- 5 Klinik für Kardiologie und Angiologie, Universitätsklinikum Münster, Münster

Korrespondenz: larmann.jan@mh-hannover.de

Fragestellung

In Hochrisikokollektiven, wie gefäßchirurgischen Patienten, erleiden bis zu 6 % aller Operierten einen Myokardinfarkt [1]. Perioperative Myokardinfarkte können nur zum Teil durch prophylaktische Interventionen verhindert werden [2]. Mobilisation und Funktion endothelialer Progenitorzellen (EPCs), die durch die Oberflächenmarker CD117+/Flk1+ charakterisiert werden können, sind mit dem ventrikulären Remodeling assoziiert [3] und korrelieren mit Morbidität und Letalität nach kardiovaskulären Ereignissen [4]. Sphingosin-1-Phosphat (S1P) und sein oral bioverfügbares Analogon FTY720, die im kardiovaskulären System als Agonist insbesondere an den S1P-Rezeptoren-1 und -3 wirken, verbessern die migratorischen Eigenschaften von EPCs in vitro und in vivo [5]. Wir haben den Einfluss von FTY720 auf den myokardialen Schaden und das frühe myokardiale Remodeling an einem Mausmodell für Myokardischämie und Reperfusion (MI/R) untersucht.

Methodik

Die Tierversuche wurden von der zuständigen Tierschutzkommission genehmigt. Dem Trink-

wasser alters- und geschlechtsgleicher Gruppen von C57Bl6-Wildtyp-Mäusen (WT) und S1P₃-gendefizienten Mäusen (S1P₃^{-/-}) wurde für sieben Tage 10mg/l FTY720 (Cayman, Ann Arbor, USA) zugesetzt, um eine therapeutische Dosis von 1,25mg/kg/d zu erzielen [6]. Die Tiere in der Kontrollgruppe erhielten Phosphat-gepufferte Natrium-Chlorid-Lösung (PBS) als Trinkwasserzusatz. Anschließend wurde der Ramus interventrikularis anterior der linken Koronararterie durch Ligatur über einen Polyethylen-Schlauch (ED 0,1 mm) für 30 Minuten okkludiert und dann wieder freigegeben. Die Menge der im Vollblut zirkulierenden EPCs (CD117+/Flk1+Zellen) wurde 24 Stunden nach MI/R durchflusszytometrisch (CD117: Klon: 3C1, MACS Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach; FLK1: Klon: 1685, Natutec, Frankfurt) bestimmt und die Infarktgrößen wurde in 5 gleichmäßigen Schnitten mittels 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid/Coomassie-Blau-Technik morphometrisch als Anteil des Risikoareales (AAR) quantifiziert. Apoptotische Zellen wurden mittels TUNEL-Färbung (MBL, Woburn, MA, USA) nach 24 Stunden quantifiziert. Die Anzahl neutrophiler Granulozyten (PMN) im ischämischen Myokard wurde nach 24 Stunden und sieben Tage nach MI/R immunhistochemisch (Klon: 7/4, Serotec, Düsseldorf) detektiert. Die myokardiale Funktion wurde an Tag sieben nach MI/R mittels 2D-geführter M-Mode Echokardiographie (HP Sonos5500, Hewlett Packard, Mountain View, CA, USA) charakterisiert. Die Daten wurden wegen ihrer statistisch unterschiedlichen Varianzen nicht-parametrisch mittels Mann-Whitney-U-Test getestet und sind aufgrund ihrer Normalverteilung als Mittelwert±Standardfehler des Mittelwertes angegeben. p<0,05 wurde als Signifikanzniveau gewählt.

Ergebnisse

Während FTY720 bei WT-Mäusen 24 Stunden nach MI/R die Anzahl im Blut zirkulierender EPCs erhöht (13196±3243 vs. 7045±1218; CD117+/Flk1+Zellen/ml Vollblut; FTY720 vs. PBS, p<0,05, n=8/13), konnte dieser Unterschied bei S1P₃^{-/-}-Tieren nicht objektiviert werden (5200±2340 vs.

6339±1270 CD117+/Flk1+ Zellen/ml Vollblut; FTY720 vs. PBS, p=n.s., n=3/6). Bei WT-Tieren reduzierte FTY720 das Infarktareal im Vergleich zur Kontrollgruppe (30,6±2,67 vs. 48,1±2,5; % der AAR; WT+FTY720 vs. WT+PBS; p<0,001; n=6/8). Bei S1P₃^{-/-}-Tieren konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden (49,6±1,2 vs. 46,9±1,8; % der AAR; S1P₃^{-/-}+FTY720 vs. WT+PBS; p=0,3; n=7/9). Die Anzahl apoptotischer Zellen war im Infarktareal der FTY720-behandelten Tiere reduziert (18,7±16 vs. 245±60; TUNEL-positive Zellen/mm²; FTY720 vs. PBS, p<0,05; n=5/6). Die Infarktgrößenreduktion wird begleitet von einer nach 24 Stunden reduzierten PMN-Infiltration (68±8 vs. 486±52; PMN/mm²; FTY720 vs. PBS; p<0,01; n=5/6), die sich bis sieben Tagen zwischen beiden Gruppen angleicht (84±8 vs. 87±17; PMN/mm²; FTY720 vs. PBS, p=0,36, n=11/5). Nach sieben Tagen weisen die FTY720-behandelten Tiere eine linksventrikuläre Dilatation auf (EDV: 160,1±14,6 vs. 90,1±9,0; ESV: 115,9±18,7 vs. 50,0±7,5; µl; FTY720 vs. PBS; p<0,05; n=5/6). In der Behandlungsgruppe zeigt sich darüber hinaus eine reduzierte Ejektionsfraktion (29±5,4 vs. 45±6,1; %; FTY720 vs. PBS; p<0,05; n=5/6).

Interpretation

FTY720 erhöht S1P₃-Rezeptor-vermittelt die Anzahl im Blut zirkulierender EPCs und reduziert die Infarktgröße nach MI/R, induziert jedoch ein adverses linksventrikuläres Remodeling. Um die von FTY720 vermittelten protektiven Effekte therapeutisch nutzbar zu machen, ist eine weitere Untersuchung der Rolle der einzelnen S1P-Rezeptoren für das myokardiale Remodeling erforderlich.

Literatur

1. Mangano, et al. Anesthesiology 1998;88(3):561.
2. Schouten, et al. N Engl J Med 2009;361(10):980.
3. Sekiguchi, et al. J Cell Physiol 2009;219:235.
4. Werner, et al. N Engl J Med 2005;353(10):999.
5. Walter, et al. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2007;27(2):275.
6. Keul, et al. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2007;27(3):607.

Mechanismen der PAF-induzierten Perfusions- und Permeabilitätsänderungen am isoliert perfundierten Dünndarm der Ratte

I. Lautenschläger¹ · H. Dombrowsky^{1,2} · J. Sarau^{1,2} · Y. L. Wong^{1,2} · P. Zabel³ · I. Frerichs¹ · S. Uhlig¹ · N. Weiler¹

- 1 Klinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
- 2 Barriere-Integrität, Forschungszentrum Borstel, Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften, Borstel
- 3 Klinische Pneumologie, Forschungszentrum Borstel, Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften, Borstel
- 4 Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule, Aachen

Korrespondenz:

lautenschlaeger@anaesthesie.uni-kiel.de

Fragestellung

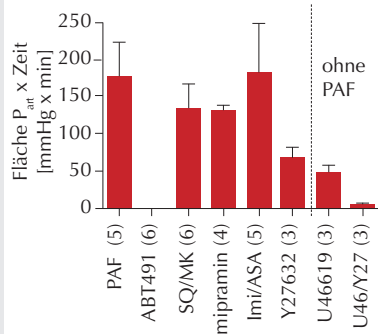
Der plättchenaktivierende Faktor PAF kann als endogener Entzündungsmediator eine intestinale endo- und epitheliale Barriestörung hervorrufen und konsekutiv über eine Perfusionsstörung mit septischem Schock in ein Multiorganversagen münden. Die pathophysiologischen Mechanismen der PAF-Wirkung am Darm sind im Gegensatz zur Lunge [1] nicht genau bekannt. Wir nutzten ein neuartiges isoliertes Darmperfusionsmodell [2], um die PAF-Wirkung im Dünndarm der Ratte zu untersuchen und neue Hypothesen über den zugrundeliegenden Mechanismus zu generieren.

Methodik

Isolierte Dünndärme wurden nach der Disektion randomisiert den Gruppen PAF (n=5), PAF+PAF-Antagonist (ABT491, n=6), PAF+Thromboxan- (SQ29548) und Leukotrien- (MK571) Antagonist (SQ/MK, n=6), PAF+Rho-Kinase-Inhibitor (Y27632, n=3), Thromboxan-Agonist (U46619, n=3), Thromboxan-Agonist+Rho-Kinase-Inhibitor (U46/Y27, n=3), PAF+Inhibitor der sauren Sphingomyelinase (Imipramin, n=4) sowie PAF+Inhibitoren der sauren Sphingomyelinase und der Cyclooxygenase (Acetylsalicylsäure) (Imi/ASA, n=5) zugeteilt. Die vaskuläre und luminale Perfusion erfolgte getrennt mit einem oxygenierten albuminhaltigen Krebs-Henseleit-Puffer und einer gepufferten lakto-

Abbildung 1

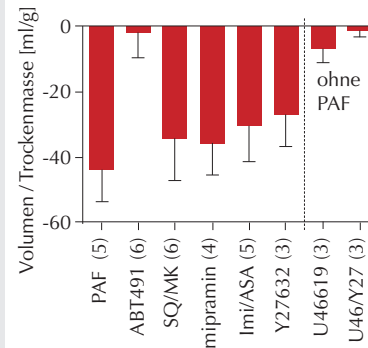
Fläche unter der Kurve des Drucksignals
(innerhalb von 15 Minuten nach Stimulation)



Druckeffekte im Gefäßbett.

Abbildung 2

Flüssigkeitsverlust aus dem Gefäßbett
(innerhalb von 15 Minuten nach Stimulation)



Flüssigkeitsverluste aus dem Gefäßbett
(Abkürzungen im Text).

sehaltigen Nährlösung. 15 Minuten vor dem Ende einer 60-minütigen Äquilibrationphase wurden die entsprechenden Rezeptorantagonisten bzw. Inhibitoren über die vaskuläre Route kontinuierlich appliziert (ABT 491, 2,5µM; SQ29548+MK571, je 10µM; Y27632, 10µM; Imipramin, 1µM; Acetylsalicylsäure, 500µM). Danach wurden die isolierten Organe mit 0.5 nmol PAF oder U46619 als Bolus via A. mesenterica superior stimuliert und die dynamischen Druckänderungen sowie Flüssigkeitsverschiebungen im Organ kontinuierlich aufgezeichnet.

Ergebnisse

Die Ergebnisse der Flächenanalyse der Druckkurven sind in Abbildung 1 dargestellt. Die Ergebnisse der Analyse des Volumenverlustes (in ml) aus dem Gefäßbett innerhalb eines 15-minütigen Intervalls nach Stimulation normiert auf die Darmtrockenmasse (in g) sind in der Abbildung 2 dargestellt.

Interpretation

Die Gabe von PAF führte im isoliert perfundierten Rattendünndarm rezeptorvermittelt zur Vasokonstriktion, die durch Thromboxanantagonisten nicht blockierbar, wohl aber durch Inhibition der Rho-Kinase modulierbar war. Ebenso wurde die vasokonstriktive Wirkung eines Thromboxanrezeptorantagonisten durch Gabe des Rho-Kinase-Inhibitors reduziert. Sowohl bei Stimulation von intestinalen

PAF- oder Thromboxanrezeptoren scheint somit der intrazelluläre Weg über die Rho-Kinase mitentscheidend für ihre Wirkungen auf den Vasotonus zu sein. PAF bewirkte im isolierten Darm ebenfalls einen Flüssigkeitsverlust aus dem Gefäßbett, der sowohl durch Filtration oder eine erhöhte Permeabilität der endo- und epithelialen intestinalen Barriere bedingt sein kann. Dieser Volumenverlust war durch Imipramin und ASA modulierbar, ohne dass diese Inhibitoren dabei eine Wirkung auf den arteriellen Druck ausübten. Somit scheint Imipramin in Kombination mit Acetylsalicylsäure die intestinale Barriere zu stabilisieren. Die Gabe des Rho-Kinase-Inhibitors verminderte den Flüssigkeitsverlust aus dem Gefäßbett nach PAF-Stimulation ebenfalls, dieser Effekt könnte jedoch am ehesten durch die reduzierte Vasokonstriktion und damit geringere Filtration erklärbar sein.

Literatur

1. Göggel R, Winoto-Morbach S, Vielhaber G, Imai Y, Lindner K, Brade L, et al. PAF-mediated pulmonary edema: a new role for acid sphingomyelinase and ceramide. *Nat Med* 2004;10:155-160.
2. Lautenschläger I, Dombrowsky H, Frerichs I, Kuchenbecker SC, Bade S, Schultz H, et al. A model of the isolated perfused rat small intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010;298:G304-313.

HMGB1- und TLR2-Blockade schützen im In-vivo-Mausmodell der Myokardischämie mit Reperfusion vor Apoptose und myokardialer Schädigung

A. Lorenz¹ · C. Herzog¹ · J. Larmann¹ · H. Janßen¹ · M. Schmitz² · E. Conway³ · G. Theilmeier¹

¹ Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin, Medizinische Hochschule Hannover

² Institut für Anatomie, Universitätsklinikum Münster

³ Centre for Blood Research, Dept. of Hematology/Medicine, University of British Columbia, Vancouver, Canada

Korrespondenz: Lorenz.Anika@mh-hannover.de

Fragestellung

Das inflammatorische Reperfusionssyndrom und das ventrikuläre Remodeling limitieren den Effekt der bei einer Myokardischämie heute routinemäßig durchgeführten Reperfusionstherapie. Myokardiale Wundheilung und Remodeling sind von Leukozyten abhängig, deren Rekrutierung ebenfalls maladaptives Remodeling begünstigt. Andererseits führt eine vollständige Unterdrückung der Entzündung zu einer limitierten Wundheilung und ist somit keine alternative therapeutische Strategie. Ein Entzündungsmodulator, an dessen Charakterisierung unsere Arbeitsgruppe beteiligt war, ist der Endothelrezeptor Thrombomodulin (TM), der durch seine Lektin-artige Domäne (LLD) eine anti-inflammatorische Wirkung besitzt [1]. Wir konnten zeigen, dass nach Myokardischämie mit Reperfusion (MI/R) die Menge an High Mobility Group Box Protein 1 (HMGB1) in TM^{LeD/LeD}- im Vergleich zu WT-Mäusen erhöht ist. HMGB1 ist ein nukleäres pro-inflammatorisches Zytokin, das von der LLD sequestriert wird [2]. HMGB1 ist in vitro ein Agonist am TLR2-Rezeptor [3]. Wir haben daher gefragt, ob HMGB1- und TLR2-antagonistische bzw. LLD-agonistische Strategien therapeutisch nutzbar sind, um den Myokardschaden nach MI/R zu reduzieren.

Methodik

Mit Genehmigung der Tierschutzkommission wurden alters- und geschlechtsgleiche Gruppen von Wildtyp (WT)- und TM^{LeD/LeD}-Mäusen durch Ligatur des Ramus interventricularis anterior (RIVA) der linken Koronararterie über einen Polyethylen-Schlauch (ED 0,1 mm) einer 30-minütigen Myokardischämie unterzogen. Die Infarktgrößen wurden in 5 gleichmäßigen Schnitten mittels 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid/Coomassie-Blau-Technik morphometrisch als Anteil des Risikoareales (AAR) nach einer 24-stündigen Reperusionsphase quantifiziert. Die Quantifizierung apoptotischer Zellen im infarzierten Gewebe erfolgte histologisch durch TUNEL-Färbung (MBL, Woburn, MA, USA) und die densitometrisch quantitative Detektion von aktiver Caspase-3 (cleaved Caspase-3, Cell Signaling, Lieferant: NEB, Frankfurt a. M.) im Western-Blot.

Zur funktionellen Untersuchung von HMGB1 und TLR2 in vivo wurden TM^{LeD/LeD}-Mäusen 1 Stunde vor der Ligatur des RIVA entweder Vehikel, Isotyp-Kontroll-Antikörper (200 µg irrelevanter Affinitäts-gereinigter polyklonaler Antikörper aus Huhn), blockierende TLR2-(70 µg anti-human TL2.1, Maus-IgG, BioLegend, San Diego, CA, USA) oder HMGB1-Antikörper (200 µg Affinitäts-gereinigter polyklonaler Antikörper aus Huhn, Shino-Test Corporation, Sagami-hara, Japan) i.p. injiziert. Nach 24-stündiger Reperfusion wurde im ischämischen Myokard mittels Western-Blot die Menge an aktiver Caspase-3 bestimmt. Im entnommenen Plasma wurde Troponin T gemessen, um das Ausmaß des Infarkts abzuschätzen (Cardiac T point-of-care kit, Roche Diagnostics, Mannheim). Für die Überexpression der LLD in vivo wurde der Expressionsvektor pSec-LLD mittels hydrodynamischer Transfektion (40 µg DNA in 2 mL PBS) 24 Stunden vor MI/R innerhalb von 5 Sekunden über einen Schwanzvenenkatheter injiziert. 24 Stunden nach MI/R wurde die Infarktgröße bestimmt. Für die statistische Analyse wurde wegen der signifikant unterschiedlichen Varianzen der Mann-Whitney-U-Test angewendet. Die Daten sind wegen der normalen Verteilung als Mittelwert±SEM angegeben. Als Signifikanzniveau wurde p<0,05 gewählt.

Ergebnisse

TM^{LeD/LeD}-Mäuse haben nach MI/R um 30% größere Infarkte als WT-Tiere (n=6, p<0,01). Die Apoptoserate im post-ischämischen Areal ist verglichen mit WT-Mäusen signifikant erhöht (1215±285 vs. 276±83 TUNEL pos. Zellen/mm², n=5, p<0,01). Dieses Ergebnis wird durch eine zweifach erhöhte Menge an aktiver Caspase-3 in den TM^{LeD/LeD}-Tieren bestätigt (n=5, p<0,05). Die Antikörper-Neutralisierung von HMGB1 und TLR2 bei TM^{LeD/LeD}-Mäusen nach MI/R reduziert das Plasma-Troponin T nach 24h um 48% (HMGB1, n=6, p<0,01) bzw. um 38% (TLR2, n=4) im Vergleich zur Isotypkontrolle (n=6). Die Blockade von HMGB1 reduziert die aktive Caspase-3 im ischämischen Myokard verglichen mit der Isotypkontrolle (33±4,4% vs. 89,4±9,3% der Vehikel-Kontrolle, HMGB1- vs. Isotyp, n=5, p<0,01) ebenso wie die Blockade des TLR2-Rezeptors (53±5,6%, n=4, p<0,05). Therapeutisch wird auch durch die Überexpression der LLD in vivo die Infarktgröße nach MI/R im Vergleich zum Kontrollvektor um 64% reduziert (n=6, p<0,01).

Interpretation

Das Fehlen der LLD führt nach MI/R zu größeren Infarkten sowie zu einer erhöhten Apoptoserate im post-ischämischen Myokard. Der pro-apoptotische Effekt von HMGB1 in TM^{LeD/LeD}-Mäusen wird am ehesten über den TLR2-Rezeptor vermittelt. Sowohl durch die Blockade von HMGB1 und TLR2 als auch durch die gentherapeutische Gabe von LLD kann eine kardioprotektive Wirkung erzielt werden. Alle drei Strategien sind daher potentiell therapeutisch nutzbar, um den Myokardschaden nach einem Infarkt zu reduzieren.

Literatur

1. Conway, et al. J Exp Med.2002;196(5):565-577.
2. Abeyama, et al. JCI 2005;115(5):1267-1274.
3. Lotze, et al. Nat Rev Immunol.2005;5(4):331-342.

Die Deletion von HIF-1 α in T-Zellen bewirkt eine pulmonale Hyperinflammation und eine erhöhte Letalität in einem murinen ARDS-Modell

B. Luchting¹ · S. Kreth¹ · M. Thiel²

1 Klinik für Anaesthesiologie, Ludwig-Maximilians-Universität München

2 Klinik für Anaesthesiologie und Operative Intensivmedizin, Universitätsklinikum Mannheim

Korrespondenz:

benjamin.luchting@med.uni-muenchen.de

Fragestellung

Das ARDS stellt eine bedrohliche, durch Hypoxie und Hyperinflammation gekennzeichnete Erkrankung dar. Der Transkriptionsfaktor HIF-1 α vermittelt essentielle adaptive Antworten des Säugetierorganismus auf Hypoxie. Bei geringen Sauerstoffkonzentrationen aktiviert HIF-1 α die Transkription einer Vielzahl von Genen, die für Zellüberleben, Angiogenese und Energiestoffwechsel benötigt werden. Aktuelle Studien weisen zudem auf eine immunsuppressive Wirkung von HIF-1 α hin [1]. T-Zell-spezifische HIF-1 α -Knock-out-Mäuse zeigten bei bakterieller Sepsis eine Hyperinflammation mit Senkung der Letalität durch bessere Eradikation der bakteriellen Last [2]. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss einer T-Zell-spezifischen Deletion von HIF-1 α auf ein nicht-bakterielles murines ARDS untersucht.

Methodik

Als Versuchstiere dienten Mäuse mit und ohne T-Zell-spezifisches HIF-1 α -Knock-out

(Lck-Cre⁺/HIF1- α -floxed, Lck-Cre-/HIF1- α -floxed). Die Genetik sämtlicher Tiere wurde mittels PCR überprüft. Die Induktion eines nicht-bakteriellen ARDS erfolgte durch intratracheale Applikation von Lipopolysaccharid (LPS, 4mg/kg/KG) und Staphylococcus aureus Enterotoxin B (SEB, 2mg/kg/KG) in Inhalationsnarkose mittels direkter Laryngoskopie. Nach einem 48-stündigen Beobachtungszeitraum wurde die Letalität bestimmt; bei den verbliebenen Versuchstieren wurden Blut und Gewebeproben entnommen und arterielle Blutgasanalysen durchgeführt. Zur Quantifizierung der pulmonalen Inflammation wurden die Plasmakonzentrationen der proinflammatorischen Zytokine MIP-2 und IL-6 mittels ELISA analysiert. Zur Quantifizierung der pulmonalen Permeabilitätsstörung wurde die Proteinkonzentration der bronchoalveolären Lavage (BAL) mittels Bradford-Assay bestimmt. Der Lung-Injury-Score (LIS) wurde aus histologischen Schnitten in H&E-Färbung erhoben. Die statistischen Analysen wurden mittels SigmaStatTM durchgeführt und die Ergebnisse durch den Mann-Whitney-Rank Sum-Test auf statistische Unterschiede hin überprüft. Die Versuche erfolgten mit Genehmigung durch die Tierschutzkommission der Regierung von Oberbayern.

Ergebnisse

Ein T-Zell-spezifischer HIF1- α -Knock-out verstärkt in einem nicht-bakteriellen ARDS-Modell die pulmonale Inflammation und steigert die Letalität: Im Vergleich zu den Kontrollmäusen sank der paO₂ der Knock-out-Tiere um 14 % (80 $\pm$ 3 vs. 70 $\pm$ 3 mmHg) (Abb. 1A), der paCO₂ stieg um 20 % (44 $\pm$ 2 vs. 53 $\pm$ 2 mmHg), und der Proteingehalt in der BAL war nahe-

zu verdoppelt (3,0 $\pm$ 1,4 vs. 5,2 $\pm$ 1,3 mg/ml). Gegenüber den Kontrolltieren wiesen Knock-out-Mäuse signifikant erhöhte Plasmakonzentrationen proinflammatorischer Zytokine auf: IL-6 war um 300 % erhöht (3747 $\pm$ 1751 vs. 11563 $\pm$ 4318 pg/l, Abb. 1B), MIP-2 um 500 % (1533 $\pm$ 990 vs. 7389 $\pm$ 4921 pg/l, n=8). Histologisch wiesen die Gewebeschnitte der Knock-out-Mäuse einen signifikant erhöhten LIS auf (n=8). Die T-Zell-spezifische HIF-1 α -Deletion führte zu einem signifikant schlechteren Überleben (100 % vs. 75 %) (Abb. 1C).

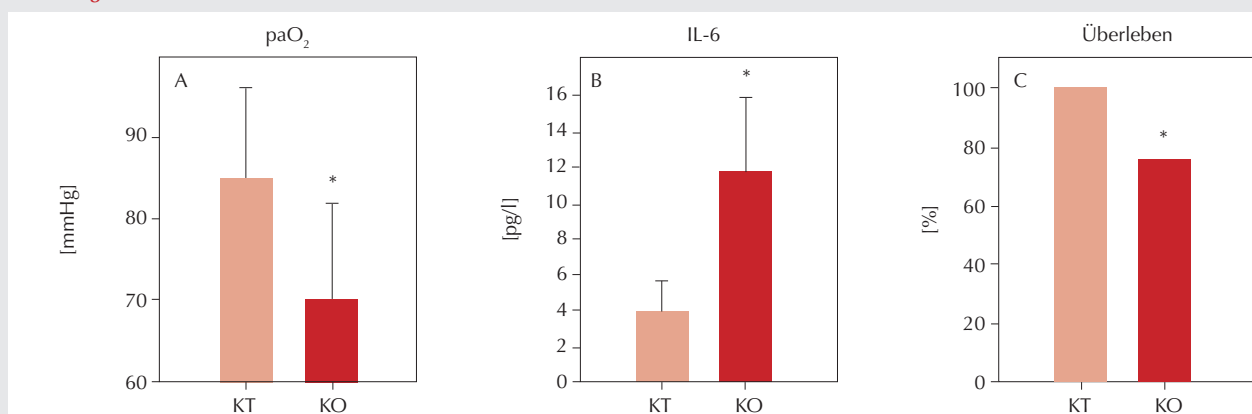
Interpretation

HIF-1 α hat inhibitorische Wirkungen auf T-Zell-Funktionen: In einem nicht-bakteriellen murinen Modell der pulmonalen Inflammation bewirkt eine T-Zell-spezifische HIF-1 α -Deletion eine hyperinflammatorische Reaktion mit erhöhter Zytokinfreisetzung, gesteigerter pulmonaler Permeabilität sowie verschlechtertem Gasaustausch und ist mit einer erhöhten Letalität assoziiert. HIF-1 α hat demzufolge suppressive Wirkungen auf die T-Zell-vermittelte Immunantwort und schützt in dem vorliegenden Modell den Organismus vor einer - potentiell letalen - hyperinflammatorischen Reaktion.

Literatur

1. Sitkovsky M, Lukashev D. Regulation of immune cells by local-tissue oxygen tension: HIF1 alpha and adenosine receptors. *Nat Rev Immunol* 2007;5(9):712-721.
2. Thiel M, Caldwell CC. Targeted deletion of HIF-1alpha gene in T cells prevents their inhibition in hypoxic inflamed tissues and improves septic mice survival. *Plos One* 2007;2(9):e853.

Abbildung 1



Vergleich von T-Zell-spezifischen HIF-1 α -Knock-out-Mäusen (KO) mit Kontrollmäusen (KT) im nicht-infektiösen ARDS: **A)** arterieller PaO₂ (n=15), **B)** IL-6-Plasmakonzentration (n=8) und **C)** 48h-Überleben (n=15). (Ergebnisse als Mittelwerte $\pm$ SEM, *p<0,05).

Das Matrixprotein Biglykan ist essentiell für die Integrität der Ventrikelwand während experimenteller hypertensiver Kardiomyopathie bei der Maus

J. Mersmann¹ · K. Iekushi² · H. Milting³ · S. Dimmeler² · K. Zacharowski¹

- 1 Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie, Klinikum der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität, Frankfurt am Main
- 2 Institut für Kardiovaskuläre Regeneration, Klinikum der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität, Frankfurt am Main
- 3 Herz- und Diabeteszentrum NRW, Erich & Hanna Klessmann-Institut für Kardiovaskuläre Forschung und Entwicklung, Bad Oeynhausen

Korrespondenz:

mersmann@med.uni-frankfurt.de

Fragestellung

Die chronische Erhöhung der Nachlast, wie sie bei der arteriellen Hypertension auftritt, bedingt eine zunächst konzentrische Hypertrophie des linken Ventrikels. Diese kann in der Folge zu Dilatation und Insuffizienz des linken Herzens führen. Biglykan trägt über die Quervernetzung von Kollagen maßgeblich zur mechanischen Stabilität der extrazellulären Matrix des Myokards bei. Eine Biglykan-Defizienz führt nach experimentellem Myokardinfarkt zur Ruptur der Ventrikelwand [1]. Die Hypothese dieser Studie ist, dass eine Biglykan-Defizienz zu einer früheren und/oder stärkeren Dilatation des linken Ventrikels während der hypertensiven Kardiomyopathie führt.

Methodik

Nach Genehmigung durch das Regierungspräsidium Darmstadt wurden 10-14 Wochen alte C57Bl/6J-Wildtyp (wt, n=8)- oder Biglykan-defiziente (*Bgn*^{-/-}, n=14)-Mäuse einer transversen aortalen Konstriktion (TAK) unterzogen. Unter Isoflurannarkose (1,5 Vol.%, FiO₂ 0,5) wurde nach Durchtrennung der Haut und partieller Sternotomie der Aortenbogen zwischen *Truncus brachiocephalicus* und *A. carotis sinistra* über einer 27G Stahlkanüle ligiert [2]. Die Kanüle wurde anschließend sofort entfernt und die Sternotomie und Haut verschlossen. Zur postoperativen Analgesie erhielten die Tiere Buprenorphin (0,05 mg/kg subkutan). Sieben Tage vor der Intervention (d-7) und an Tag 7, 14 und 28 (d7, d14, d28) nach der Intervention wurde eine Echokardiographie unter Isoflurannarkose durchgeführt. Als Parameter der Hypertrophie wurden das Herzgewicht (HG) im Verhältnis zu Körpergewicht (HG/KG) und Länge der Tibia (HG/TL) bestimmt. Der linke Ventrikel wurde nach Exzision schockgefroren. Der Kollagengehalt des Myokards wurde mittels Hydroxyprolinassay bestimmt. Die Daten werden als Mittelwert±Standardfehler von n Messwerten angegeben. Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mittels t-Test oder Zweifaktorieller-ANOVA auf Signifikanz geprüft. P<0,05 wurde als signifikant betrachtet.

Ergebnisse

Während alle wt-Tiere die Intervention überlebten, verstarben 7 von 14 *Bgn*^{-/-}-Tiere bereits während der ersten 60 Minuten nach TAK-Induktion. Die überlebenden *Bgn*^{-/-}-Tiere zeigten eine stärkere Dilatation des linken Ventri-

kels gegenüber wt. Sie zeigten eine signifikant geringere Dicke der Ventrikelwand (Abb. 1A) sowie ein signifikant erhöhtes linksventrikuläres endsystolisches (LVESV, Abb. 1B) und enddiastolisches Volumen. Damit einher geht eine signifikant verringerte Ejektionsfraktion (Abb. 1C) dieser Tiere 28 Tage nach TAK. Keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen ergaben sich im Kollagengehalt des Ventrikels sowie in HG/KG bzw. HG/TL.

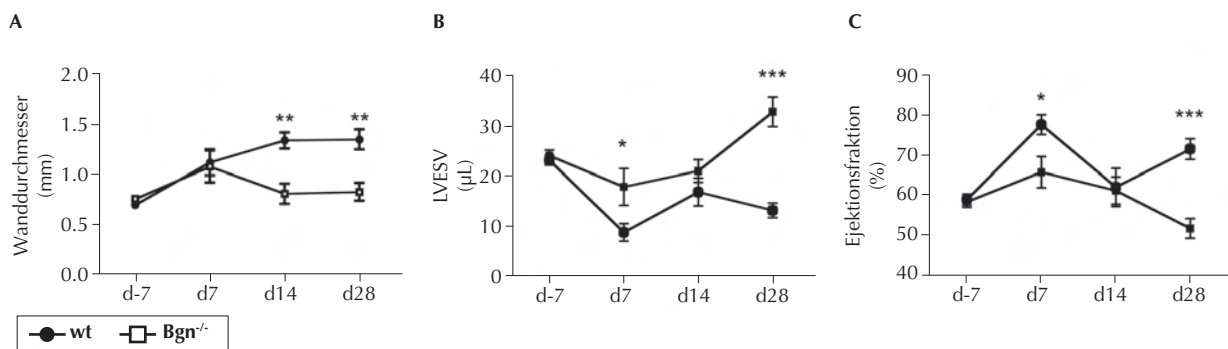
Interpretation

Während die Kollagendeposition des Myokards durch das Fehlen von *Bgn* nicht beeinflusst wird, zeigen *Bgn*^{-/-}-Tiere eine stärkere Dilatation und Einschränkung der Ejektionsfraktion 28 Tage nach experimenteller hypertensiver Kardiomyopathie. Da HG/KG bzw. HG/TL nicht verschieden sind, resultiert dies scheinbar nicht aus einer unterschiedlichen Hypertrophie des Myokards, sondern aus einer verringerten mechanischen Stabilität der Ventrikelwand.

Literatur

1. Westermann D, Mersmann J, Melchior A, Freudenberger T, Petrik C, Schaefer L, et al. Circulation 2008;117:1269-1276.
2. Rockman H, Knowlton KU, Ross J Jr., Chien KR. Circulation 1993;87:14-21.

Abbildung 1



Echokardiographie im Verlauf des Experiments. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 vs. wt. Zwei-faktorielle-ANOVA, n=8(wt)/7(*Bgn*^{-/-}).

Ischämische Remote-Präkonditionierung - Eine neue Option zur perioperativen Organprotektion bei herzchirurgischen Patienten?

P. Meybohm¹ · J. Cremer² · T. Becher¹ · M. Jonigkeit¹ · T. Schuett¹ · D. Maahs¹ · I. Möller¹ · K. Zacharowski³ · M. Steinfath¹ · B. Bein¹

- 1 Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin, Campus Kiel, Christian-Albrechts-Universität Kiel
- 2 Klinik für Herz- und Gefäßchirurgie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel, Christian-Albrechts-Universität Kiel
- 3 Klinik für Anästhesiologie, Klinikum der Johann Wolfgang von Goethe-Universität Frankfurt am Main

Korrespondenz:

meybohm@anaesthesie.uni-kiel.de

Fragestellung

In tierexperimentellen Studien konnte für die ischämische Fern (Remote)-Präkonditionierung die Induktion einer Toleranz gegenüber einem nachfolgenden ischämischen Ereignis nachgewiesen werden [1]. Ebenso führte eine Ischämie/Reperfusion des Unterarms bei Patienten mit koronarer Bypass-Operation postoperativ zur Reduktion des Troponin-I-Anstiegs [2]. Das Ziel dieser Pilotstudie soll sein, erstmalig bei einem breiten Spektrum von herzchirurgischen Eingriffen den Einfluss der ischämischen Remote-Präkonditionierung auf den Myokardschaden und klinische Endpunkte zu untersuchen. Danach soll eine prospektive, randomisierte, multizentrische Phase-III-Studie initiiert werden.

Methodik

Nach Zustimmung der Ethikkommission wurden im Zeitraum von 01/2009-10/2009 70 erwachsene Patienten, die in Allgemeinäs-

thesie (Propofol 4 mg/kg/h; Sufentanil 1 µg/kg/h) mit einem kardiopulmonalen Bypass operiert wurden (Aortokoronare Bypassoperation (n=35), Aorten- oder Mitralklappenersatz (n=12), Aorta-ascendens-Ersatz (n=5) sowie Kombinationseingriff (n=18)), rekrutiert (Studienregistrierungsnummer: NCT00882622). Die Patienten mit Ischämischer Remote-Präkonditionierung (RIPC; n=35) erhielten nach der Narkoseeinleitung am rechten Oberarm mit einer manuellen Blutdruckmanschette 4 Zyklen von jeweils 5 min Ischämie (Aufpumpdruck 20 mmHg höher als der invasiv gemessene arterielle, systolische Blutdruck) und 5 min Reperfusion. Patienten in der Kontrollgruppe (n=35) erhielten ebenfalls eine Blutdruckmanschette, die jedoch nur bis zu einem Druck von 10 mmHg aufgepumpt wurde. Das Bedienen der Manschette erfolgte durch eine Studienassistentin, so dass die beteiligten Personen im Operationssaal und auf der Intensivstation hinsichtlich der Randomisierung geblendet waren. Die Patienten wurden nach der Operation beatmet auf der Intensivstation therapiert. Troponin T wurde präoperativ sowie 0, 12, 24 und 48 h postoperativ bestimmt. Als klinische Endpunkte wurden die Beatmungsdauer, die Intensivstations- und Krankenhausverweildauer, das Auftreten von neuem Vorhofflimmern (Langzeit-EKG für 72 h), das Auftreten von Delir (CAM-ICU Fragebogen für 96 h), Re-Intubation, Wiederaufnahme auf die Intensivstation sowie neue Nierenfunktionsstörungen (Kreatininanstieg >0,3 mg/dl oder >150 % des Ausgangswertes) analysiert. Die Daten sind als Median (25 %; 75 % Quartile) bzw. als Odds Ratio (OR) (95 % CI) dargestellt. Der statistische Vergleich der Gruppen erfolgte mittels Mann-Whitney-Test. Die Häufigkeiten wurden mit dem Chi-Quadrat-Test nach Pearson gerechnet. Ein p<0,05 wurde als signifikant angesehen.

Ergebnisse

Das Patientenalter (Kontrolle vs. RIPC; 68 (55; 73) vs. 70 (60; 73) Jahre), der euroSCORE (3 (2; 5) vs. 4 (2; 6)) und die Bypass-Zeit (139 (101; 177) vs. 126 (102; 158) min) waren vergleichbar. Die RIPC führte zu einem geringeren Troponin T_{max}-Anstieg (0,60 (0,46; 0,97) vs. 0,47 (0,32; 0,77) µg/l; p<0,05; Abb. 1A) und einer kleineren Fläche unter der Troponin-T-Kurve (22,2 (13,7; 32,4) vs. 13,1 (10,7; 27,2) µg/l·48h; p<0,05). Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte sich in der RIPC-Gruppe eine kürzere Beatmungsdauer (15 (11; 21) vs. 12 (10; 18) h; p<0,05) und eine tendenziell reduzierte Intensivstations- (24 (20; 48) vs. 23 (21; 28) h) und Krankenhausverweildauer (12 (9; 15) vs. 10 (8; 13) d). Darüber hinaus war die RIPC mit einem signifikant geringeren Risiko für postoperatives Delir (0,281 (0,080-0,995); p<0,05) und Re-Intubation (0,175 (0,035-0,882); p<0,05) assoziiert (Abb. 1B).

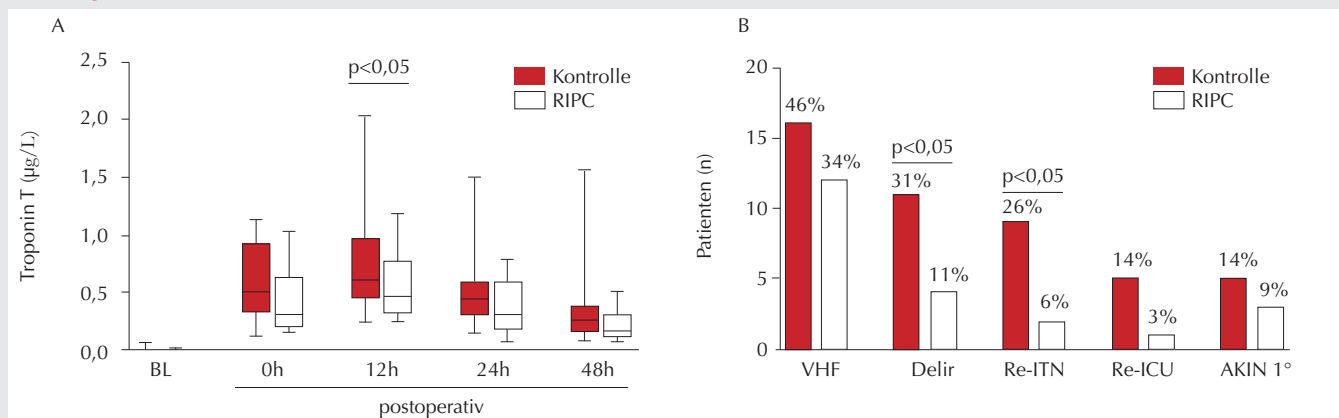
Interpretation

Wir konnten in dieser Pilotstudie erstmalig zeigen, dass neben einer Reduktion des kardialen Troponin T die RIPC auch zu einer Reduktion klinisch relevanter Komplikationen in der postoperativen Phase führt. Damit könnte die RIPC eine neue Option zur perioperativen Organprotektion insbesondere bei herzchirurgischen Patienten darstellen. Eine prospektive, randomisierte, multizentrische Phase-III-Studie wird zurzeit initiiert.

Literatur

1. Kharbanda RK, Nielsen TT, Redington AN. Lancet 2009;374:1557-1565.
2. Hausenloy DJ, Mwamure PK, Venugopal V, et al. Lancet 2007;370:575-579.

Abbildung 1



Netrin-1 reduziert die Entzündungsreaktion bei Zymosan-A-induzierter Peritonitis

V. Mirakaj¹ · D. Gatidou¹ · C. Pötzsch¹ · K. Westner¹ · K. Unertl¹ · P. Rosenberger^{1,2}

¹ Klinik für Anaesthesiologie und Intensivmedizin, Universitätsklinikum Tübingen,

² Klinik für Anaesthesiologie und Intensivmedizin, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

Korrespondenz:

valbona.mirakaj@klinikum.uni-tuebingen.de

Fragestellung

Während der Frühphase einer akuten Entzündung kommt es zu einer Extravasation und Infiltration neutrophiler Granulozyten in das betroffene Gewebe. Dieser Prozess wird vor allem durch Chemokine gesteuert [1]. Netrin-1 gehört zu der Gruppe der Neuronalen-Guidance-Moleküle, die das axonale Wachstum beeinflussen. Während Phasen der Gewebshypoxie reduziert Netrin-1 die Infiltration neutrophiler Granulozyten in das betroffene Gewebsareal [2, 3]. Die mögliche Bedeutung und Regulation von Netrin-1 im Rahmen einer akuten Entzündung ist bisher nicht bekannt.

Methodik

Die Tierversuchsgenehmigung des Regierungspräsidiums Tübingen lag vor. In vitro wurde die Expression von Netrin-1 in Endothelzellen (HMEC-1) und Epithelzellen (A549) nach Stimulation mit TNF- α untersucht sowie die Luciferase-Aktivität eines Netrin-1-Reporters nach TNF- α Stimulation. In vivo wurde eine Peritonitis durch Zymosan-A (ZyA, 1mg/ml, 1ml/Maus i.p.) in CD1-Kontrolltieren und Netrin-1-heterozygoten (*Ntn1*^{+/-})-Mäusen induziert. Zudem wurde in C57BL6-WT- und Adenosin-2B/- (*A2BAR*^{-/-})-Mäusen zeitgleich mit der Zymosan-A-Applikation Netrin-1 (1 μ g) intravenös injiziert. Die Rekrutierung inflammatorischer Zellen in den Peritonealraum wurde mittels Lavage (5ml NaCl 0.9%, 4°C) nach 4 Stunden bestimmt. Zusätzlich wurde die Myeloperoxidase (MPO)-Aktivität, die Konzentration von TNF- α , Interleukin-1 β , Interleukin-6 und Interleukin-8 in der Peritoneallavage ermittelt. Ein Zellausstrich, eine histologische Untersuchung des peritonealen Fettgewebes und des parietalen Peritoneums wurden ebenfalls vorgenommen. Die Daten wurden mittels Student's t-Test und ANOVA evaluiert.

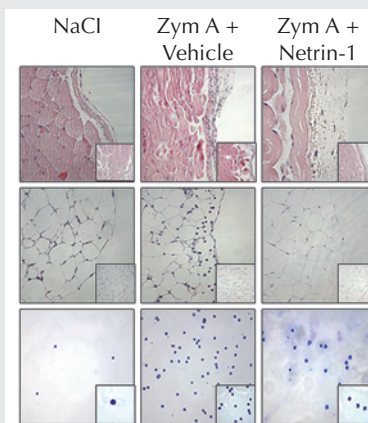
Ergebnisse

Die Stimulation mit TNF- α führte zu einer Reduktion der Netrin-1-Expression in HMEC-1- und A549-Zellen. Die Luciferase-Aktivität des Netrin-1-Reporters wurde durch TNF- α signifikant reduziert. *Ntn1*^{+/-}-Tiere zeigten eine signifikant erhöhte Zellzahl in der Peritoneallavage im Vergleich zu Kontrolltieren. Die MPO-Aktivität und die Konzentration der Zytokine in *Ntn1*^{+/-}-Mäusen waren im Vergleich zu Kontrolltieren ebenfalls signifikant erhöht (pg/ml, TNF- α : CD1 NaCl 5,6 $\pm$ 1,2; CD1 ZyA+Vehikel 39 $\pm$ 6; *Ntn1*^{+/-} NaCl 8,9 $\pm$ 3; *Ntn1*^{+/-} ZyA+Vehikel 67 $\pm$ 11, p<0,05; IL-6: CD1 NaCl 3 $\pm$ 1; CD1 ZyA+Vehikel 1715 $\pm$ 443; *Ntn1*^{+/-} NaCl 9,6 $\pm$ 2; *Ntn1*^{+/-} ZyA+Vehikel 2438 $\pm$ 289, p<0,05). In den Gewebsschnitten fand sich histologisch bei *Ntn1*^{+/-}-Mäusen eine stärker ausgeprägte Entzündungsreaktion als bei CD1-Kontrolltieren. Bei C57BL6-WT-Mäusen kam es nach Zymosan-A-induzierter Peritonitis unter der Netrin-1-Injektion zu einer signifikanten Reduktion der Leukozytenzahl in das Peritoneum (x10⁶; NaCl 0,57 $\pm$ 0,07; ZyA+Vehikel 3,8 $\pm$ 0,2; ZyA+Netrin-1 2,2 $\pm$ 0,1, p<0.05). Dieses Ergebnis konnte sowohl in der MPO-Messung (NaCl 0,1 $\pm$ 0,01; ZyA+Vehikel 1,1 $\pm$ 0,3; ZyA+Netrin-1 0,3 $\pm$ 0,01, p<0.05) wie auch in der Messung der Proteinkonzentration (NaCl 0,5 $\pm$ 0,1; ZyA+Vehikel 1,4 $\pm$ 0,1; ZyA+Netrin-1 0,8 $\pm$ 0,2, p<0.05) bestätigt werden. In den histologischen Gewebsschnitten fand sich unter Netrin-1 eine Reduktion entzündlicher Veränderungen des peritonealen Fettgewebes und des parietalen Peritoneums (Abb. 1). Die Zytokinwerte in der Peritoneallavage waren nach Netrin-1-Injektion signifikant reduziert im Vergleich zu Vehikel behandelten Tieren (pg/ml, TNF- α : NaCl 3 $\pm$ 0,2; ZyA+Vehikel 33 $\pm$ 5; ZyA+Netrin-1 15 $\pm$ 4 p<0,05; IL-1 β : NaCl 37 $\pm$ 24; ZyA+Vehikel 1897 $\pm$ 650; ZyA+Netrin-1 435 $\pm$ 57, p<0,05; IL-6: NaCl 6 $\pm$ 2; ZyA+Vehikel 2970 $\pm$ 617; ZyA+Netrin-1 860 $\pm$ 318, p<0,05; IL-8: NaCl 17 $\pm$ 5; ZyA+Vehikel 3823 $\pm$ 930; ZyA+Netrin-1 1467 $\pm$ 476, p<0,05). Die anti-entzündliche Wirkung von Netrin-1 war bei *A2BAR*^{-/-}-Mäusen nicht nachweisbar, dies zeigte sich bei der Bestimmung der Zellzahl (x10⁶; NaCl 0,26 $\pm$ 0,02; ZyA+Vehikel 3,7 $\pm$ 0,4; ZyA+Netrin-1 3,8 $\pm$ 0,5, p<0.05) und der Bestimmung der MPO-Aktivität (NaCl 0,14 $\pm$ 0,01; ZyA+Vehikel 1,1 $\pm$ 0,3; ZyA+Netrin-1 1,1 $\pm$ 0,1, p<0.05). Auch in den histologischen Schnitten und bei der Bestimmung der Zytokinkonzentrationen war keine Reduktion der peritonealen Entzündung unter Netrin-1 zu beobachten.

Interpretation

Netrin-1 wird durch eine akute Entzündungsreaktion reprimiert. Durch Netrin-1 wird die Infiltration von Entzündungszellen in das betroffene Gewebe reduziert und die Expression von Zytokinen vermindert. Netrin-1 entfaltet bei der Zymosan-A-induzierten Peritonitis eine anti-inflammatorische Wirkung; diese wird durch den Adenosin-2B-Rezeptor vermittelt.

Abbildung



Histologische Gewebsschnitte des parietalen Peritoneums und des peritonealen Fettgewebes sowie Zellausstriche des peritonealen Exsudates nach NaCl i.p.-Injektion, Zymosan-A-induzierter Peritonitis und Vehikel oder Netrin-1-Injektion i.v. in WT-Mäusen.

Literatur

1. Baggiolini, M. (1998) Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 392:565-568.
2. Ly, N. P., Komatsuzaki, K., Fraser, I. P., Tseng, A. A., Prodhan, P., Moore, K. J., and Kinane, T. B. (2005) Netrin-1 inhibits leukocyte migration in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:14729-14734.
3. Rosenberger, P., Schwab, J. M., Mirakaj, V., Morote-Garcia, J. M., Masekowsky, E., Mager, A., Unertl, K. E., and Eltzschig, H. K. (2009) Hypoxia-Inducible Netrin-1 dampens Inflammation caused by Hypoxia. *Nature immunology* 10(2):195-202.

Einfluss unterschiedlicher PEEP-Strategien auf die regionalen Ventilations- und Perfusionsverhältnisse bei experimentellem Lungenschaden im Schweinemodell

T. Muders¹ · H. Lupschen¹ · T. Meier² · S. Leonhardt³ · C. Putensen¹ · H. Wrigge¹

1 Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin, Universität Bonn

2 Klinik für Anästhesiologie, Universität Schleswig-Holstein, Campus Lübeck

3 Lehrstuhl für Medizinische Informationstechnik, Helmholtz Institut, RWTH Aachen

Korrespondenz: t.muders@web.de

Fragestellung

Lungenprotektive Beatmungskonzepte sollen das Risiko beatmungsassoziierter Lungenschädigungen bei Patienten mit akutem Lungenversagen (Acute Respiratory Distress Syndrome) reduzieren. Obwohl die Verwendung eines positiven end-expiratorischen Druckes (PEEP) generell als Bestandteil lungenprotektiver Beatmungskonzepte gilt, gibt es über die Höhe des optimalen PEEP-Niveaus keinen Konsens [1,2] und keinen Nachweis eines generellen Überlebensvorteils für einzelne PEEP-Strategien [1,2]. Die elektrische Impedanztomographie (EIT) ermöglicht neuerdings durch Messung der zeitlichen Homogenität der regionalen Ventilation (Standardabweichung des Regional Ventilation Delay Index, SD_{RVD}) die bettseitige, nichtinvasive Quantifizierung der tidalen Rekrutierung [3], einer der Hauptrisikofaktoren für beatmungsassoziierte Lungenschäden. Diese Information kann zur individuellen Optimierung des PEEP genutzt werden. Ziel der hier vorgestellten Studie ist es, den Einfluss verschiedener PEEP Strategien auf die regionalen Ventilations- und Perfusionsverhältnisse der Lunge experimentell zu untersuchen.

Methodik

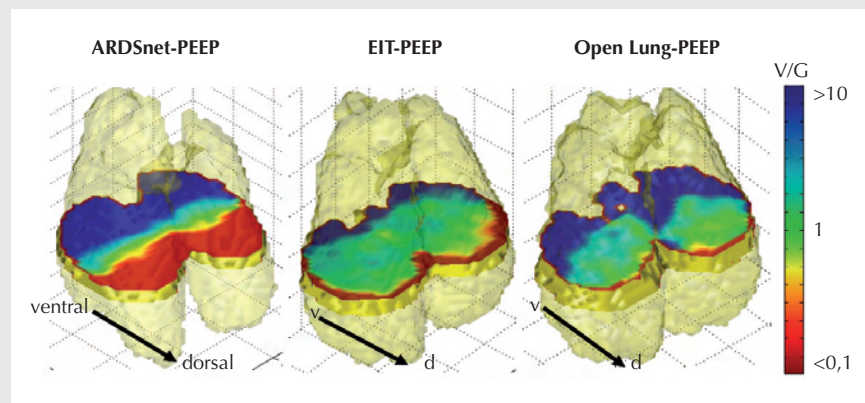
Nach Zustimmung der Tierschutzkommission wurde bei 12 anästhesierten und volumenkontrolliert (6-8 ml/kg KG) beatmeten Schweinen (30-35 kg) eine akute Lungenschädigung (intraabdomineller Hypertension durch intraabd. Infusion, 20 cm H₂O, i.v. Ölsäureinjektion) induziert [4]. PEEP und FiO₂ wurden zunächst entsprechend der niedrigeren PEEP-Tabelle des ARDSnet-Protokolls eingestellt (→ „ARDSnet PEEP“). Dann wurde nach Rekrutierung der Lunge bei einer FiO₂ von 1 der PEEP von 30 cmH₂O schrittweise um je 2 cmH₂O gesenkt. Dabei wurden PaO₂ (mittels Blutgasanalyse) und SDRVD (mittels EIT) bestimmt. Es wurden die PEEP-Niveaus ermittelt, welche einen signifikanten Abfall

Tabelle 1

PEEP, Shuntperfusion, Totraumventilation.

	ARDSnet	EIT	OL	ANOVA
PEEP [cm H ₂ O]	10 ± 3 \$+	22 ± 3 #+	25 ± 4 # \$	*
Shunt-Perfusion [ml/min]	51 ± 19 \$+	24 ± 24 #	21 ± 27 #	*
Totraum-Ventilation [ml/min]	43 ± 20 \$+	26 ± 24 #	28 ± 23 #	*

Abbildung 1



Ventilations/Perfusionsverhältnisse der Lunge $p < 0.05$ vs. ARDSnet, \$ $p < 0.05$ vs. EIT, + $p < 0.05$ vs. OL (post hoc).

des PaO₂ (→ „OL PEEP“ (Open Lung)) bzw. einen Anstieg der SDRVD (→ „EIT PEEP“) verhinderten. Die regionale Verteilung der pulmonalen Perfusion (V) und Ventilation (Q) wurde mittels „Single Photon Emission Computed Tomography“ (SPECT) jeweils unter Beatmung mit dem „ARDSnet-“, „OL-“ und „EIT-PEEP“ in randomisierter Reihenfolge ermittelt. Die statistische Analyse erfolgte mittels Varianzanalyse (ANOVA) und Post-hoc-Tests (Newman-Keuls).

Ergebnisse

Die drei Strategien führten zu signifikant unterschiedlichen PEEP-Niveaus (Tab.1). Die Verwendung des „EIT-PEEP“ führte im Vergleich zum „OL-“ und „ARDSnet-PEEP“ zum homogensten V/Q-Verhältnis (Abb.1). Das totraumventilierte Lungenvolumen (Abb.1, blaues Areal) war bei „OL-“ und „ARDSnet-PEEP“ gleichermaßen erhöht. Beatmung mit dem „ARDSnet-PEEP“ ging hingegen mit einer Zunahme der pulmonalen Shunt-Perfusion und Totraumventilation einher (Tab.1). Pulmonaler Blutfluss und Herzzeitvolumen waren bei vergleichbarem intrathorakalem Blutvolumen unter „OL-“ und „EIT-PEEP“ im

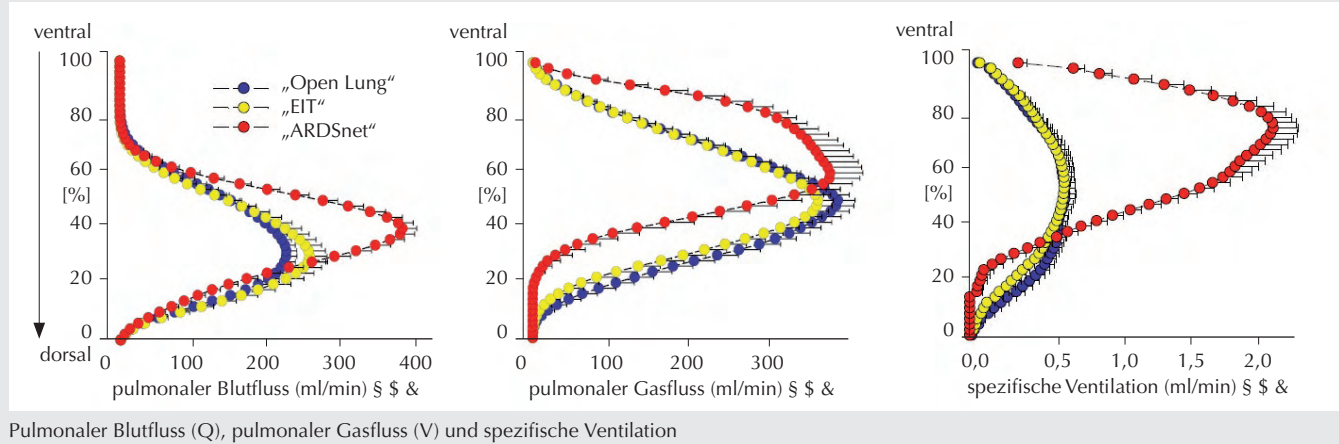
Vergleich zum „ARDSnet-PEEP“ reduziert. Die relative regionale Verteilung der Perfusion war jedoch bei allen drei Beatmungsstrategien ähnlich (Abb.2, links).

Hingegen zeigte sich bei Verwendung des „ARDSnet-PEEP“ im Vergleich zu beiden anderen Beatmungsformen eine Umverteilung der Ventilation nach ventral (Abb.2, Mitte) sowie eine deutliche Steigerung der ventralen spezifischen Ventilation (Ventilation pro Lungenvolumen) (Abb.2, rechts).

Interpretation

Im Vergleich zum ARDSnet-Protokoll führt im hier verwendeten Modell die EITbasierte PEEP-Einstellung zu höheren PEEP-Niveaus und reduziert die pulmonale Shuntperfusion und Totraumventilation. Die Reduktion der Shuntperfusion scheint durch eine PEEP-bedingte Verminderung der globalen Perfusion, die Abnahme der Totraumventilation durch eine Umverteilung der Ventilation bedingt. Die Anwendung des Open-Lung-Konzepts bewirkt eine weitere Erhöhung des PEEP-Niveaus ohne zusätzliche Verbesserung der V/Q-Verhältnisse, führt jedoch zu einer Zunahme des totraumventilierten Lungenvolumens.

Abbildung 2



mens. Dies spricht für eine statische Überdehnung der Lunge mit geringer spezifischer Ventilation, während die Anwendung des ARDSnet-Protokolls eher eine dynamische Überdehnung mit hoher spezifischer Ventilation zur Folge hat.

Literatur

1. Brower RG, Lanken PN, MacIntyre N, Matthay MA, Morris A, Ancukiewicz M, et al. Higher versus lower positive end-expiratory pressures in patients with the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 2004;351: 327-336.
2. Putensen C, Theuerkauf N, Zinserling J, Wrigge H, Pelosi P. Meta-analysis: ventilation strategies and outcomes of the acute respiratory distress syndrome and acute lung injury. *Ann Intern Med* 2009;151:566-576.
3. Muders T, Zinserling J, Lüpschen H, Putensen C, Wrigge H. Detektion tidaler Rekrutierung mittels elektrischer Impedanztomographie. *Anaesth Intensivmed* 2009;50: WAT Abstract.
4. Varelmann D, Muders T, Zinserling J, Guenther U, Magnusson A, Hedenstierna G, et al. Cardiorespiratory effects of spontaneous breathing in two different models of experimental ALI. *Crit Care* 2008;12:R135.

Der Rezeptor für den aktivierten Komplementfaktor V (C5a) ist im post-ischämischen Myokard der Maus induziert und spielt eine kausale Rolle für den Reperfusionsschaden

M. Müller¹ · Ch. Herzog¹ · J. Larmann¹ · J.E. Gessner² · D. Hilfinger-Kleiner³ · M. Schmitz⁴ · G. Theilmeier¹

¹ Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin, Medizinische Hochschule Hannover

² Klinik für Immunologie und Rheumatologie, Medizinische Hochschule Hannover

³ Klinik für Kardiologie und Angiologie, Medizinische Hochschule Hannover

⁴ Institut für Anatomie, Westfälische Wilhelms-Universität Münster

Korrespondenz:

mueller.martin2@mh-hannover.de

Fragestellung

Myokardischämien stellen eine vitale Bedrohung für Patienten dar, die sich einer größeren Operation unterziehen und kardiovaskuläre Risikofaktoren haben [1]. Die rasche Reperfusion nach einem stattgehabten Infarkt ist nach wie vor die Therapie der Wahl. Die Entzündungsreaktion im post-ischämischen Myokard, auch Reperfusionsschaden genannt, ist zu einem großen Teil für den Verlust von Herzmuskelgewebe nach einem Infarkt verantwortlich [2]. Der Rezeptor für den aktivierten Komplementfaktor V (C5aR) ist kausal an der Entstehung der septischen Kardiomyopathie beteiligt [3], seine Beteiligung am Reperfusionsschaden des Myokards ist dagegen unklar. Wir stellten daher die Frage, ob die Expression von C5aR im Mausmodell der Myokardischämie und Reperfusion (MI/R) reguliert wird und ob der C5aR zum Reperfusionsschaden beiträgt.

Methodik

Die Tierversuche wurden durch die zuständige Tierschutzkommission genehmigt. Alters- und geschlechtsgleiche Gruppen C5aR-defizienter (C5aR^{-/-})- und Wildtyp (WT)-Mäuse wurden in Isofluran-Anästhesie (1,0-1,5 Volumen%) endotracheal intubiert und normoventiliert. Um eine kausale Rolle des C5aR für den Ischämie-bedingten myokardialen Schaden zu untersuchen, wurden die Tiere dem MI/R-Modell unterzogen. Der Ramus interventricularis anterior der linken Koronararterie wurde durch Ligatur über einen Polyethylen-Schlauch (ED 0.1 mm), für 30 Minuten okkludiert und dann für 24 Stunden wieder freigegeben. Die Infarktgröße als Anteil der Risikoareale (AAR) wurde in fünf gleichmäßigen Schnitten mittels 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)/Coomassie-Blau-Färbung morphometrisch quantifiziert [2]. Die Expression von C5aR, Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF α),

Interleukin-1 β (IL-1 β), Interleukin-6 (IL-6), den TNF α -Rezeptoren (TNFR-1 und -2) sowie den Adhäsionsmolekülen Inter Cellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) und Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) wurde mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion bestimmt, um zu überprüfen, ob die post-ischämische Inflammation beeinflusst wird. Die Quantifizierung der rekrutierten Leukozyten wurde an Paraformaldehyd-fixierten, Paraffin-eingebetteten und Hämatoxylin- & Eosin-gefärbten Gewebeschnitten durchgeführt. Die Daten wurden mittels Mann-Whitney-U-Test auf statistische Unterschiede hin untersucht und werden als Mittelwert $\pm$ Standardfehler präsentiert. $P < 0,05$ wurde als Signifikanzniveau gewählt.

Ergebnisse

Die Expression des C5aR war nach MI/R im transient ischämischen Myokard im Vergleich zum nicht-ischämischen Myokard auf mRNA-Ebene 2,8-fach erhöht (WT vs. C5aR^{-/-}, $n=4/4$, $p < 0,05$). Die Infarktgröße bei WT-Mäusen nach MI/R betrug 45 ± 3 % der AAR, während in C5aR^{-/-}-Mäusen die Infarktgröße nur 26 ± 2 % der AAR einnahm (WT vs. C5aR^{-/-}, $n=7/5$, $p < 0,05$). Die mRNAs von TNF α , IL-1 β , IL-6 sowie der TNF-Rezeptoren waren zwischen den beiden Genotypen nicht signifikant unterschiedlich. Lediglich für die VCAM-1-Expression des ischämischen Myokards zeigte sich gegenüber dem nicht ischämischen Muskelgewebe in den C5aR^{-/-}-Tieren ein Trend zu einer Reduktion ($1,29 \pm 0,57$ vs. $0,47 \pm 0,06$, WT vs. C5aR^{-/-}, $n=4/7$, $p=0,07$). Die resultierende Rekrutierung von Leukozyten in das Infarktareal war in C5aR^{-/-}-Mäusen gegenüber der Kontrollgruppe signifikant reduziert ($9,4 \pm 0,7$ vs. $6,7 \pm 0,6$, Zellen/ μm^2 , WT vs. C5aR^{-/-}, $n=6/6$, $p < 0,05$).

Interpretation

Nach MI/R kommt es zu einer signifikanten Induktion des C5aR im ischämischen Myokard im Vergleich zum nicht-ischämischen Myokard. Eine genetische Defizienz des C5a-Rezeptors vermittelt eine deutliche kardioprotektive Wirkung in einem In-vivo-Mausmodell der MI/R. Diese ist verbunden mit einer Reduktion der Rekrutierung inflammatorischer Zellen ins ischämische Myokard. Dieser Effekt wird vordergründig nicht durch eine transkriptionelle Regulation der proinflammatorischen Zytokine TNF α , IL-1 β und IL-6 vermittelt, wobei Effekte auf die Zytokinproteinmenge und -aktivität nicht ausgeschlossen werden können. Auch die Expression der Adhäsionsmoleküle der Immunglobulin-G-Superfamilie (ICAM-1 und VCAM-1) ist - wenn überhaupt - nur partiell C5aR-abhängig. Die genauen Mechanismen hierfür sind Gegenstand laufender Untersuchungen. Insgesamt deuten unsere

Daten darauf hin, dass der C5a-Rezeptor ein attraktives therapeutisches Target für die Behandlung des Reperfusionsschadens nach MI/R darstellt.

eNOS vermittelt das erste und iNOS das zweite Fenster der Desfluran-induzierten Präkonditionierung gegen Myokardinfarkt

A. Redel · J. Stumpner · M. Lange · N. Roewer · F. Kehl

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

Korrespondenz:

Redel_A@klinik.uni-wuerzburg.de

Fragestellung

Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS) sind am ersten Fenster der Desfluran-induzierten Präkonditionierung (EF-APC) gegen Myokardinfarkt beteiligt [1]. Die Rolle der NOS-Isoformen für beide Fenster der APC ist unklar. Wir prüften die Hypothese, dass die endotheliale NOS (eNOS) das erste und die induzierbare NOS (iNOS) das zweite (ZF-APC) Fenster der APC vermittelt.

Methodik

Die Tierversuchsgenehmigung der zuständigen Landesbehörde lag vor. Männliche 8-12 Wochen alte C57BL/6 (wt, n=61), eNOS-gendeletierte [2] (eNOS^{-/-}, n=21) und iNOS-gendeletierte³ (iNOS^{-/-}, n=21) Mäuse wurden in 2 Versuchsblöcken randomisiert 6 bzw. 9 Gruppen zugeteilt. Alle Tiere wurden mit Pentobarbital narkotisiert, 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 Äquilibrationsphase wurden Baseline-Werte erfasst. Alle Tiere wurden einer 45-minütigen Koronararterienokklusion (CAO) und einer 3-stündigen Reperfusion unterzogen. Zur Charakterisierung des ZF-APC (Versuchsblock 1) wurde bei wt-Tieren für 15 min 1,0 MAC Desfluran entweder 30 min, 12 h, 24 h, 48 h oder 96 h vor CAO appliziert. In Versuchsblock 2 erhielten wt-, eNOS^{-/-}- und iNOS^{-/-}-Tiere entweder 30 min (erstes Fenster) oder 48 h (zweites Fenster) vor CAO für 15 min 1,0 MAC Desfluran. Die Tiere der jeweiligen Kontrollgruppe erhielten vor CAO keine weitere Behandlung. Die Herzinfarktgröße (IS=Infarktareal/Ischämieareal) wurde gravito-planimetrisch nach Färbung mit Evans Blue und Triphenyltetrazoliumchlorid bestimmt.

Literatur

1. Poldermans et al. Am College Cardiology, Vol. 51, No. 20, 2008.

Die statistische Analyse erfolgte mittels ANOVA- und Post-hoc-Duncan-Test, angegeben sind Mittelwert±SEM, *p<0,05.

Ergebnisse

Die hämodynamischen Parameter nach Äquilibration sowie das Ischämieareal unterschieden sich zwischen den Gruppen nicht. Die IS betrug in der wt-Kontrollgruppe 148±6 % und wurde signifikant (*p<0,05) reduziert, wenn Desfluran 30 min (9±2 %*) oder 48 h (14±3 %*) vor CAO appliziert wurde. Die Applikation von Desfluran 12 h (42±8%), 24 h (36±7 %) oder 96 h (37±11 %) vor CAO führte bei wt-Tieren zu keiner signifikanten Reduktion der IS. Die IS unterschied sich in der eNOS^{-/-} (52±5 %) und iNOS^{-/-} (46±4 %) Kontrollgruppe nicht von der wt-Kontrollgruppe 2 (50±4 %). Die IS wurde signifikant reduziert, wenn Desfluran bei wt-Tieren 30 min (10±2%*) oder 48h (16±3 %*), bei eNOS^{-/-}-Tieren 48 h (21±5 %*) und bei iNOS^{-/-}-Tieren 30 min (13±2 %*) vor CAO appliziert wurde. Die Applikation von Desfluran 30 min vor CAO bei eNOS^{-/-} (60±4 %) Tieren und 48 h vor CAO bei iNOS^{-/-}-Tieren (48±8 %) führte zu keiner signifikanten Reduktion der IS im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe (Abb. 1).

2. Theilmeier et al. Circulation 2006;114:1403-1409.
3. Niederbichler et al. Exp Med, Vol. 203, No. 1, January 23, 2006.

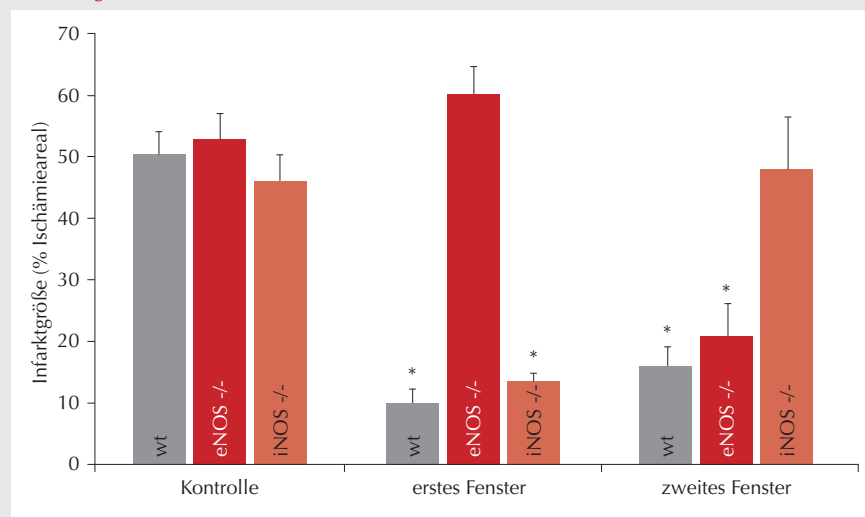
Interpretation

In dieser Untersuchung wurde erstmals das zweite Fenster der APC im murinen Modell des akuten Myokardinfarkts charakterisiert, welches 48 h, aber nicht 12 h, 24 h und 96 h nach Präkonditionierung nachweisbar war. Das erste Fenster der APC war bei eNOS-, nicht aber bei iNOS-gendeletierten Tieren aufgehoben, das zweite Fenster der APC war hingegen bei iNOS-, nicht aber bei eNOS-gendeletierten Tieren aufgehoben. Somit scheint eNOS eine wichtige Rolle bei der Vermittlung des ersten, aber nicht des zweiten Fensters der APC zu spielen, wohingegen iNOS zur Vermittlung des zweiten, aber nicht des ersten Fensters der APC notwendig ist.

Literatur

1. Smul, et al. Anesthesiology 2006;105:719.
2. Huang, et al. Nature 1995;377:239.
3. Laubach, et al. PNAS 1995;92:10688.

Abbildung



Infarktgröße (Infarktareal/Ischämieareal) in Prozent. Angegeben ist Mittelwert ± SEM. * signifikant (p<0,05) verschieden von Kontrolle.

Thiopental wirkt in humanen SK-N-SH-Zellen in vitro zytoprotektiv durch die Induktion einer Hitzeschockantwort

M. Roesslein¹ · C. Froehlich² · V. Miltenberger³ · T. Loop²

¹ Klinik für Anaesthesiologie, Ludwigs-Maximilians-Universität München

² Anaesthesiologische Universitätsklinik,

³ Department für Orthopädie und Traumatologie, Universitätsklinikum Freiburg Albert-Ludwigs-Universität Freiburg

Korrespondenz: martin.roesslein@web.de

Fragestellung

Neben den hypnotischen Wirkungen werden für Barbiturate sowohl immunsuppressive als auch neuroprotektive Eigenschaften beschrieben [1]. Ein der neuronalen Protektion zugrunde liegender molekularer Mechanismus ist bislang noch nicht geklärt. Frühere eigene Untersuchungen konnten zytoprotektive Eigenschaften von Thiopental an humanen T-Lymphozyten über die Induktion einer sogenannten Hitzeschockantwort (HSA) nachweisen [2]. Die HSA, die durch die Bindung des aktivierten Hitze-Schock-Faktors (HSF)-1 an ein Hitze-Schock-Element (HSE) und die

Expression von verschiedenen Hitzeschockproteinen (HSP) reguliert wird, besitzt neben zyto- auch organprotektive Eigenschaften [3]. Es war die Hypothese dieser Untersuchung, dass Thiopental auch in einem neuronalen humanen Zellmodell 1) die HSA induziert und 2) diese kausal an der Thiopental-vermittelten Zytoprotektion in vitro beteiligt ist.

Methodik

Humane SK-N-SH-Zellen wurden mit Thiopental (T, 100, 300, 500 µg/ml bis zu 4 h) oder anderen intravenösen Anästhetika (Etomidat, Ketamin, Midazolam, Propofol und Pentobarbital) inkubiert und anschließend die Apoptose mit Staurosporin (S, 2 µM, 4 h) induziert. Die DNA-Bindungsaktivität von HSF-1 wurde mittels „Electrophoretic Mobility Shift Assay“ (EMSA) und die mRNA-Expression der HSP-27, -32, -70 und -90 mittels „Northern-Blot“ analysiert. Der Einfluss von T auf die Phosphorylierung von HSF-1, die Proteinexpression von Hsp-70 und die Prozessierung der Caspase-3 wurden mittels „Western-Blot“ untersucht. Die Messung der Caspase-3-Aktivität erfolgte mittels fluorogenem Assay (Ac-DEVD-AMC-Substrat). Zum Nachweis der T-vermittelten Zytoprotektion wurden die Zellen vor der T-Inkubation mit dem HSA-Synthese-Inhibitor-KNK437 (100µM, 24h) vorinkubiert oder mit gegen HSP-70 gerich-

teter „small interfering“-RNA (siRNA) durch Elektroporation transfiziert. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert±Standardabweichung angegeben und statistisch mittels Varianzanalyse (ANOVA mit Student-Newman-Keuls-post-hoc-Test, Signifikanzniveau $p<0.05$) verglichen.

Ergebnisse

Die Inkubation mit T führte zu einer zeit- und dosisabhängigen Induktion der HSA, nachweisbar an einer Phosphorylierung des HSF-1 (Abb. A), der Aktivierung der HSF-1/HSE-Bindung (Abb. B) und der Expression verschiedener HSP auf mRNA- (HSP27, HSP-70, HSP-90, nicht aber HSP-32, Abb. C) sowie Protein-Niveau (HSP-70). Andere Anästhetika hatten keinen Einfluß auf die HSF-1-Aktivierung. Nach T-Inkubation kam es zu einer Abnahme der S-induzierten Caspase-3-Aktivität ($0,55\pm0,11$ „Relative Fluorescent Units“ (RFU) (S) vs. $0,21\pm0,10$ RFU (T 100 µg/ml + S) und $0,04\pm0,03$ (T 300 µg/ml + S); $n=6$) sowie zu einer Abnahme der Prozessierung der Pro-Caspase-3 und von PARP. Eine Hemmung der HSA mit KNK437 hob die T-vermittelte Caspase-3-Aktivitätshemmung auf ($0,52\pm0,12$ RFU (KNK + T 100 µg/ml + S) und $0,21\pm0,08$ RFU (KNK + T 300 µg/ml + S); $n=6$). Die Transfektion der Zellen mit gegen HSP-70 gerichteter siRNA führte nicht signifikant, aber im Trend zu einer Aufhebung der T-vermittelten Abnahme der Caspase-3-Aktivität.

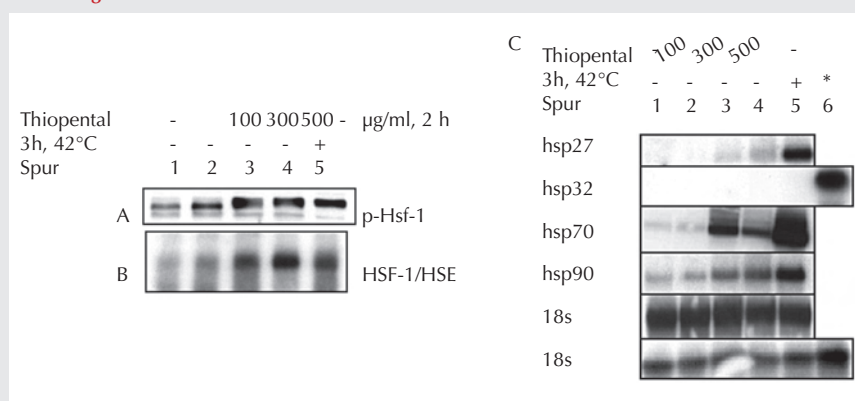
Interpretation

Thiopental vermittelt Zytoprotektion durch die Induktion einer HSA mit verschiedenen HSP in einer humanen neuronalen Zelllinie.

Literatur

1. 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.
2. Roesslein M, Schibilsky D, Muller L, Goebel U, Schwer C, Humar M, et al. Thiopental protects human T Lymphocytes from Apoptosis in Vitro via the Expression of Heat Shock Protein 70. J Pharmacol Exp Ther 2008;325:217-225.
3. Brummer-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.

Abbildung



Effekt von Thiopental auf die Phosphorylierung von Hsf-1 (obere Bande, A, Western-Blot), die HSF-1/HSE-Bindung (B, EMSA) und die transkriptionelle Expression verschiedener Hsp's (C, Northern-Blot; *: Positiv-Kontrolle für hsp32: post-hämorrhagische Ratten-Leber). Die Ergebnisse repräsentieren jeweils ≥ 5 verschiedene Experimente.

26. - 27.02.2010 · Würzburg

24. Wissenschaftliche Arbeitstage der DGAI

Die zytoprotektiven Wirkungen von Carbon-monoxide-releasing-molecule-2 (CORM-2) werden in vitro über eine Induktion der Hitzeschockantwort vermittelt

N. Schallner · T. Loop · U. Göbel

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

Korrespondenz:

nils.schallner@uniklinik-freiburg.de

Fragestellung

Inhalatives Kohlenmonoxid (CO) vermittelt über die Induktion von Hitzeschockproteinen (HSP) antiinflammatorische und antiapoptotische Wirkungen, die in der Lunge während eines kardiopulmonalen Bypasses im TiermodeLL protektiv sind [1,2]. Das lösliche Molekül Tricarbonyldichlororuthenium (CORM-2), das CO freisetzen kann, besitzt ebenfalls protektive Eigenschaften in der Lunge [3]. Der molekulare Mechanismus der zytoprotektiven Eigenschaften von CORM-2 ist ungeklärt. Die Hypothesen dieser Untersuchung waren, dass erstens CORM-2 zytoprotektive Eigenschaften in Lungenzellen besitzt und zweitens diese über eine Hitzeschockantwort vermittelt werden.

Methodik

Embryonale bovine Lungenzellen (DSMZ, Kat. Nr. ACC 192) wurden bis zu einer 90%igen Konfluenz kultiviert. Nach Inkubation mit CORM-2 (50 µM, 15 min) erfolgte die Induktion der Apoptose durch Staurosporin (S, 2 µM, 2 h). Die Analyse der Apoptose erfolgte mittels Durchflusszytometrie (FACS-Calibur®) nach Annexin-V-FITC-Färbung, der Caspase-3-Aktivität mittels fluorogenen Assay (Ac-DEVD-AMC-Substrat) und der Degradation der Procaspase-3 mittels Western-Blot. Die Analyse des Hitzeschockfaktors 1 (HSF-1) erfolgte im Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA). Die mRNA-Expression für HSP-27, -32, -70 und -90 wurde durch Northern-Blot nachgewiesen. Die Messwerte wurden statistisch mit einer Varianzanalyse (ANOVA und Holm-Sidak-Test; Signifikanzniveau $p < 0,05$) verglichen.

Abbildung 1

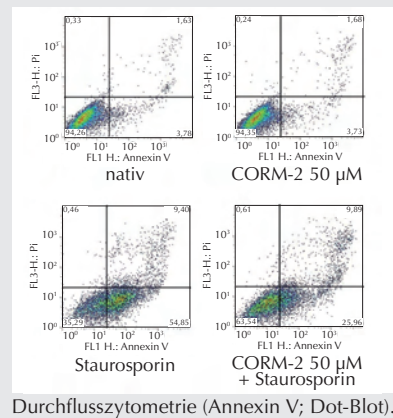
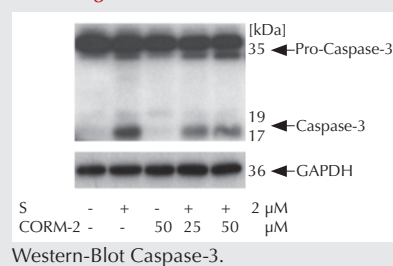


Abbildung 3



Ergebnisse

CORM-2 reduzierte dosisabhängig die S-induzierte Apoptose (Abb.1+2; Tab.1). Die Spaltung der Procaspase-3 und die Caspase-3-Aktivität waren durch CORM-2-Vorbehandlung reduziert (Abb.3, Tab. 1). CORM-2 induzierte die DNA-Bindung von HSF-1, eine mRNA-Expression für HSP-27, -32, -70 und -90 konnte nicht nachgewiesen werden (Abb. 4). Die Inkubation mit den Inhibitoren KNK437 (Bindung von HSF-1; 100 µM, 20 h) oder 17-AAG (HSP-90; 5 µM, 20 h) verminderte den antiapoptotischen Effekt von CORM-2 partiell bzw. vollständig (Tab.1). Die Blockade der endogenen CO-Produktion durch den Hämoxygenase-Inhibitor Zinn-Protoporphyrin IX (SnPP IX 20 µM, 1 h) hatte keinen Effekt (Tab.1).

Abbildung 2

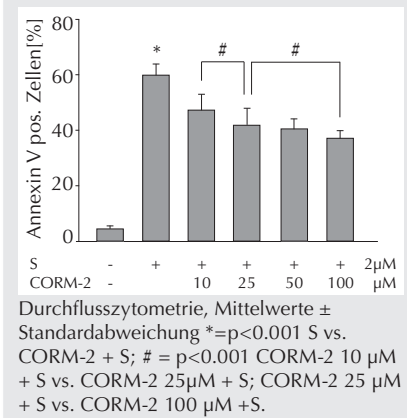
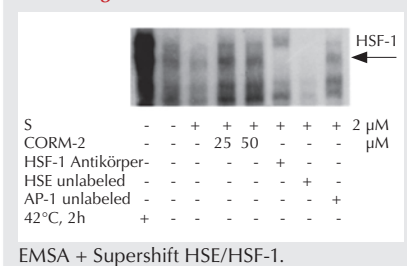


Abbildung 4



Interpretation

CORM-2 wirkt durch das freigesetzte CO in vitro antiapoptotisch und zytoprotektiv. Unsere Ergebnisse bestätigen die Hypothese, dass dieser zytoprotektive Effekt über die Induktion der Hitzeschockantwort vermittelt wird.

Literatur

- Goebel, et al. Carbon monoxide inhalation reduces pulmonary inflammatory response during cardiopulmonary bypass in pigs. *Anesthesiology* 2008;108:1025-1036.
- Goebel, et al. Protective effects of inhaled carbon monoxide in pig lungs during cardiopulmonary bypass are mediated via an induction of the heat shock response. *Br J Anaesth* 2009;103:173-184.
- Sun B, et al. Role of CO-releasing molecules liberated CO in attenuating leukocytes sequestration and inflammatory responses in the lung of thermally injured mice. *J Surg Res* 2007;139:128-135.

Tabelle 1

Annexin-V-positive-Zellen [in % der Gesamtzellzahl] und Caspase-3-Aktivität [RFU]; Mittelwert ± Stabw.

* = $p < 0.001$ S vs. CORM-2 + S; # = $p < 0.001$ Inhibitoren + CORM-2 + S vs. CORM-2 + S.

	nativ	CORM-2 50 µM	S 2 µM	CORM-2 + S 2 µM	KNK437 + CORM + S	17-AAG + CORM + S	SnPP IX + CORM + S
Annexin V-FITC [%]	4,3±1,1	5,7±2,3	60,1±3,8	40,3±3,8 *	51,0±3,7 #	66,8±2,1 #	41,4±3
Caspase-3 Aktivität [RFU]	22,8±8,0	18,9±10,1	92,0±15,5	60±14,6 *	180±38 #	240±56 #	67,3±4,5

Phosphodiesterase-IV-Hemmer verbessert die kapilläre Schrankenstörung und Mikrozirkulation bei der LPS-induzierten Inflammation der Ratte

M.A. Schick¹ · C. Wunder¹ · N. Roewer¹ · C.T. Germer² · J. Waschke³ · N. Schlegel²

- 1 Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie, Universitätsklinikum Würzburg
- 2 Chirurgische Klinik und Poliklinik I, Universitätsklinikum Würzburg
- 3 Institut für Anatomie und Zellbiologie, Universität Würzburg

Korrespondenz:

schick_m@klinik.uni-wuerzburg.de

Fragestellung

Mikrozirkulationsstörungen in der Sepsis werden durch kapilläre Schrankenstörungen mit verursacht. Ein solcher Zusammenbruch der Endothelbarriere kann sowohl durch das bakterielle Lipopolysaccharid (LPS) als auch durch proinflammatorische Zytokine wie Tumor-necrosis-factor- α (TNF- α) verursacht werden. Es wurde in vitro und in vivo gezeigt, dass der LPS- und TNF- α -induzierte Zusammenbruch der Endothelbarriere durch einen Abfall intrazellulärer endothelialer cAMP-Spiegel ausgelöst wird und durch eine pharmakologische Erhöhung gehemmt werden kann [1,2]. In der aktuellen Studie wurde die Hypothese getestet, ob eine pharmakologische Anhebung intrazellulärer cAMP-Spiegel durch eine systemische Applikation eines Phosphodiesterase-IV-Hemmers (PDH) während einer schweren Inflammation der Ratte zur Verbesserung der Mikrozirkulation und zu einer Verminderung der kapillären Schrankenstörung führen kann.

Methodik

Nach behördlicher Genehmigung wurden männliche Sprague-Dawley-Ratten (385 ± 25 g KG) mit 1,5 Vol% Isofluran anästhesiert und die linke A. carotis zur kontinuierlichen Blutdruckmessung, die rechte V. jugularis interna

zur Infusionstherapie und ZVD-Messung kanüliert. Die Tiere wurden tracheotomiert und kontrolliert beatmet. Zusätzlich wurde die rechte A. femoralis für die Thermodilutionsmethode der Herzzeitvolumen (HZV) Messung präpariert. Die Aufrechterhaltung der Narkose erfolgte mit $7 \mu\text{g}/100\text{g KG/h}$ Fentanyl und $70 \mu\text{g}/100\text{g KG/h}$ Midazolam. Anschließend wurden die Tiere laparotomiert, und das Mesenterium wurde für die intravitale Mikroskopie der Mikrozirkulation mobilisiert. Darm und Mesenterium wurden mit 37°C warmer Ringer-Lösung kontinuierlich befeuchtet. Die Tiere wurden randomisiert und eine der folgenden Gruppen zugeteilt: Gruppe 1 (LPS $n=4$) und Gruppe 2 (LPS und PDH, $n=5$). Die Gruppen erhielten $0,5 \text{ mg}/100\text{g KG}$ LPS als Bolus i.v. Gruppe 2 erhielt beginnend 5 min nach Applikation von LPS einen Bolus von $0,3 \text{ mg}/100\text{g KG}$ i.v. und anschließend eine kontinuierliche Rate von $0,04 \mu\text{g}/100\text{g KG/h}$ den PDH Rolipram. Für die Untersuchung der kapillären Schrankenstörung wurde den Gruppen Fluorescein-isothiocyanat-conjugat-(FITC)-Albumin: $5 \text{ mg}/100\text{g KG}$ i.v. appliziert und mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopiebilder des Mesenteriums analysiert. Die Auswertung der intravitalen Mikroskopie erfolgte mittels der Software MetaMorph und ImageJ. Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-test und Varianzanalyse (ANOVA mit posthoc n. Duncan, $p<0,05$; $\text{mean} \pm \text{SD}$).

Ergebnisse

Nach Applikation von LPS zeigten alle Tiere Abfälle des MAD sowie innerhalb von 15 min eine signifikante Reduktion der mesenterialen Mikrozirkulation, gemessen als Erythrozytengeschwindigkeit von $0,60 \pm 0,27$ (Gruppe 1) bzw. $0,51 \pm 0,21 \mu\text{m/ms}$ (Gruppe 2) auf $0,22 \pm 0,15$ (Gruppe 1; $p<0,01$) bzw. $0,34 \pm 0,19 \mu\text{m/ms}$ (Gruppe 2; $p<0,01$) entsprechend einer Manifestation einer schweren Hyperinflammation. Diese war bei den Tieren der LPS-Gruppe rasch fortschreitend mit einer Mortalität von 75 % innerhalb der ersten 200 min nach Applikation von LPS. In diesem Zeitraum kam es kontinuierlich zu einer weiteren Reduktion

der mesenterialen Erythrozytengeschwindigkeit gleichbedeutend mit einer progredienten schweren Mikrozirkulationstörung. 60 min nach Applikation von LPS konnte eine kapilläre Schrankenstörung durch eine signifikante Erhöhung des Austritts von FITC-Albumin aus den mesenterialen Kapillaren in der Gruppe 1 festgestellt werden (um 35 ± 12 % im Vergleich zum Ausgangswert; $p<0,02$). In der Gruppe 2 die mit dem PDH Rolipram behandelt wurde, war kein Tier nach 200 min verstorben. Die Mikrozirkulation war im Vergleich zur LPS-Gruppe signifikant verbessert. Darüber hinaus war in der Gruppe 2 keine kapilläre Schrankenstörung nach 60 min im Vergleich zum Ausgangswert (9 ± 14 %) feststellbar. Der systemische Gefäßwiderstandsindex (SVRI) zeigte sowohl innerhalb als auch zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede. Der Cardiac index war ebenfalls nicht signifikant unterschiedlich.

Interpretation

Zusammenfassend zeigen unsere Daten, dass durch die Applikation eines Phosphodiesterase-IV-Hemmers bei der LPS-induzierten Inflammation eine signifikante Verringerung der kapillären Schrankenstörung sowie eine signifikante Verbesserung der Mikrozirkulation erreicht werden konnte. Da die pharmakologischen Effekte des PDH die Hämodynamik kaum beeinflussten, lässt dies einen direkten protektiven Effekt auf die Endothelbarriere vermuten. Daher könnte die Applikation von Phosphodiesterasehemmern in der Weiterentwicklung der Sepsistherapie eine wichtige Rolle spielen.

Literatur

1. Schlegel N, Baumer Y, Drenckhahn D, Waschke J. LPS-induced endothelial barrier breakdown is cAMP-dependent in vivo and in vitro. Crit Care Med 2009;37(5):1735-1743.
2. Schlegel N, Waschke J. Impaired cAMP and Rac 1 signalling contribute to TNF- α -induced endothelial barrier breakdown in microvascular endothelium. Microcirc 009;16(6):521-533.

Einfluss des lumbalen Eröffnungsdrucks auf den postspinalen Kopfschmerz nach Sattelblockanästhesie

M.D. Schmittner¹ · U. Lorenz¹ · C. Weiss² · G. Beck³

- 1 Klinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin, Universitätsmedizin Mannheim
- 2 Abteilung für Medizinische Statistik, Universitätsmedizin Mannheim
- 3 Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie, Dr.-Horst-Schmidt-Kliniken, Wiesbaden

Korrespondenz: Marc.Schmittner@umm.de

Fragestellung

Der spinale Sattelblock gilt als die nahezu ideale Form der Anästhesie für proktologische Operationen [1]. Eine Komplikation stellt der postspinale Kopfschmerz (PSKS) dar, dessen Ursache bisher nicht vollständig geklärt ist [2]. Durch die durale Punktion tritt Liquor in den Periduralraum aus, was zu intrakranieller Hypotension mit meningealer Reizung führen kann. Je höher der Druck im Liquorraum bei der Punktion ist, so unsere Hypothese, desto größer sollte der Liquorverlust und um so häufiger und ausgeprägter sollte der PSKS sein. Im Rahmen dieser prospektiven Studie wurde an Patienten mit Spinalanästhesie untersucht, ob der lumbale Eröffnungsdruck mit der Inzidenz, der Dauer und der Stärke des PSKS in Beziehung steht.

Methodik

Nach Zustimmung durch die Ethikkommission wurden Patienten (m/w, 18-83 Jahre, ASA Grad I-III) mit proktologischen Operationen ohne Kontraindikation gegen eine Spinalanästhesie in die Studie eingeschlossen. Die Punktion wurde auf Höhe L3/L4 mit einer 27-G Spinalkanüle (Spinocan®, B. Braun, Melsungen) und vertikaler Ausrichtung des Kanülschliffs durchgeführt. Der lumbale Eröffnungsdruck wurde mit Hilfe eines Spinalmanometers (Medioplast, Malmö, Schweden) in sitzender Position nach zwei Minuten Druckausgleich gemessen. Als Nullpunkt wurde die Einstichstelle gewählt. Alle Patienten erhielten 1.0 mL hyperbares Bupivacain 0.5% subarachnoidal. Eine Woche nach der Operation wurde durch eine Telefonbefragung das Auftreten des PSKS anhand von Kriterien der Internationalen Kopfschmerzgesellschaft ermittelt [3]. Die statistische Analyse erfolgte mit Hilfe des SAS-Programms (Version 9.2).

Ergebnisse

145 Patienten (63,5 % Männer) wurden in die Studie eingeschlossen und ausgewertet. Bei insgesamt 13 Patienten (9,0 %) traten PSKS auf (Stärke auf der visuellen Analogskala 0-10

Tabelle 1

Perioperativ erhobene und demographische Variablen bei Patienten mit und ohne postspinalen Kopfschmerz (PSKS). ‡ p < 0.05 (t-Test zwischen beiden Gruppen).

	PSKS (n=13)	kein PSKS (n=132)	p-Wert
Liquor-assoziierte Variablen			
Eröffnungsdruck (cmH ₂ O)	37.5±7.1	39.6±5.6	0.207
Liquor-Glukosekonzentration (mg/dL)	51.9±5.2	57.0±9.0	0.048‡
Liquor-Osmolalität (mosmol/kg H ₂ O)	281.5±7.0	285.1±8.9	0.170
Anästhesie- / OP-relevante Variablen			
Systolischer Blutdruck (mmHg)	122.1±14.8	132.9±17.2	0.030‡
Anzahl Punktionsversuche	1.3±0.8	1.3±0.7	0.950
Demographische Variablen			
Alter (Jahre)	42.9±10.5	50.8±14.8	0.063
Körpergröße (cm)	170.4±8.8	173.6±9.5	0.246
Körpergewicht (kg)	76.3±26.7	84.1±19.2	0.319
Geschlecht (% Männer)	46.0	65.1	0.229

Punkte: Mittelwert 6,0 Punkte, Range (2-8); Dauer: 4,0 Tage, (0,5-5)). Der lumbale Eröffnungsdruck unterschied sich nicht zwischen Patienten mit und ohne PSKS. Bei symptomatischen Patienten ließ sich eine positive Korrelation zwischen dem Eröffnungsdruck und der Kopfschmerzstärke ($r=0,54321$; $p=0,0275$) sowie der Schmerzdauer ($r=0,54652$; $p=0,0267$) aufzeigen. Möglicherweise wurden Schmerzstärke und -dauer durch eine eigenständige, nicht standardisierte Einnahme von Analgetika beeinflusst. Die Glukosekonzentration im Liquor und der systolische Blutdruck vor der Punktion waren bei symptomatischen Patienten

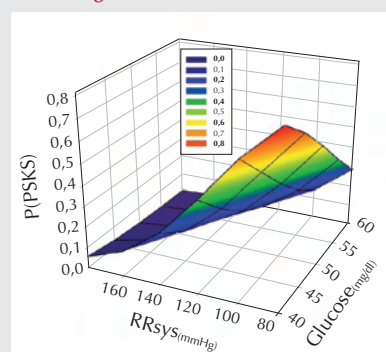
signifikant erniedrigt (Tab. 1).

Die schrittweise multivariate logistische Regression o.g. Variablen zeigte, dass die Wahrscheinlichkeit des Auftretens des PSKS anhand der Glukosekonzentration im Liquor und des vor der Punktion gemessenen systolischen Blutdrucks vorausgesagt werden kann (Abb.1).

Interpretation

Die Höhe des lumbalen Eröffnungsdrucks bestimmt nicht die Häufigkeit, mit der PSKS auftreten. Aufgrund seiner positiven Korrelation mit der Schmerzstärke und -dauer bei symptomatischen Patienten, stellt der lumbale Eröffnungsdruck eine pathophysiologisch relevante Co-Variable dar. Die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von PSKS lässt sich mit Hilfe eines Rechenmodells anhand der Glukosekonzentration im Liquor und des systolischen Blutdrucks vor der Punktion schätzen. In prospektiven Studien ist nun zu prüfen, ob anhand dieser beiden bisher nicht diskutierten Variablen die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von PSKS tatsächlich vorhergesagt werden kann.

Abbildung 1



Wahrscheinlichkeit (P) des Auftretens des postspinalen Kopfschmerzes (PSKS) in Abhängigkeit von der Glukosekonzentration im Liquor (x) und dem systolischen Blutdruck (y). Für $\alpha < 0.1$ je Variable ergibt sich für die gezeigte Formel eine „area under curve“ (AUC) von 0.764.

$$P(\text{Kopfschmerz}) = \frac{\exp(9,678 - 0,119 \cdot x - 0,043 \cdot y)}{1 + \exp(9,678 - 0,119 \cdot x - 0,043 \cdot y)}$$

Literatur

1. Schmittner MD, Janke A, Weiss C, Beck GC, Bussen DG. Practicability and patients' subjective experiences of low-dose spinal anaesthesia using hyperbaric bupivacaine for transanal surgery. *Int J Colorectal Dis* 2009;24:827-836.
2. Turnbull DK, Shepherd DB. Post-dural puncture headache: pathogenesis, prevention and treatment. *Br J Anaesth* 2003;91:718-729.
3. http://ihs-classification.org/en/02_klassifikation/03_teil2/07.02.01_nonvascular.html.

Erythrozyten induzieren mittels ATP ein Calciumsignal in kapillaren Endothelzellen der Rattenlunge nach linksatrialer Druckerhöhung

L. Schulte-Uentrop · K. Heckel · S. Tank · A.E. Goetz · R. Kiefmann

Klinik für Anästhesiologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Universität Hamburg

Korrespondenz: lschulte@uke.uni-hamburg.de

Fragestellung

ATP dient nicht nur im Stoffwechsel als „Energieeinheit“, sondern initiiert als parakriner Mediator durch Bindung an Purinrezeptoren zahlreiche Signaltransduktionskaskaden [1]. Erythrozyten scheinen hierbei eine wichtige Rolle zu spielen, da sie relevante Mengen von ATP in die Blutbahn sezernieren [2]. In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir, ob und wie das von Erythrozyten freigesetzte ATP am pulmonalen Kapillarendothel eine Signaltransduktion induziert.

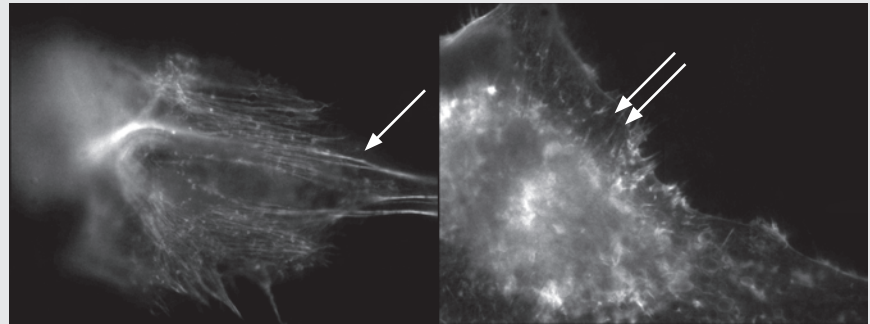
Methodik

Wir isolierten Rattenlungen und perfundierten diese mit autologem Blut (14 ml/min). Unter Normalbedingungen betrug der Atemwegsdruck konstant 5 cmH₂O, der linksatriale Druck (pLA) 2 cmH₂O und der pulmonalarterielle Druck 10 cmH₂O. Zur Bestimmung der Calcium (Ca²⁺)-Oszillationsamplitude (Ca²⁺-OA) quantifizierten wir mit Hilfe der Epifluoreszenzmikroskopie in situ die zytosolische Ca²⁺-Konzentration (Ca²⁺)_{yt} in einzelnen Endothelzellen kapillarer Venolen mittels Fura 2, welches per Mikrokatheter intrakapillär infundiert wurde. Ebenfalls luden wir humane pulmonale mikrovaskuläre Endothelzellen (HPMEC), die unter Standardbedingungen kultiviert wurden, mit Fura 2 und maßen (Ca²⁺)_{yt} mittels Epifluoreszenzmikroskopie. In einem zusätzlichen Versuchsansatz fixierten wir die Zellen mit Hilfe von Paraformaldehyd (3,5%) und färbten die Aktinfasern mit Phalloidin-Rhodamin zur Untersuchung des Zytoskeletts an. Die Zellkerne wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff Hoechst33342 gegengefärbt. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert±Standardabweichung angegeben. Die statistische Analyse erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Analyse und Wilcoxon-Signed-Rank-Test (p<0,05).

Ergebnisse

In situ: In den Puffer-perfundierten Kapillaren lag Ca²⁺-OA bei 5,7±2,3nm. Die kapillare In-

Abbildung



Dargestellt sind HPMEC mit durch Phalloidin-Rhodamin angefärbten Aktinfasern in 100facher Vergrößerung. Unter Kontrollbedingungen (links) sind die Aktinfilamente longitudinal angeordnet (Pfeil). Diese Anordnung ist nach ATP-Applikation (100 μM) komplett aufgehoben (Doppelpfeil).

fusion weder von ATP (100μM) noch von in Puffer suspendierten Erythrozyten (Hämatokrit: 20 %) änderte Ca²⁺-OA im Vergleich zur Ausgangsbedingung. Auch die Infusion von ATP in supraphysiologischen Konzentrationen (4mM, n=4) oder die Infusion von ATP (100μM, n=2) in Kombination mit ARL67156, ein ekto-ATPase-Inhibitor, beeinflusste Ca²⁺-OA nicht. Da die luminal Applikation von ATP kein Ca²⁺-Signal induzierte, testeten wir, ob abluminal lokalisierte endotheliale Purinrezeptoren hierbei eine Rolle spielen. Dazu steigerten wir die transkapilläre Filtration durch die Erhöhung des pLA von 2 auf 10 cmH₂O [3]. Erst unter diesen Bedingungen wurde Ca²⁺-OA durch die Infusion von ATP um 103±31 % und durch die Infusion der Erythrozytensuspension um 93±29 % erhöht (p<0,05, je n=4). Die zusätzliche Infusion des Purinrezeptorantagonisten IP5I (20μM) inhibierte sowohl die ATP- als auch die Erythrozyten-induzierte Ca²⁺-Antwort. Die Applikation des ATP-hydrolysierenden Enzyms Apyrase (50 U/ml) inhibierte ebenfalls die Erythrozyten-induzierte Steigerung von Ca²⁺-OA. Der isolierte pLA-Anstieg hatte keinen Einfluss auf Ca²⁺-OA.

In vitro: Die Applikation von ATP (100 μM) erhöhte Ca²⁺-OA um 97±6 % (p<0,05 %, n=12) und induzierte eine Reorganisation der Aktinfilamente (n=4, siehe Abb. 1) in HPMEC im Vergleich zur Ausgangsbedingung. Diese beiden Antworten konnten durch den Purinrezeptorantagonisten Suramin (125 μM), den Endoplasmatischen Retikulum-Blocker Thapsigargin (2 μM) oder den IP₃-Rezeptorantagonisten Xestospongine C (5 μM), nicht jedoch durch Ca²⁺-freie Bedingungen im Zellüber-

stand (ATP-Antwort: je n=6, Aktin-Antwort: je n=4), inhibiert werden.

Interpretation

Unter der Bedingung des erhöhten linksatrialen Druckes induzierten Erythrozyten durch die Freisetzung von ATP ein endotheliales Ca²⁺-Signal in kapillaren Venolen und in der Folge eine Reorganisation des Zytoskeletts. Wir spekulieren, dass unter diesen Bedingungen ATP ins Interstitium diffundiert und an basolateral lokalisierte Purinrezeptoren der Endothelzellen bindet. Auf diese Weise könnte den Endothelzellen die Information der erhöhten transkapillären Filtration vermittelt werden. Ob mit Hilfe dieses Mechanismus z.B. im Rahmen einer Linksherzdekompensation durch Reorganisation des Zytoskeletts die transkapilläre Filtration und somit die Ausbildung eines Lungenödems aktiv reguliert wird, soll zukünftig untersucht werden.

Literatur

1. Barnard EA, Burnstock G, Webb TE. G protein-coupled receptors for ATP and other nucleotides: a new receptor family. Trends Pharmacol Sci 1994;15:67-69.
2. Locovei S, Bao L, Dahl G. Pannexin 1 in erythrocytes: function without a gap. Proc. Natl Acad Sci U.S.A 2006;103:7655-7659.
3. Ichimura H, Parthasarathi K, Quadri S, Issekutz AC, Bhattacharya J. Mechanooxidative coupling by mitochondria induces proinflammatory responses in lung venular capillaries. J Clin Invest 2003;111:691-699.

Subtypenspezifische Effekte von Droperidol in LQT1- und LQT2-In-vitro- und -In-silico-Modellen

A.P. Schwoerer¹ · J. Kebernik¹ · H. Ehmke¹ · P. Friederich²

- 1 Institut für Vegetative Physiologie und Pathophysiologie, Universitätsklinikum Hamburg, Universität Hamburg
- 2 Klinik für Anästhesiologie, Operative Intensivmedizin und Schmerztherapie, Klinikum Bogenhausen, München

Korrespondenz: schwoerer@uke.de

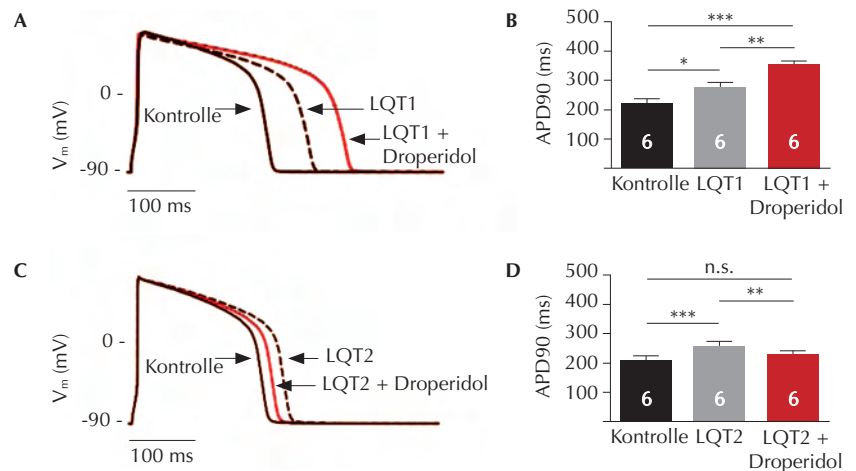
Fragestellung

Das Long-QT-Syndrom (LQT) ist durch eine gestörte ventrikuläre Repolarisation und ein dadurch verlängertes QT-Intervall im EKG charakterisiert. Bei den häufigsten LQT-Subtypen (LQT1, LQT2) sind hierfür spezifische Defekte kardialer Kaliumkanäle verantwortlich [1]. Aufgrund der hohen Letalität der LQT-assoziierten polymorphen ventrikulären Arrhythmien und der Möglichkeit, diese durch Medikamente zu provozieren, wurde das LQT von der amerikanischen Food and Drug Administration als Kontraindikation für eine antiemetische Therapie mit Droperidol deklariert [2]. Droperidol blockiert hochpotent den durch human ether-a-go-go-related gene (hERG)-Kanäle vermittelten Kaliumstrom I_{Kr} [3]. Trotz dieser Interaktion konnte bisher jedoch in keiner Studie eine Verlängerung des QT-Intervalls durch Droperidol in antiemetischer Dosierung nachgewiesen werden. Vielmehr scheint die hERG-Kanal-Blockade durch Interaktionen mit weiteren, depolarisierenden Stromkomponenten ausbalanciert zu werden [3]. Die komplexe Interaktion von Droperidol mit kardialen Ionenkanälen rechtfertigt deshalb die Hypothese, dass Droperidol unterschiedliche Wirkungen auf die LQT-Subtypen LQT1 und LQT2 hat. Das LQT per se muss somit keine Kontraindikation für eine Therapie mit Droperidol darstellen. In der vorliegenden Studie sollte deshalb anhand von In-vitro- und In-silico-Modellen überprüft werden, ob Droperidol subtypenspezifische Effekte auf LQT1 und LQT2 besitzen könnte.

Methodik

In vitro wurde die Wirkung von Droperidol mittels der Patch-Clamp-Technik an adulten ventrikulären Kardiomyozyten von Meerschweinchen bei 37 °C untersucht. LQT1 wurde durch vorherige Applikation von 10 µmol/l Chromanol293B und LQT2 durch 10 µmol/l E4031 induziert. In silico wurde der

Abbildung 1



Subtypenspezifische Wirkung von 0,6 µmol/l Droperidol auf die Aktionspotentialdauer (APD90) von LQT1- (A,B) bzw. LQT2-Kardiomyozyten (C,D). * P<0,05, ** P<0,01, *** P<0,001, n.s. nicht signifikant.

Effekt von Droperidol an Modell-Kardiomyozyten mit zunehmenden LQT-Schweregraden basierend auf dem Luo-Rudy-Modell berechnet. Für Droperidol wurden dabei publizierte Interaktionen mit hERG- und Calciumkanälen angenommen. Angegeben sind Mittelwerte ± Standardfehler, n entspricht der Anzahl der Zellen, statistische Vergleiche erfolgten mit gepaartem Student t-Test bzw. mit einer ANOVA mit einem Bonferroni-post-hoc-Test.

Ergebnisse

Droperidol verlängerte die Aktionspotentiale (APs) von Kontroll-Kardiomyozyten (ohne LQT-Induktion) konzentrationsabhängig ab einer Konzentration von 0,3 µmol/l mit einer maximalen Wirkung bei 0,6 µmol/l (308,8 ± 7,6 ms, n=4 vs. 231,4 ± 18,9 ms, n=4, P<0,01). Bei LQT1-Myozyten (Abb. A) führte Droperidol in dieser Konzentration ebenfalls zu einer ausgeprägten AP-Verlängerung (Abb. B). Bei LQT2-Myozyten hingegen (Abb. C), verkürzte Droperidol die APs um ~10 % (Abb. D). Konsistent mit diesen In-vitro-Versuchen verlängerte Droperidol abhängig vom LQT-Schweregrad die APs in den In-silico-LQT1-Modellen um bis zu 32 % und verkürzte die APs von LQT2-Myozyten um bis zu 9 %.

Interpretation

Die Ergebnisse der hier durchgeführten In-vitro- und In-silico-Experimente zeigen überein-

stimmend, dass Droperidol die ventrikuläre Repolarisation spezifisch in LQT1-, nicht aber in LQT2-Kardiomyozyten verschlechtert. In LQT1-Myozyten, deren Repolarisation stark von dem durch hERG-Kanäle vermittelten Kaliumstrom I_{Kr} abhängt, führt dessen Blockade durch Droperidol zu einer weiteren AP-Verlängerung. Bei LQT2-Myozyten hingegen, in denen I_{Kr} per definitionem bereits defekt ist, wird diese Interaktion irrelevant. Hier führt die Blockade der depolarisierenden Stromkomponente zu einer Verkürzung der APs. Unsere Ergebnisse erlauben erstmalig die Hypothese, dass LQT-subtypenspezifische Empfehlungen für eine antiemetische Behandlung mit Droperidol gerechtfertigt sein könnten.

Literatur

1. Kies SJ, Pabelick CM, Hurley HA, White RD, Ackerman MJ. Anesthesia for patients with congenital long QT syndrome. *Anesthesiology* 2005;102:204-210.
2. <http://www.fda.gov/Safety/MedWatch/SafetyInformation/SafetyAlertsforHumanMedicalProducts/ucm173778.htm>
3. Schwoerer AP, Bluetner C, Brandt S, Binder S, Siebrands CC, Ehmke H, Friederich P. Molecular interaction of droperidol with human ether-a-go-go-related gene channels: prolongation of action potential duration without inducing early afterdepolarization. *Anesthesiology* 2007;106:967-976.

Die Neurotoxizität von Midazolam bzw. Thiopental auf die Synaptogenese des unreifen Rattengehirns lässt sich über die Suppression neuronaler Ca^{2+} -Oszillationen erklären

B. Sinner¹ · O. Friedrich² · Y. Zausig¹ · M. Gruber¹ · B.M. Graf¹

- 1 Klinik für Anästhesiologie, Universität Regensburg
2 Institut für Physiologie und Pathophysiologie, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Korrespondenz:

Barbara.Sinner@klinik.uni-regensburg.de

Fragestellung

Untersuchungen an embryonalen und neugeborenen Nagetieren belegen, dass Anästhetika wie z.B. Benzodiazepine neurotoxische Eigenschaften aufweisen. Für Wachstum, Differenzierung und Synaptogenese immaturer Neurone sind neuronale Ca^{2+} -Oszillationen verantwortlich [1]. Diese stellen elementare Bestandteile der neuronalen Netzwerkbildung und der Neuroplastizität des Gehirns dar. Spontane Ca^{2+} -Oszillationen entstehen durch periodischen Anstieg und Abfall des intrazellulären Ca^{2+} . Die Entstehung und Propagation der Ca^{2+} -Oszillationen wird hauptsächlich durch Glutamat, dem wichtigsten Neurotransmitter der neuronalen Entwicklung, aber auch über GABA_A -Rezeptoren beeinflusst. Die kurzzeitige Applikation von Benzodiazepinen oder Barbituraten, führt zu einer reversiblen Suppression der neuronalen Ca^{2+} -Oszillationen [2]. In der folgenden Untersuchung haben wir die Auswirkungen von Midazolam und Thiopental auf Ca^{2+} -Oszillationen und die Synaptogenese untersucht.

Methodik

Nach Zustimmung der Tierschutzkommission wurden hippocampale Zellkulturen aus 19 Tage alten embryonalen Wistarratten am 15. Tag in Kultur mit Muscimol (50 μM), Midazolam (100, 300 nM) oder Thiopental (10,

25 μM) für 24 h inkubiert. 15 min bzw. 24 h nach Auswaschen wurden die Kulturen mit dem Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenzfarbstoff Fura 2 AM inkubiert und neuronale Ca^{2+} -Oszillationen mittels fluoreszenzratiometrischer Mikroskopie erfasst. Synapsen wurden 24 h nach Auswaschen durch Markierung mit Anti-synapsin und dem sekundären an Alexa 488 gebundenen AK mittels konfokaler Mikroskopie detektiert. Der Nachweis neuronaler Apoptose erfolgte mit der TUNEL-Reaktion und Caspase-3. Für die statistische Auswertung wurde der Student's t-Test für ungepaarte Stichproben verwendet. Ein $p < 0,05$ galt als signifikant.

Ergebnisse

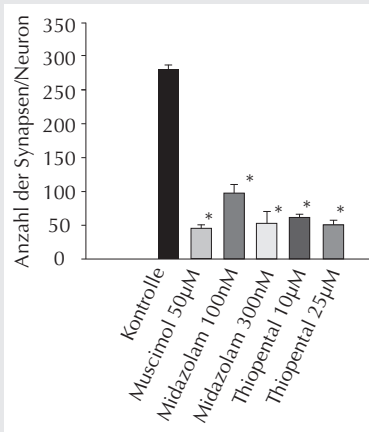
Sowohl die Langzeitapplikation des spez. GABA_A -Rezeptoragonisten Muscimol (50 μM) als auch der Anästhetika Midazolam (100 bzw. 300 μM) und Thiopental (10 bzw. 25

μM) führen zum signifikanten Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration, der auch 24 h nach Auswaschen nicht reversibel ist. Muscimol, Midazolam und Thiopental reduzieren dosisabhängig und irreversibel die Amplitude und Frequenz der neuronalen Ca^{2+} -Oszillationen. Parallel zur Reduktion der Amplitude und Frequenz lässt sich eine signifikante Reduktion der Zahl der Synapsen ($n=40$ für jede Konzentration und jeden Zeitpunkt) nachweisen (Abb. 1). Eine signifikante Zunahme apoptotischer Neurone findet sich nach Langzeitapplikation von Muscimol 50 μM und unter hohen Konzentrationen von Midazolam (300 μM) bzw. Thiopental (25 μM)

Interpretation

Neuronale Ca^{2+} -Oszillationen regulieren die neuronale Entwicklung, Differenzierung und Synaptogenese des immaturren Gehirns. Midazolam und Thiopental reduzieren dosisabhängig die Amplitude und Frequenz der neuronalen Ca^{2+} -Oszillationen. Beide Anästhetika beeinflussen dadurch die Synaptogenese immaturer Neurone und beeinträchtigen so die neuronale Plastizität. Dies erfolgt bereits in klinisch relevanten Konzentrationen, in denen noch keine Apoptose nachweisbar ist. Die neurotoxischen Effekte von Benzodiazepinen oder Barbituraten auf das unreife Gehirn und die damit möglicherweise verbundenen Entwicklungsstörungen lassen sich somit über eine Reduktion oszillierender Neurone und der dosisabhängigen Suppression von Amplitude und Frequenz der spontanen Ca^{2+} -Oszillationen erklären.

Abbildung



Anzahl der Synapsen in Abhängigkeit von der Anästhetikakonzentration 24 h nach Auswaschen. (Mittelwert und Standardfehler, * $p < 0,05$, $n=40$ für Konzentration und Zeitpunkt).

Literatur

1. Adelsberger H, Garaschuk O, Konnerth A. Cortical calcium waves in resting newborn mice. *Nat Neurosci* 2005;8:988-990.
2. Sinner B, Friedrich O, Zink W, Fink RHA, Graf BM. GABA-mimetic intravenous anaesthetics inhibit spontaneous Ca^{2+} -oscillations in cultured hippocampal neurons. *Acta Anaesthesiol Scand* 2006;50:742-748.

Isofluran vermindert den Ventilator-induzierten Lungenschaden über den Phosphatidylinositol-3-Kinase/Akt (PI3K/Akt)-Signaltransduktionsweg

K.M. Strosing · S. Faller · A. Hoetzel

Anästhesiologische Universitätsklinik,
Albert-Ludwigs-Universität Freiburg

Korrespondenz:

Karl.Strosing@uniklinik-freiburg.de

Fragestellung

Die maschinelle Beatmung kann durch die zyklische Dehnung der Lunge zur Entwicklung eines beatmungsassoziierten Lungenschadens (ventilator-induced lung injury=VILI) führen [1]. Hier gilt es, Therapieoptionen zu identifizieren, die potenziell das VILI und die damit verbundene Morbidität und Letalität vermindern. Für volatile Anästhetika wurden in der Vergangenheit anti-inflammatorische und organprotektive Wirkungen beschrieben [2]. Schützende Effekte volatiler Anästhetika bei der Entwicklung eines VILI sind bislang kaum bekannt. In der vorliegenden Studie wird am Beispiel der Isofluran-Inhalation im Rahmen eines etablierten Mausmodells [3] die Wirkung volatiler Anästhetika auf den beatmungsassoziierten Lungenschaden beschrieben. Da die PI3K/Akt-Signaltransduktion eine wichtige Rolle bei der zellulären Dehnung einnimmt, wird deren Modulation durch Isofluran als potenziell zugrunde liegender Mechanismus untersucht.

Methodik

Nach Genehmigung durch das Regierungspräsidium wurden in einer ersten Serie männliche C57BL/6N-Mäuse (n=8/Gruppe) mit synthetischer Luft mit und ohne Beimischung von Isofluran maschinell beatmet (6 Stunden, Vt=12 ml/kg Körpergewicht). Kontroll-Mäuse wurden nicht ventiliert. Die inspiratorische Isofluran-Konzentration in der Isofluran-Gruppe betrug im Mittel 1,6 Vol%. Die Tiere der Kontroll-Gruppe und der mit synthetischer Luft ventilierten Gruppe erhielten zur Narkoseeinleitung bzw. -aufrechterhaltung intraperitoneal (i.p.) appliziertes Ketamin (90 mg/kg bzw. 14 mg/kg/h) und Acepromazin (9 mg/kg bzw. 1,4 mg/kg/h). Alle beatmeten Tiere erhielten zusätzlich Pancuronium zur Muskelrelaxation (2 mg/kg i.p.). In einer zweiten Serie wurden Mäuse wie oben beschrieben beatmet (n=8/Gruppe) und den Tieren der spezifische Inhibitor des PI3K/Akt-Signalweges, LY294002 (LY, 5 mg/kg Körpergewicht, gelöst in 2-prozentigem DMSO) oder das Lösungsmittel als Vehikel appliziert. Das Ausmaß des Lungenschadens wurde in der ersten Serie durch Darstellung der Alveolarwanddicke in Lungen-Kryo-

Tabelle 1

Median [Quartile]. ANOVA, *p<0,05 vs. Kontrolle, §p<0,05 vs. Luft.

Parameter	Kontrolle	Luft	Isofluran
nGrz [%]	0,9 [0,5/2,8]	26,3 [22,6/27,8]*	8,5 [4,8/11,9]§
IL-1β [pg/ml]	0,0 [0,0/0,0]	9,5 [6,0/12,4]*	1,5 [0,5/4,0]§
Wanddicke [µm]	6,5 [6,2/7,1]	9,6 [9,0/10,0]*	6,0 [5,6/6,6]§
pAkt [% Kontrolle]	100 [80/110]	100 [90/110]	130 [120/160]*§

Tabelle 2

Median [Quartile].

Parameter	Kontrolle +Vehikel	Kontrolle +LY
nGrz [%]	1,7 [0,7/2,8]	1,0 [0,6/1,7]§

Tabelle 3

Median [Quartile]. ANOVA, #p<0,05 vs. Isofluran + Vehikel.

Parameter	Luft +Vehikel	Luft +LY	Isofluran +Vehikel	Isofluran +LY
nGrz [%]	13,1 [11,7/15,9]#	14,7 [13,0/18,2]#	5,4 [3,9/7,3]	20,1 [10,5/26,7]#

Schnitten ermittelt. Die Phosphorylierung des Akt-Proteins (pAkt) im Lungengewebe wurde mittels Western-Blot-Analyse (Relative Phosphorylierung, % Kontrolle) nachgewiesen. Als Ausdruck inflammatorischer Prozesse wurden in der bronchoalveolären Lavage (BAL) der jeweilige Anteil neutrophiler Granulozyten (nGrz) an der Gesamt-Zellzahl bestimmt sowie die Konzentrationen des proinflammatorischen Zytokins Interleukin-1β (IL-1β) durch Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) ermittelt. Die Ergebnisse sind als Median [Quartile] dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte durch einfaktorielle Varianzanalysen (ANOVA) und Student-Newman-Keuls- bzw. Dunn's Post-hoc-Tests (Signifikanzniveau p<0,05).

Ergebnisse

Im Vergleich zu den nicht beatmeten Kontroll-Tieren führte die maschinelle Beatmung zu verdickten Alveolarsepten, einer Freisetzung von IL-1β und einer Infiltration von Granulozyten (Tab.1). Die Applikation von Isofluran konnte sowohl die morphologischen Veränderungen als auch die Entzündungsreaktion deutlich hemmen (Tab.1). Bei der Untersuchung des zugrunde liegenden Signaltransduktionsweges zeigte die Western-Blot-Analyse eine signifikant stärkere Phosphorylierung des Akt-Proteins durch die Beatmung mit Isofluran als bei maschineller Beatmung mit Luft (Tab.1). Nach der bisherigen Auswertung

zeigte die Applikation von LY294002 keinen Einfluss auf die Kontrolltiere (Tab. 2) und hob die unter Isofluran-Inhalation beobachtete Reduktion der Infiltration neutrophiler Zellen vollständig auf (Tab. 3).

Interpretation

Die Applikation inhalativen Isoflurans unter maschineller Beatmung reduziert die Entzündungsreaktion im Lungengewebe und den damit verbundenen Ventilator-induzierten Lungenschaden. Die bisherigen Erkenntnisse deuten auf eine ursächliche Hochregulation des PI3K/Akt-Signalweges durch Isofluran hin, dessen Inhibition die anti-inflammatorische Wirkung von Isofluran aufhebt.

Literatur

- Slutsky AS. Ventilator-Induced Lung Injury: From Barotrauma to Biotrauma. *Respir Care* 2005;50:646-659.
- Reutershan J, Chang D, Hayes JK, Ley K. Protective Effects of Isoflurane Pretreatment in Endotoxin-induced Lung Injury. *Anesthesiology* 2006;104:511-517.
- Hoetzel A, Dolinay T, Vallbracht S, Zhang Y, Kim HP, Ifedigbo E, Alber S, Kaynar AM, Schmidt R, Ryter SW, Choi AM. Carbon monoxide protects against ventilator-induced lung injury via PPAR-gamma and inhibition of Egr-1. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;177:1223-1232.

Die ischämische Postkonditionierung gegen Myokardinfarkt: Bedeutung des Ca^{2+} -aktivierten Kalium-Kanals mit großer Leitfähigkeit (BK_{Ca})

J. Stumpner¹ · S. Sommer² · A. Redel¹ ·
St. Sommer² · J. Richl¹ · N. Roewer¹ · M. Lange¹

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

² Klinik und Poliklinik für Thorax-, Herz- und
Thorakale Gefäßchirurgie, Universitätsklinikum
Würzburg, Julius-Maximilians-Universität
Würzburg

Korrespondenz:

Stumpner_j@klinik.uni-wuerzburg.de

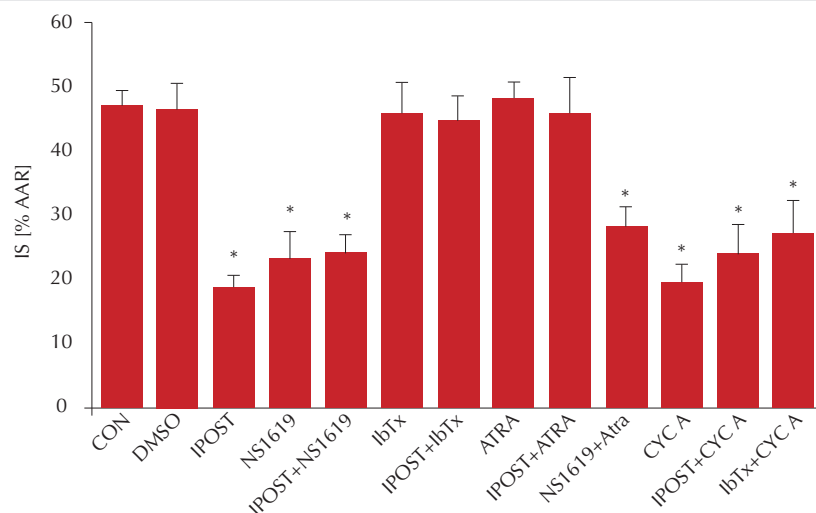
Fragestellung

Mitochondriale ATP-abhängige Kalium-Kanäle spielen eine wichtige Rolle in der Signalkaskade der ischämischen Prä- (IPC) und Postkonditionierung (IPOST) gegen Myokardinfarkt [1,2] und modulieren den Öffnungszustand der mitochondrialen Permeabilitätspore (mPTP) [2]. Der mitochondriale Ca^{2+} -aktivierte-Kalium-Kanal mit großer Leitfähigkeit (BK_{Ca}) ist an der Kardioprotektion durch IPC beteiligt [3]. Eine Beteiligung des BK_{Ca} an der IPOST ist bislang nicht untersucht worden. Wir testeten daher die Hypothese, dass die IPOST über den BK_{Ca} sowie die mPTP vermittelt wird.

Methodik

Nach Genehmigung durch die zuständige Behörde wurden männliche C57BL/6-Mäuse mit Pentobarbital narkotisiert, intubiert, mechanisch beatmet und zur kontinuierlichen Messung von Herzfrequenz und mittlerem arteriellem Blutdruck instrumentiert. Nach einer linksseitigen Thorakotomie wurde der LAD umschlungen. Alle Tiere erhielten eine 45-minütige Koronararterienokklusion (CAO) und eine dreistündige Reperfusion. Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten keine zusätzliche Intervention. IPOST wurde durch 3 je 10-sekündige Zyklen von Reperfusion/Ischämie induziert und entweder alleine oder in Kombination mit den folgenden Substanzen verabreicht: dem BK_{Ca} -Aktivator NS1619 (1 $\mu\text{g/g}$), dem BK_{Ca} -Inhibitor Iberitoxin (IbTx, 0,05 $\mu\text{g/g}$), dem mPTP-Öffner Atractyloside (ATRA, 25 $\mu\text{g/g}$) oder dem mPTP-Inhibitor Cyclosporin A (CYC A, 10 $\mu\text{g/g}$). In zwei weiteren Gruppen wurden NS1619 und ATRA sowie IbTx und CYC A kombiniert appliziert. Infarktgröße (IS) und Risikoareal (AAR) wurden mittels TTC- bzw. Evans-Blau-Färbung demarkiert und gravitoplanimetrisch bestimmt. In zusätzlichen Experimenten wurden nach 30 min und 3 h Reperfusion Myokardgewebe entnommen, Mitochondrien isoliert und die mitochondriale Atmung mittels einer Sauerstoffelektrode sowie das mitochondriale Membranpoten-

Abbildung 1



Infarktgröße als Prozentwert des Risikoareals (IS/AAR).

Angegeben sind Mittelwert $\pm$ SEM. *signifikant ($p < 0,05$) verschieden von CON.

tial gemessen. Die Daten wurden statistisch mittels Ein- bzw. Zwei-Wege-ANOVA- und Post-hoc-Duncan's-Test analysiert und sind als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben, $p < 0,05$.

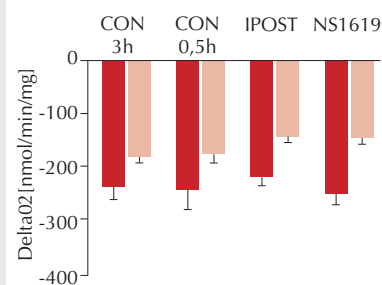
Ergebnisse

Die IS betrug 47 ± 2 % in der Kontrollgruppe (CON; $n=8$ pro Gruppe). DMSO (47 ± 4 %), IbTx (46 ± 5 %) sowie ATRA (48 ± 3 %) beeinflussten die IS nicht. IPOST (19 ± 1 %*), NS1619 (23 ± 4 %*) und CYC A (19 ± 3 %*) reduzierten die IS signifikant ($*p < 0,05$) gegenüber CON. Die IPOST wurde durch IbTx (45 ± 4 %) und ATRA (46 ± 6 %) aufgehoben, nicht jedoch durch NS1619 (24 ± 3 %*) und CYC A (24 ± 5 %*). Die IS-Reduktion durch NS1619 wurde mittels ATRA nicht beeinflusst (28 ± 3 %*). IPOST und NS1619 ($n=5$ pro Gruppe) zeigten eine nicht signifikante Reduktion des Sauerstoffverbrauchs von Komplex IV in subsarkolemmalen Mitochondrien (SSM), nicht jedoch in interfibrillären Mitochondrien.

Interpretation

IPOST und NS1619 reduzierten die Myokardinfarktgröße im akuten murinen Herzinfarktmodell, möglicherweise einhergehend mit einer Reduktion des Sauerstoffverbrauchs in Komplex IV der SSM. IPOST wurde durch Blockade des BK_{Ca} sowie Öffnung der mPTP aufgehoben. Aktivierung des BK_{Ca} sowie Inhibition der mPTP führten zu keiner Verstärkung der Kardioprotektion durch IPOST. Die NS1619-induzierte Kardioprotektion war unabhängig von der mPTP. Diese Resultate deuten auf eine wichtige Rolle des BK_{Ca} , möglicherweise unabhängig von der mPTP, in der Signalkaskade der IPOST hin.

Abbildung 2



Sauerstoffverbrauch des Komplex IV der Atmungskette. Angegeben sind Mittelwert $\pm$ SEM.

IFM = interfibrilläre Mitochondrien;
SSM = subsarkolemmale Mitochondrien;
CON 3h = Herzentnahme nach 3h Reperfusion;
CON 0,5h = Herzentnahme nach 30min Reperfusion.

Literatur

1. Auchampach JA, Grover GJ, Gross GJ. Blockade of ischaemic preconditioning in dogs by the novel ATP dependent potassium channel antagonist sodium 5-hydroxydecanoate. Cardiovasc Res 1992;26:1054-1062.
2. Mykytenko J, Reeves JG, Kin H, et al. Persistent beneficial effect of postconditioning against infarct size: role of mitochondrial K(ATP) channels during reperfusion. Basic Res Cardiol 2008;103:472-484.
3. Wang X, Yin C, Xi L, et al. Opening of Ca^{2+} -activated K⁺ channels triggers early and delayed preconditioning against I/R injury independent of NOS in mice. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2004;287:H2070-2077.

Einfluss des Alters auf den neuronalen Schaden nach experimentellem Schädel-Hirn-Trauma der Maus

R. Timaru-Kast · C. Luh · K. Engelhard · C. Werner · S. C. Thal

Klinik für Anästhesiologie, Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Korrespondenz: timaruka@uni-mainz.de

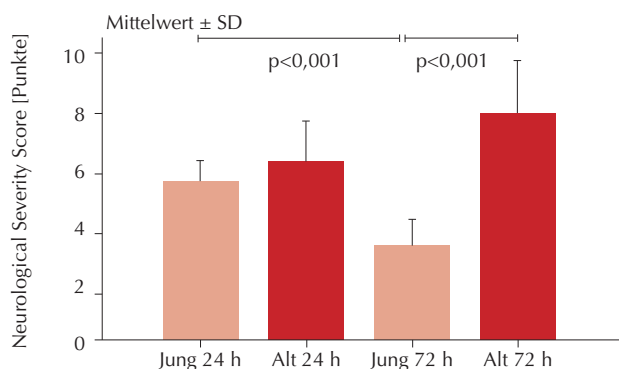
Fragestellung

Nach Schädel-Hirn-Trauma (SHT) weisen Patienten mit steigendem Alter sowohl einen Anstieg der Mortalitätsrate als auch ein deutlich schlechteres neurofunktionelles Endergebnis auf [1]. Das Alter ist daher ein unabhängiger Prädiktor für Mortalität und Morbidität nach schwerem SHT, wobei die zugrundeliegenden Pathomechanismen weitgehend unverstanden sind. Möglicherweise ist der sekundäre Hirnschaden nach Trauma im Alter größer oder die Fähigkeit, neurologische Defizite zu kompensieren, ist geringer [2]. Das Ziel der vorliegenden Studie war es, den Einfluss des Alters auf das neurofunktionelle Endergebnis, auf Neuroinflammation und auf die Ausprägung des sekundären Hirnschadens zu untersuchen.

Methodik

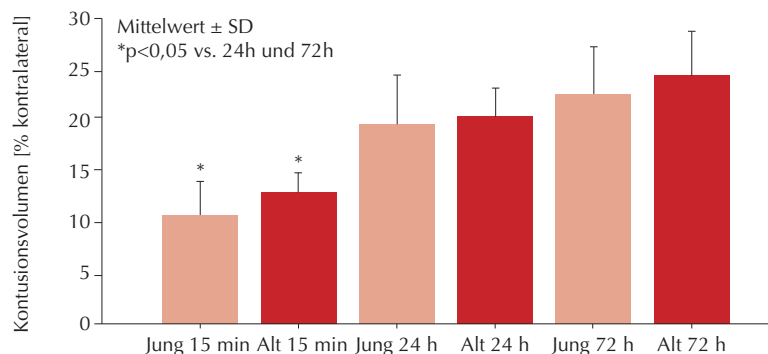
Nach Einverständnis der Tierschutzkommission wurden junge (2 Monate) und alte (21 Monate), männliche C57Bl6N-Mäuse mit Sevofluran anästhesiert. Mit einem pneumatisch beschleunigten Stempel wurde eine Hirnkontusion auf dem rechten parietalen Kortex erzeugt (controlled cortical impact: CCI) und die Tiere beider Altersgruppen anschließend entsprechend der Überlebenszeit nach Trauma in folgende Behandlungsgruppen randomisiert: 15 Minuten (Primärläsion: Alt und Jung 15 min: jeweils n=6), 24 Stunden (Alt und Jung 24 h: n=7) und 72 Stunden (Alt 72 h: n=9, Jung 72 h: n=7). Zum Vergleich mit den Ausgangsbedingungen ohne Trauma wurden separate Nativtiergruppen gebildet (Alt und Jung nativ: je n=6). Bei allen Tieren erfolgte jeweils vor Trauma und vor Euthanasie eine neuromotorische Beurteilung mittels Neurological Severity Score (NSS; keine Beeinträchtigung = 0, höchstes neuromotorisches Defizit = 10 Punkte). Das Gesamtvolumen der Hemisphären sowie das Kontusionsvolumen wurden in Nissl-gefärbten Schnitten bestimmt. Die perikontusionale und kontralaterale zerebrale Genexpression der Inflammationszytokine IL1 β , IL6 und TNF α wurde gemessen. Statistik: Wilcoxon-Test für paarweise Vergleiche und Korrektur nach Bonferroni bei Mehrfachtestung, $p < 0,05$.

Abbildung 1



Der Neurological-Severity-Score (NSS) zeigt nach 24 h keinen Unterschied zwischen den Altersgruppen; nach 72 h hingegen eine Reduktion des neurologischen Defizites bei den jungen Tieren.

Abbildung 2



Der Vergleich der Kontusionsvolumina zeigte eine deutliche Größenzunahme des Sekundärschadens gegenüber den Primärläsionsgruppen (Jung und Alt 15 min), jedoch keinen Unterschied zwischen den Altersgruppen.

Ergebnisse

Während der 72-stündigen Beobachtungszeit verstarben 2 der 9 Alt 72 h-Tiere (22 %). Die Mäuse aller anderen Gruppen überlebten. Der NSS beider Altersgruppen war 24 h nach CCI vergleichbar. Nach 72 h verbesserte sich die neurologische Funktion der jungen Tiere (Abb. 1). Das Gehirnvolumen der jungen nativen Mäuse war gegenüber den alten nativen Hirnen um durchschnittlich 8 % größer. Das Kontusionsvolumen war zu jedem Zeitpunkt zwischen den Altersgruppen vergleichbar (Abb. 2). Die Genexpression der Inflammationszytokine im perikontusionalen Gewebe war für IL1 β 24 und 72 h nach CCI bei den alten Tieren höher, IL6 wurde zu beiden Zeitpunkten in beiden Altersgruppen gleich exprimiert. Nach 24 h wurde TNF α zunächst

in den alten Tieren stärker hochreguliert und verblieb nach 72 h auf dem gleichen Niveau. Bei den jungen Tieren stieg TNF α nach 72 h um das 20-fache an ($p < 0,001$). Während bei den alten Tieren eine ipsilateral betonte perikontusionale Regulation dieser Zytokine vorliegt, kommt es bei den jungen Tieren nach 72 h auch kontralateral zu einer signifikanten Hochregulation von TNF α und IL6 ($p < 0,05$).

Interpretation

Alte Tiere weisen ein deutlich schlechteres klinisches Endergebnis nach CCI auf, im Gegensatz zu jungen Mäusen. Verantwortlich hierfür ist jedoch nicht der sekundäre Hirnschaden, da die Kontusionsvolumina in beiden Altersgruppen gleich groß sind. Ein verändertes Muster der Expression der pleiotropen Inflammationszytokine, eine früher einsetzende,

länger anhaltende zerebrale Inflammation und eine stärkere Ödementwicklung könnten Einflussfaktoren für die schlechte funktionelle Erholung der alten Tiere sein [2]. Obwohl das Körpergewicht der alten Tiere höher ist, sind die Hirne der alten Nativtiere kleiner, was einer altersabhängigen zerebralen Atrophie entspricht, die mit einer eingeschränkten zerebralen Plastizität einhergehen könnte. Für die gestörte funktionelle Erholung der alten Tiere könnte dies eine weitere wesentliche

Ursache sein [3]. Folglich ist die Fähigkeit des gealterten Hirns, neuronale Verluste zu kompensieren, und damit die funktionelle Erholung stark reduziert. Die aktuelle Studie deutet darauf hin, dass nicht der histopathologisch nachweisbare sekundäre Hirnschaden, sondern andere Mechanismen, wie Inflammation oder eine Atrophie des Gehirns mit reduzierter Plastizität, verantwortlich für das schlechte klinische Endergebnis der älteren SHT-Patienten sein könnten.

Stimulation und Blockade der Freisetzung von Calcitonin-gene-related-peptide (CGRP) aus kutanen Nozizeptoren der Ratte und des Menschen

A. Tzabazis

Anästhesiologische Klinik, Universitätsklinikum Erlangen, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

Korrespondenz:

alexander.tzabazis@kfa.imed.uni-erlangen.de

Fragestellung

Nach Aktivierung kutaner Nozizeptoren in frisch gewonnenem Gewebe mit z.B. Capsaicin kommt es zur Freisetzung des pronozizeptiven Neurotransmitters Calcitonin gene-related peptides (CGRP). Die freigesetzte Menge dieses Neuropeptids steht dabei in direkter Korrelation zur Intensität des Stimulus. Quantitative Bestimmungen von Stimulus-induzierter CGRP-Freisetzung in An- und Abwesenheit neuer, potentiell analgetischer, lokalanästhetischer oder anti-inflammatorischer Substanzen sollte es daher erlauben, die Effizienz dieser Substanzen zu bestimmen. Darüber hinaus könnten durch einen Vergleich mit bereits klinisch gebräuchlichen „Benchmark“-Medikamenten auch Aussagen über die Potenz der neuen Substanzen gemacht werden. Ziele der vorliegenden Studie waren daher zum einen die Bestimmung einer Dosis-Effekt-Beziehung für die Capsaicin-induzierte Freisetzung von CGRP aus Rattenhaut, zum anderen die Blockade dieser Freisetzung durch das Lokalanästhetikum Lidocain. In Pilotversuchen wurde zudem die Freisetzung von CGRP in humaner Haut nach Capsaicin-Exposition gemessen.

Methodik

Nach Zustimmung der Tierschutzkommission wurde die Haut beider Hinterpfoten durch CO₂-Asphyxiation abgetöteter männlicher Sprague-Dawley-Ratten (250-350g) gewonnen. Nach Zustimmung der Ethikkommission und schriftlichem Einverständnis der Patienten

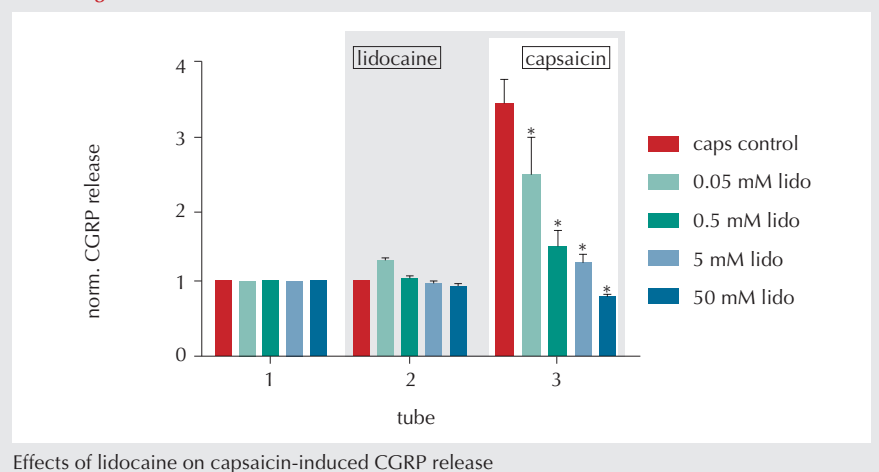
wurde humane Haut, die im Rahmen plastischer Operationen normalerweise verworfen wird, für die unten angeführten Experimente verwendet. Ausschlusskriterien waren hierbei chronische Schmerzerkrankung des Patienten und Infektion im Bereich der resezierten Haut.

Die Haut (Ratte und Mensch) wurde in etwa 1cm² große Stücke geschnitten und einzeln in kleine Petrischalen, die 750 µl künstliche interstitielle Flüssigkeit (AIF) enthielten (in mM: NaCl 107,8, KCl 3,48, MgSO₄ 0,69, NaHCO₃ 26,2, NaH₂PO₄ 1,67, CaCl₂ 1,53, Na-Glukonat 9,64, Glukose 5,05, Sucrose 7,6) gegeben. Das Gewebe wurde bei 32 °C und 5%vol CO₂ inkubiert. Nach 30 Minuten wurde das Gewebe durch eine Serie neuer Petrischalen (1-4) prozessiert, die jeweils frische AIF, AIF und Capsaicin (50, 100 oder 200 µM), AIF und Lidocain (0,05 mM, 0,5 mM, 5 mM oder 50 mM) oder AIF, Capsaicin (100 µM) und Lidocain (0,05 mM, 0,5 mM, 5 mM oder 50 mM) bzw. AIF und Veratridin (50 µM, 100 µM, 250 µM oder 500 µM), AIF und Lidocain (5 mM oder 50 mM) oder AIF, Veratridin (500 µM) und Lidocain (5 mM oder 50

Literatur

1. Thompson HJ, et al. J Am Geriatr Soc 2006;54(10):1590-1595.
2. Unterberg A, et al. Acta Neurochir Suppl 1994; 60:431-433.
3. Onyszchuk G, et al. J Neurotrauma 2008; 25:153-171.

Abbildung



mM) enthielt. Nach jeweils 10 Minuten wurde die Haut dabei in eine neue Petrischale transferiert, die AIF aus der vorhergehenden Petrischale abpipettiert und auf Trockeneis gelagert. CGRP-Konzentrationen in der AIF wurden mithilfe kommerzieller Enzym-Immunoassays bestimmt (SP1bio), normalisiert und auf statistisch signifikante Unterschiede getestet (zweifaktorielle ANOVA, p<0.05).

Ergebnisse

Bei Ratten konnte eine Dosisabhängigkeit der durch Capsaicin induzierten CGRP-Freisetzung gefunden werden. Fünfzig µM Capsaicin führten zu einem 1,7-fachen Anstieg der CGRP-Konzentration in der AIF, während 100 bzw. 200 µM Capsaicin zu einer 3,5- bzw. 3,9-fachen Freisetzung führten. Auch in humaner Haut kam es zu einer signifikanten CGRP-Freisetzung nach Zugabe von 100 µM Capsaicin.

Lidocain konnte dosisabhängig die normalerweise durch 100 µM Capsaicin induzierte Freisetzung von CGRP blockieren (Abb. 1, *: statistisch signifikante Differenz zur Capsaicin-Kontrolle (rot)). Durch Zugabe von Vera-

tridin konnte ebenfalls eine dosisabhängige Steigerung der CGRP-Freisetzung induziert werden. Bei Stimulation mit 50, 100, 250 bzw. 500 μM Veratridin konnte eine statistisch signifikante Steigerung der normalisierten CGRP-Freisetzung um den Faktor 1,2, 1,3, 1,5 bzw. 2,2 beobachtet werden. Durch Zugabe von Lidocain (5 mM bzw. 50 mM) konnte die durch 500 μM Veratridin induzierte CGRP-Freisetzung im Gegensatz zu Capsaicin zwar signifikant, aber nur unvollständig blockiert (1,55 für 5 mM Lidocain bzw. 1,53-fach für 50 mM Lidocain) werden.

Die Bruton-Tyrosin-Kinase (Btk) reguliert die Selektin-vermittelte Integrinaktivierung und die Rekrutierung von Leukozyten*

A. Zarbock · H. Mueller · A. Stadtmann · H. Van Aken

Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin, Universitätsklinikum Münster, Westfälische Wilhelms-Universität Münster

Korrespondenz: zarbock@uni-muenster.de
Preisträger des DGAJ-Forschungsstipendiums der Fresenius-Stiftung 2010.

Fragestellung

Leukozyten sind wichtig bei der Bekämpfung von bakteriell-induzierten Infektionen. Eine Störung der Rekrutierung von Leukozyten in entzündetes Gewebe, wie es zum Beispiel beim 'Leukocyte Adhesion Deficiency (LAD)'-Syndrom vorkommt, geht mit rezidivierenden bakteriellen Infektionen einher. Im Gegensatz hierzu kann die Hemmung der Leukozytenrekrutierung im Rahmen des Ischämie-Reperfusionsschadens, einer abakteriellen Entzündung und einer Autoimmunerkrankung auch protektive Effekte haben. Die Rekrutierung von Leukozyten in entzündliches Gewebe ist ein komplexer Prozess, der gewöhnlich als Kaskade dargestellt wird [1]. Selektine vermitteln den ersten Kontakt von Leukozyten mit dem Endothel, induzieren die Aktivierung von β_2 -Integrinen und sind an der Rekrutierung von Leukozyten in entzündetes Gewebe beteiligt [2,3]. Die Bindung von Selektinen an P-Selektin-Glykoproteinligand (PSGL)-1 induziert die Aktivierung eines Signaltransduktionsweges, der zu einer Aktivierung der Spleen-Tyrosin-Kinase (Syk) führt [2,3]. Der Signaltransduktionsweg zwischen Syk und den Integrinen nach der Bindung von Selektinen an PSGL-1 ist jedoch unbekannt. Um den Signaltransduktionsweg zu identifizie-

Interpretation

Capsaicin und Veratridin führten zu einer dosisabhängigen Freisetzung von CGRP aus kutanen Nozizeptoren. Die durch Capsaicin induzierte Freisetzung konnte mit Lidocain dosisabhängig vollständig, die durch Veratridin induzierte Freisetzung jedoch nur teilweise blockiert werden. Im Vergleich zur Rattenhaut führen vergleichbare Stimuli bei menschlicher Haut zu geringeren messbaren CGRP-Konzentrationen. Das vorgestellte Modell könnte im Rahmen präklinischer Arzneimittelstudien helfen, Effizienz- und Potenzdaten zu generieren.

ren, haben wir verschiedene Gen-defiziente Mäuse in autoperfundierten Flusskammerexperimenten, intravitalmikroskopischen Untersuchungen, inflammatorischen Modellen und biochemischen Studien untersucht.

Methodik

Die Tierschutzkommission genehmigte alle hier aufgeführten Tierversuche. Um die Rollgeschwindigkeit auf verschiedenen Adhäsionsmolekülen zu bestimmen, wurden Mäusen (C57/Black 6-Mäuse, Btk^{-/-}-Mäuse, Plcg2^{-/-} (Phospholipase C γ 2)-Mäuse) die A. carotis kanüliert und der Katheter an autoperfundierte Flusskammern (E-Selektin: 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, ICAM-1: 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) angeschlossen. Intravitalmikroskopische Untersuchungen am M. cremaster wurden zwei Stunden nach intraskrotaler Applikation von 500 ng TNF- α durchgeführt, um die Rollgeschwindigkeit, Adhäsion und Rekrutierung von Leukozyten zu bestimmen. Die Rekrutierung von Leukozyten in die Peritonealhöhle in einem Peritonitis-Modell wurde benutzt, um die physiologische Relevanz unserer Ergebnisse zu überprüfen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ANOVA und anschließenden Student-Newmann-Keul-Tests (Daten als Mittelwert $\pm$ SEM, n=3-6).

Ergebnisse

In autoperfundierten Flusskammern war die Rollgeschwindigkeit von WT-Leukozyten auf E-Selektin und ICAM-1 (1,4 $\mu\text{m}/\text{sek.}$) signifikant reduziert im Vergleich zu E-Selektin allein (2,1 $\mu\text{m}/\text{sek.}$). Leukozyten von Btk^{-/-}-Mäusen zeigten eine komplette Aufhebung der reduzierten Rollgeschwindigkeit auf E-selectin und ICAM-1 (2,1 $\mu\text{m}/\text{sek.}$), wohingegen die Rollgeschwindigkeit von Plcg2^{-/-}-Leukozyten auf E-Selektin und ICAM-1 nur partiell aufgehoben war (1,8 $\mu\text{m}/\text{sek.}$). Intravitalmikroskopische Untersuchungen an entzündeten postkapillären Venolen des M. cremaster bestätigten die Flusskammerdaten. Mit Hilfe von Plcg2^{-/-}-Mäusen und einem spe-

Literatur

1. Averbek B, Reeh PW. Interactions of inflammatory mediators stimulating release of calcitonin gene-related peptide, substance P and prostaglandin E(2) from isolated rat skin. *Neuropharmacology* 2001;40:416-423.
2. Kessler F, Habelt C, Averbek B, Reeh PW, Kress M. Heat-induced release of CGRP from isolated rat skin and effects of bradykinin and the protein kinase C activator PMA. *Pain* 1999;83:289-295.
3. Kress M, Guthmann C, Averbek B, Reeh PW. Calcitonin gene-related peptide and prostaglandin E2 but not substance P release induced by antidromic nerve stimulation from rat skin in vitro. *Neuroscience* 1999;89:303-310.

zifischen PI3K-Inhibitor konnte in Flusskammerexperimenten gezeigt werden, dass sich der Signaltransduktionsweg unterhalb von Btk in einen PLC γ 2- und PI3K γ -abhängigen Arm aufteilt. Biochemische Studien und die Bestimmung der intrazellulären Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP3)-Konzentration zeigten, dass die Phosphorylierung von PLC γ 2 und Akt, als Marker der PI3K-Aktivierung sowie ein Anstieg der IP3-Konzentration in Leukozyten von Btk^{-/-}-Mäusen aufgehoben war. Die Inhibition des Signaltransduktionsweges verminderte die G α i-unabhängige Adhäsion und Transmigration von Leukozyten in entzündeten postkapillären Venolen des M. cremaster. Die G α i-unabhängige Rekrutierung von Leukozyten in die entzündete Peritonealhöhle war signifikant reduziert bei Btk^{-/-}- und Plcg2^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen (WT-Mäuse: $6.3 \pm 0.9 \times 10^5$ Leukozyten/Maus, Btk^{-/-}-Mäuse: $1.8 \pm 0.8 \times 10^5$ Leukozyten/Maus und Plcg2^{-/-}-Mäuse: $0.5 \pm 0.1 \times 10^5$ Leukozyten/Maus, p < 0,05).

Interpretation

Diese Daten zeigen, dass der neu identifizierte Signaltransduktionsweg, der durch die Bindung von E-Selektin aktiviert wird, eine wichtige funktionelle Bedeutung hat.

Literatur

1. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 2007;7:678-689.
2. Zarbock A, Lowell CA, Ley K. Spleen tyrosine kinase Syk is necessary for E-selectin-induced $\alpha\text{L}\beta_2$ integrin-mediated rolling on ICAM-1. *Immunity* 2007;26:773-783.
3. Zarbock A, Abram CL, Hundt M, Altman A, Lowell CA, Ley K. PSGL-1 engagement by E-selectin signals through Src kinase Fgr and ITAM adapters DAP12 and Fc γ R to induce slow leukocyte rolling. *J Exp Med* 2008;205:2339-2347.