

Inhalt

| | |
|--|-----|
| S. Bergt · A. Grub · A. Güter · C. Beltschany · S. Wagner · B. Vollmar · G. Nöldge-Schomburg · J. Roesner | 373 |
| Pravastatin verbessert die Überlebensrate und die funktionell-neurologische Regeneration von Mäusen nach Herz-Kreislaufstillstand und Reanimation | |
| A. Böcker · D. Hackel · S. Amasheh · N. Roewer · M. Fromm · H. Rittner · A. Brack | 374 |
| Low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP-1) Rezeptor als Angriffspunkt für die Öffnung des Perineuriums zur Regionalanästhesie bei Ratten | |
| T. Brandenburger · R. Huhn · B. Pannen · N. Heinen · I. Bauer · A. Heinen | 376 |
| Der Einfluss der ischämischen Fernpräkonditionierung auf die Expression von Connexin 43 nach Ischämie und Reperfusion im Myokard der Ratte | |
| S. Braun · M. G. Donner · T. Kolb · C. Strucks · P. Cebula · P. van Caster · D. Herebian · I. Bauer · B. Pannen · D. Häussinger | 377 |
| Einfluss des organischen Osmolyts Taurin auf die sekretorische Funktion der Leber nach Ischämie und Reperfusion | |
| S. M. Coldewey · A. Khan · M. Rogazzo · M. Collino · N. SA Patel · A. Kapoor · C. Thiernemann | 378 |
| Erythropoetin reduziert die Sepsis-assoziierte myokardiale Dysfunktion bei der Maus durch eine Aktivierung des Akt-Signaltransduktionswegs über den β Common-Rezeptor | |
| V.-S. Eckle · S. Hauser · B. Drexler · B. Antkowiak · C. Grasshoff | 380 |
| Die unterschiedliche Freisetzung von GABA und Glyzin verändert deren Bedeutung für die spinale Hemmung durch Sevofluran in vitro | |
| D. Hackel · D. Zwanziger · A. Böcker · I. E. Blasig · N. Roewer · A. Brack · H. L. Rittner | 381 |
| Tight Junction Interferenzpeptide zur Öffnung des Perineuriums – neue Modulatoren der regionalen Anästhesie | |
| D. Hauer · P. Campolongo · B. Roozendaal · G. Schelling | 382 |
| Glukokortikoide und Endocannabinoide interagieren bei der Konsolidierung des traumatischen Gedächtnisses: Ein neuropharmakologisches Modell an der Ratte zur hypermnestischen Wirkung von Propofol | |
| J. M. Herter · J. Rossaint · H. Van Aken · A. Zarbock | 384 |
| Die Eliminierung von P-Rex1 reduziert die Rekrutierung von Neutrophilen in einem murinen Modell der akuten pulmonalen Inflammation | |
| C. Herzog · A. Lorenz · A. Chowdhury · R. Lichtinghagen · F. Echtermeyer · G. Theilmeier | 385 |
| MitoNEET schützt Kardiomyoblasten vor Hypoxie-vermitteltem oxidativem Stress und wird durch Hemmung der Glutathionreduktase-Aktivität induziert | |
| J. Heyn · C. Hinske · S. Kreth | 386 |
| Beeinflussung humaner T-Zell-Funktionen durch ein miR-641 reguliertes Netzwerk im PI3K/AKT-Signalweg | |
| T. Hilbert · M. Aslam · S. Frede · J. Poth · G. Baumgarten · P. Knüfermann | 388 |
| Statine stabilisieren in vitro die endotheliale Barriere durch Inhibition der Angiopoietin-2-Exozytose | |
| C. Hornuß · G. Schelling · K. Tabata · N. Sambol · C. C. Apfel | 389 |
| Die expiratorische Propofolmessung zur Echtzeit-Abschätzung der Propofol-Plasmakonzentration: Ein pharmakokinetisch/-dynamisches Modell an Freiwilligen | |
| R. Huhn · F. Behmenburg · I. Bauer · M. W. Hollmann · A. Heinen | 390 |
| Kardioprotektion im Alter durch Aktivierung von mK_{Ca} -Kanälen bei der Ratte in vivo | |
| N. Jbeily · F. A. Gonnert · I. Suckert · M. Bauer · R. A. Claus | 392 |
| Sphingomyelinase als Effektor der Wirtsreaktion bei polymikrobieller Sepsis | |
| C. Jennewein · P. Paulus · N. Tran · P. Ellinghaus · J. A. Eble · K. Zacharowski | 393 |
| Die Rolle von Fibrin Fragment E während der Entzündung | |
| J. Karlik · U. H. Frey · F. Herbstreit · J. Peters | 394 |
| Genetische Varianten im β_2 -Adrenozeptorsystem beeinflussen den Vasopressorbedarf unter thorakaler Epiduralanästhesie | |
| P. Keller · S. Tank · M. Kiefmann · A. Mecklenburg · C. Olotu · A.E. Goetz · R. Kiefmann | 395 |
| Alveolarepithelzellen registrieren CO_2 mit Hilfe des Citratzyklus | |
| A. Mecklenburg · A. Albrecht · F. Gniech · C. Olotu · S. Hammerschmidt · A.E. Goetz · R. Kiefmann | 396 |
| Das pulmonale Endothel registriert S. pneumoniae über ein Pneumolysin-vermitteltes Calcium-Signal – Gibt es Hinweise auf die Aktivierung von spezifischen Rezeptoren? | |

Abstracts der 26. Wissenschaftlichen Arbeitstage der DGAI

10. - 11.02.2012, Würzburg

Die Vorträge, deren Abstracts nachfolgend publiziert werden, wurden in einem verblindeten Verfahren von sieben Gutachtern ausgewählt und auf den Wissenschaftlichen Arbeitstagen der DGAI vom 10. - 11.02.2012 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 2013 der Fresenius-Stiftung und das DGAI-Forschungsstipendium der Fresenius-Stiftung finden Sie auf der Seite 372.

| | |
|--|-----|
| V. Mirakaj · K. König · T. Granja · D. Gatidou · P. Rosenberger | 399 |
| Der Neogeninrezeptor besitzt pro-inflammatorische Funktionen während einer akuten Entzündungsreaktion im Mausmodell | |
| K. Morsbach · G. Eichner · A. Meier-Hellmann · S.N. Stehr | 400 |
| Korrelation zwischen einer standardisierten oder gewichtsadaptierten Dosierung von Enoxaparin auf den Anti-Xa-Spiegel bei kritisch kranken Patienten | |
| A. Neumann · D. Hackel · D. Pflücke · N. Roewer · A. Brack · H. Rittner | 401 |
| Reaktive Sauerstoffradikale in der Schmerzentstehung bei Ratten | |
| S.T. Schäfer · S. Frede · S. Winning · J. Walden · N. Schönborn · J. Fandrey · A. Limmer · J. Peters · M. Adamzik | 402 |
| Einfluss zirkulierender mitochondrialer DNA auf Genexpression und Letalität bei Intensivpatienten | |
| E.-V. Schaible · I. Petkovic · M. Burek · C. Förster · N. Roewer · C. Werner · K. Engelhard · S.C. Thal | 404 |
| Eine PAI-1-vermittelte überschießende Aktivierung der Gerinnung ist ein entscheidender Faktor für den sekundären Hirnschaden nach Schädel-Hirn-Trauma | |
| N. Schallner · T. Loop · H. Bürkle · W. A. Lagrèze · J. Biermann · U. Göbel | 406 |
| Therapeutische Inhalation von Kohlenmonoxid hemmt den Ischämie-Reperfusionsschaden retinaler Ganglienzellen der Ratte | |
| M. A. Schick · N. Schlegel · W. Baar · M. Meir · S. Flemming · N. Roewer · C. Wunder · | 408 |
| Der inflammatorische Zusammenbruch der intestinalen Epithelbarriere in vivo und in vitro ist cAMP/RhoA-abhängig | |
| J. Spaeth · C. Dassow · J. Guttman · J. Haberstroh · K. Förster · S. Schumann · U. Goebel | 410 |
| Aktive, flusskontrollierte Expiration reduziert das pulmonale Ödem und verbessert die Atemmechanik bei beatmeten Schweinen mit Ölsäure-induziertem Lungenschaden | |

- C. Stoetzer · V. Schulze · E. Eberhard · N. Foadi · J. de la Roche · J. Ahrens · A. Lampert · A. Leffler** 411
Eine potente und Lokalanästhetika-ähnliche Inhibition des kardialen Natriumkanals Nav1.5 als möglicher Mechanismus maligner Rhythmusstörungen durch Methadon
- S. C. Thal · E.-V. Schaible · W. Neuhaus · D. Scheffer · M. Brandstetter · N. Roewer · C. Werner · K. Engelhard · C. Wunder · C. Förster** 412
Die Inhibition der proteasomalen Degradation von Glukokortikoid-Rezeptoren bewirkt die Aufrechterhaltung der Blut-Hirn-Schranken stabilisierenden Wirkung von Dexamethason nach experimentellem Schädelhirntrauma bei Mäusen
- T. Tischer-Zeitz · S.-C. Kim · J. Stumpner · C. Lotz · P. Knüfermann · G. Baumgarten · M. Lange · N. Roewer · T. M. Smul** 414
Die Langzeitblockade beta1-adrenerger Rezeptoren hebt die Kardioprotektion durch Desfluran-induzierte Postkonditionierung auf
- S. Treskatsch · A. Feldheiser · M. Sifringer · M. Shaqura · M. Shakibaei · S. A. Mousa · M. Schäfer · C. Spies** 415
Aktivierung des kardialen Delta-Opioidsystems der Ratte im progressiven Verlauf einer experimentellen Herzinsuffizienz
- V. van der Heide · P. Möhnle · J. Briegel · S. Kreth** 416
Micro-RNA-31-vermittelte Regulation der Th1-Antwort bei Patienten mit Sepsis und viralem ARDS
- N.-M. Wagner · L. Bierhansl · G. Nöldge-Schomburg · B. Vollmar · J. P. Roesner** 417
Der Toll-like Rezeptor 2 moduliert Endothelzellfunktionen und Gefäßneubildungsprozesse: Bedeutung der Interaktion von TLR2 mit dem SDF-1/CXCR4-System
- R. Werdehausen · V. Eulenburg · M. Minett · N. Eijkelkamp · I. Bauer · J. N. Wood · H. Hermanns** 419
Der Lidocain-Metabolit N-Ethylglycin wirkt antinozizeptiv bei chronisch inflammatorischem Schmerz bei der Maus
- T. Wöhrle · J. Rink · S. Kreth** 420
Regulation der purinergen T-Zell-Aktivierung durch miR-150 bei Patienten mit Sepsis

Ausschreibung des DGAI-Forschungsstipendiums der Fresenius-Stiftung

Die 27. Wissenschaftlichen Arbeitstage der Deutschen Gesellschaft für Anästhesiologie und Intensivmedizin (DGAI) werden vom **22. - 23.02.2013** in Würzburg, Festung Marienberg, Hofstuben, veranstaltet.

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

2013 wird das DGAI-Forschungsstipendium der Fresenius-Stiftung für eine hervorragende Forschungsarbeit mit 15.000 € dotiert. Grundlagenforschung und klinische Forschung sollen gleichermaßen gefördert werden.

Einsendeschluss:

06.01.2013

Nähere Informationen:

www.anaesthesie.uk-wuerzburg.de/wat-wissenschaftliche-arbeitstage.html
E-Mail: wat_wuerzburg@klinik.uni-wuerzburg.de

Anschrift:

Klinik und Poliklinik für
Anästhesiologie
Universitätsklinikum Würzburg
(Sekretariat Frau K. Geier)
Direktor: Prof. Dr. Dr. h.c. N. Roewer
Oberdürrbacher Straße 6
97080 Würzburg, Deutschland

Tel.: 0931 20130015
Fax: 0931 20130019

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

Pravastatin verbessert die Überlebensrate und die funktionell-neurologische Regeneration von Mäusen nach Herz-Kreislaufstillstand und Reanimation

S. Bergt¹ · A. Grub¹ · A. Güter¹ · C. Beltschany¹ · S. Wagner¹ · B. Vollmar² · G. Nöldge-Schomburg¹ · Jan Roesner¹

1 Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie,

2 Institut für Experimentelle Chirurgie, Universität Rostock

Korrespondenz: stefan@bergt.de

Fragestellung

Trotz intensiver Forschungsarbeit sind die Behandlungsergebnisse von Patienten nach Herz-Kreislaufstillstand und Reanimation (CA/CPR) in Bezug auf das Überleben und die funktionell-neurologische Regeneration unbefriedigend schlecht. Nur 0,6-1,8% der präklinisch reanimierten Patienten überleben ein solches Ereignis ohne neurologisches Defizit [1]. In tierexperimentellen und klinischen Studien erwiesen sich Statine (HMG-CoA Reduktase-Inhibitoren) als vielversprechende Substanzen zur Reduktion von Ischämie bedingten Läsionen in neuronalen Geweben, z.B. bei kardio-vaskulären Ereignissen (Apoplex) oder bei spinaler Ischämie [2,3]. Wir prüften die Hypothese, ob sich eine Therapie mit dem wasserlöslichen (Hydroxyl-Form), und damit intravenös applizierbaren Pravastatin positiv auf das Überleben und die funktionell-neurologische Regeneration von Mäusen nach Herz-Kreislaufstillstand und kardiopulmonaler Reanimation auswirkt.

Methodik

Das Rostocker Reanimationsmodell beinhaltet die maschinelle Beatmung (F_iO_2 0,21) der intubierten Maus, die Induktion eines 10-minütigen Herz-Kreislaufstillstands durch KCl (80 µg/kg KG) und die maschinelle Reanimation ($f=450/\text{min}$) mit Injektion von Adrenalin (10 µg). Nach behördlicher Genehmigung schlossen wir insgesamt 70 weibliche C57BL/6j-Mäuse in die Versuche ein und randomisierten die Tiere in 2 Gruppen (CA/CPR NaCl, $n=35$ vs. CA/CPR-Pravastatin, $n=35$). Zur Beurteilung des funktionell-neurologischen Status unserer Tiere nutzen wir die Parameter Überleben, Körpergewicht (relativ), RotaRod Test und Morris Water Maze Test. Alle Tiere erhielten zu den Zeitpunkten 0 min und 60 min nach Beginn der Reanimation ein äquivalentes Volumen (0,1 ml) NaCl 0,9% bzw. Pravastatin (0,5 mg/kg KG) i.v. injiziert. Die Applikation von NaCl 0,9% bzw. von Pravastatin wurde im Verlauf von 5 Tagen, jeweils morgens durch i.v.-Injektion in Kurznarkose, wiederholt. Der Beobachtungszeitraum nach der Reanimation betrug 28 Tage.

Entsprechend den im Vorfeld festgelegten Ausschlusskriterien (z.B. Blutung, Dislokation des Tubus) gelangten insgesamt 62 Tiere (CA/CPR NaCl, $n=31$; CA/CPR-Pravastatin, $n=31$) in die Auswertung. Die Ergebnisse sind als Mittelwert (MW) \pm SD bzw. als Median [25-75 Perzentile] dargestellt. Statistik: Kolmogorov-Smirnov-Test; Student's t-Test; Mann-Whitney-Rangsummentest; statistische Signifikanz bei $p<0,05$.

Ergebnisse

Die mit Pravastatin behandelten Tiere zeigten – im Vergleich zu den NaCl-Tieren – an den Tagen 2 und 3 nach CA/CPR ein höheres relatives Körpergewicht als Ausdruck des besseren Allgemeinzustands (Tab. 1). Im RotaRod Test erreichten die Pravastatin-Tiere an den Tagen 3, 4 und 5 längere Laufzeiten (Tab. 1). Im Unterschied zur NaCl-Gruppe konnten nach der Reanimation deutlich mehr Tiere der Pravastatin-Gruppe einen kompletten Morris Water Maze Test absolvieren (8/31 vs. 17/31 Tiere; $p<0,05$) und das zu einem früheren Zeitpunkt (Tag nach Reanimation: Median 5 vs. 4; $p<0,05$) (Tab. 1). Beim räumlichen Lernen (Morris Water Maze Test) wiesen die Pravastatin-Tiere nach Reanimation ebenfalls eine höhere Leistungsfähigkeit auf (Tab. 1). Der verbesserte neurologische Status war mit einer signifikant höheren Überlebensrate der mit Pravastatin behandelten Tiere assoziiert (54,8 vs. 29,0%; $p<0,05$) (Abb. 1). Die Überprüfung der Injektionstechnik an einer gesunden Kontrollgruppe ($n=10$) führte nach täglicher Injektion von Pravastatin (2,0 mg/kg KG i.v.) über 7 Tage zu einer Abnahme der Plasmakonzentration von Cholesterol (99,0 [92,4-109,1] mg/dl vs. 91,0 [82,8-97,3] mg/dl).

Interpretation

Die intravenöse Applikation von Pravastatin ist bei unserem Reanimationsmodell mit einem signifikanten Überlebensvorteil und einem deutlich besseren funktionell neurologischen Ergebnis der Versuchstiere verbunden. Die Therapie mit dem wasserlöslichen Pravastatin könnte einen interessanten Therapieansatz zur Verbesserung des Behandlungsergebnisses nach kardiopulmonaler Reanimation darstellen.

Literatur

1. Laver S: Mode of death after admission to an intensive care unit following cardiac arrest. Intensive Care Med 2004;30:2126-2128
2. Prinz V, Laufs U, Endres M: Intravenous Rosuvastatin for Acute Stroke Treatment: An Animal Study. Stroke 2008;39:433-438
3. Saito T, Tsuchida M, Hayashi J: Reduction of Spinal Cord Ischemia/Reperfusion Injury with Simvastatin in Rats. Anesth Analg 2011; 113:565-57.

Abbildung 1

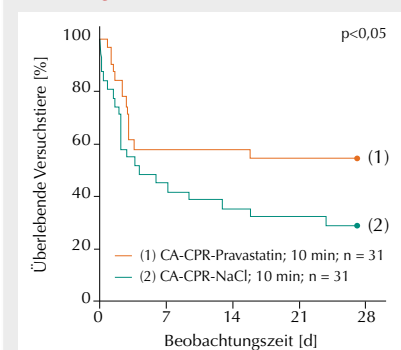


Tabelle 1

Übersicht der funktionell-neurologischen Regeneration.

* $p<0,05$

| Parameter | | Gruppe | |
|--------------------------------|--------|---|-------------------------------|
| | | CA/CPR-NaCl ($n=31$) | CA/CPR-Pravastatin ($n=31$) |
| Körpergewicht (relativ) | | in [%] vom Ausgangsgewicht – MW \pm SD | |
| Tag 2 | * | 80,9 \pm 1,12 | 84,0 \pm 0,82 |
| Tag 3 | * | 79,2 \pm 1,54 | 83,1 \pm 1,49 |
| Tag 28 | n.s. | 102,0 \pm 2,0 | 97,8 \pm 1,09 |
| RotaRod | | Zeit [s] – Median [25 - 75 Perzentile] | |
| Tag 3 | n.s. | 401 [138-734] | 670 [321-890] |
| Tag 4 | * | 610 [227-900] | 900 [723-900] |
| Tag 5 | * | 810 [578-894] | 900 [696-900] |
| Morris Water Maze | | Zeit zur Plattform [s] – Median [25 - 75 Perzentile] | |
| Position | Tag -7 | 15 [7-30] | |
| (1) | Tag -1 | 6 [2-18] | |
| Position | Tag 10 | 16 [8-30] | 12 [6-24] |
| (2) | Tag 15 | 9 [6-15] | 5 [3-10] |
| | | Teilnahme am Test nach Reanimation | |
| Anzahl der Tiere | * | 8/31 (25,8%) | 17/31 (54,8%) |
| Tag nach der Reanimation | * | 5 [4-6] | 4 [3-4] |

Low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP-1) Rezeptor als Angriffspunkt für die Öffnung des Perineuriums zur Regionalanästhesie bei Ratten

A. Böcker¹ · D. Hackel^{1,2} · S. Amasheh² · N. Roewer¹ · M. Fromm² · H. Rittner¹ · A. Brack¹

¹ Klinik für Anästhesiologie, Universitätsklinikum Würzburg

² Institut für Klinische Physiologie, Charité - Campus Benjamin Franklin

Korrespondenz: alex-boecker@web.de

Fragestellung

Experimentelle Ansätze zur selektiven Blockade von nozizeptiven Neuronen sind in vivo stark durch die Diffusionsbarriere des Perineuriums eingeschränkt, die das Vordringen von hydrophilen Substanzen zu ihrem Wirkort verhindert. Entscheidend für diese Barrierefunktion sind Tight Junctions zwischen Perineurialzellen, an deren Ausbildung das Transmembranprotein Claudin-1 beteiligt ist. In Vorarbeiten wurde gezeigt, dass die periphere Injektion einer 10% NaCl-Lösung zur vorübergehenden Öffnung des Perineuriums führt [1]. Dabei kommt es zur Freisetzung der Matrix-Metalloproteinase 9 (MMP9), die über Interaktion mit dem low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP-1) Rezeptor eine Konzentrationsabnahme von Claudin-1 bewirkt. Durch perineurale Koinjektion von 10% NaCl mit dem Opioidagonisten DAMGO ([D-Ala², N-MePhe⁴, Gly⁵]-Enkephalin) bzw. Tetrodotoxin ist damit im Verhaltensexperiment ein analgetischer Effekt auszulösen. Beobachtungen an der Blut-Hirn-Schranke [2] konnten eine Öffnung über Interaktion von tPA mit LRP-1 zeigen. In dieser Studie sollten die Barriereöffnung sowie intrazelluläre Signalprozesse, die an der Öffnung des Perineuriums beteiligt sind, unter verschiedenen Bedingungen (hypertone NaCl-Lösung, MMP9 und tPA) charakterisiert werden.

Methodik

Mit Genehmigung der zuständigen Tier-schutzbehörde wurden MMP9, 10 % NaCl-Lösung, tPA, ein Erk-Inhibitor (PD 98059) oder DAMGO mit Hilfe eines Nervenstimulators perineural an den N. ischiadicus von Wistar-Ratten injiziert. Danach wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Nerven entnommen, um im Western Blot die Claudin-1-Expression in der Membranfraktion sowie die Phosphorylierung der intrazellulären Signalproteine Erk und Akt darzustellen. Nach perineuraler Injektion von tPA wurden in Schmerzverhaltenstests die Barriere öffnenden Wirkungen und immunhistochemisch und im Western Blot Auswirkungen auf die Konzentration von Claudin-1 und pErk untersucht.

Ergebnisse

Nach peripherer Injektion der 10% NaCl-Lösung war über einen Zeitraum von 5-120 min eine Reduktion von Claudin-1 in der Membranfraktion und eine verstärkte Phosphorylierung von Erk, nicht aber von Akt zu beobachten. Die Konzentrationszunahme von pErk wurde dabei nur im Perineurium, nicht im Nerveninneren nachgewiesen (Abb. A, P=Perineurium, N=Nerv, * $p < 0,05$, ANOVA, $n=4$, Mittelwert \pm Standardfehler). Ebenso führte die periphere Injektion von MMP9 zu reduziertem Claudin-1 und einer verstärkten Phosphorylierung von pErk (Abb. B, * $p < 0,05$, ANOVA, $n=6$, Mittelwert \pm Standardfehler). In Verhaltensexperimenten konnte gezeigt werden, dass die perineurale Injektion des Erk-Inhibitors PD98059 dosisabhängig zur Aufhebung der Antinozizeption führte, die nach Gabe von DAMGO in 10% NaCl zu beobachten war (Abb. C, * $p < 0,05$, ANOVA, Student-Newman-Keuls, $n=6$). PD98059 blockierte den Abbau von Claudin-1 nach Injektion von 10% NaCl. Perineurale Koinjektion von tPA (als LRP-1 Ligand) und DAMGO ermöglicht ebenfalls antinozizeptive Effekte. Immunhistochemisch und im Western Blot zeigte sich bei verschiedenen Dosierungen von tPA eine Konzentrationsabnahme von

Claudin-1, 60 min nach Injektion war eine verstärkte Phosphorylierung von pErk nachzuweisen.

Interpretation

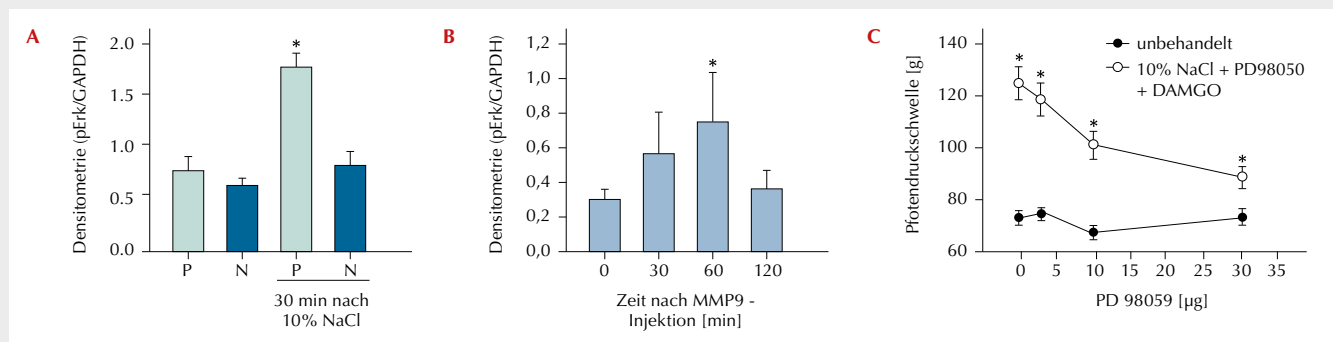
Nach Injektion von 10% NaCl kommt es zur verstärkten Phosphorylierung von pErk, die sich durch eine Interaktion der MMP9 Hemopexin-Domäne (MMP9-PEX) mit dem LRP-1 Rezeptor [3] erklären lässt. Folge dieser Signalprozesse ist eine Konzentrationsabnahme von Claudin-1 und eine erhöhte Permeabilität des Perineuriums. Ähnlich zeigen erste Experimente auch nach Injektion von tPA eine Konzentrationsabnahme von Claudin-1 und eine verstärkte Phosphorylierung von pErk. Damit bietet LRP-1 einen innovativen Angriffspunkt, um auch in vivo durch Öffnung des Perineuriums neue hydrophile Medikamente zur selektiven Blockade von Schmerzfasern zu nutzen.

Gefördert durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (FOR 721/2 TP8).

Literatur

1. Rittner HL, Hackel D, Yamdeu RS, Mousa SA, Stein C, et al: Antinociception by neutrophil-derived opioid peptides in noninflamed tissue – role of hypertonicity and the perineurium. *Brain Behav Immun* 2009;23:548-557
2. Yepes M, Sandkvist M, Moore EG, Bugge TH, Strickland DK, et al: Tissue-type plasminogen activator induces opening of the blood-brain barrier via the LDL receptor-related protein. *The Journal of clinical investigation* 2003;112:1533-1540
3. Mantuano E, Inoue G, Li X, Takahashi K, Gaultier A, et al: The hemopexin domain of matrix metalloproteinase-9 activates cell signaling and promotes migration of schwann cells by binding to low-density lipoprotein receptor-related protein. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 2008;28:11571-11582.

Abbildung 1



Der Einfluss der ischämischen Fernpräkonditionierung auf die Expression von Connexin 43 nach Ischämie und Reperfusion im Myokard der Ratte

T. Brandenburger · R. Huhn · B. Pannen · N. Heinen · I. Bauer · A. Heinen

Klinik für Anästhesiologie, Universitätsklinikum Düsseldorf

Korrespondenz:

timo.brandenburger@med.uni-duesseldorf.de

Fragestellung

Die ischämische Fernpräkonditionierung (Remote Ischemic Preconditioning, RIPC) reduziert den Ischämie-Reperfusionsschaden des Herzens. Die molekularen Mechanismen der Protektion durch RIPC sind nur unzureichend geklärt. Connexin 43 (Cx43) ist an der Vermittlung der Kardioprotektion durch die ischämische Präkonditionierung (IPC) beteiligt [1], und ein heterozygoter Knockout von Cx43 führt zu einem Verlust der Kardioprotektion durch IPC [2]. Zudem stimuliert mitochondriales Cx43 den mitochondrialen ATP-abhängigen Kaliumkanal [3], welcher ein zentraler Bestandteil der Signalvermittlung verschiedener kardioprotektiver Interventionen ist. Es war Ziel der vorliegenden Untersuchung, die Frage zu beantworten, ob RIPC einen Einfluss auf die Expression von Cx43 im Myokard der Ratte nach Ischämie und Reperfusion hat.

Methodik

Mit Genehmigung der zuständigen Behörde wurden die Versuche an Pentobarbital-anästhesierten männlichen Wistar-Ratten durchgeführt. Die Tiere wurden folgenden Gruppen randomisiert zugeordnet (n=6 / Gruppe): 1) Scheinoperation (Sham), 2) RIPC (4 Zyklen beidseitige 5-minütige Hinterlaufischämie und -reperfusion), 3) RIPC gefolgt von 35 min Okklusion eines Hauptastes der linken Koronararterie und 2 h Reperfusion (RIPC + I/R) oder 4) nur I/R. Zur Analyse des protektiven Effektes der RIPC-Behandlung wurden in zusätzlichen Experimenten die Infarktgrößen von Tieren einer I/R-Gruppe und einer RIPC + I/R-Gruppe mittels Triphenyltetrazoliumchlorid-Färbung bestimmt (n=6 / Gruppe). Für die molekularbiologischen Analysen wurden die Herzen nach Perfusion mit Evans Blue in Risikogebiet (Area at Risk, AAR) und Nicht-risikogebiet (Area non at risk, non AAR) unterteilt. Die Expression der Cx43 messengerRNA

(mRNA) wurde durch real-time quantitative PCR (qPCR) ermittelt. Nach subzellulärer Fraktionierung in Membran- und mitochondriale Fraktion wurde die Cx43-Proteinexpression durch Western-Blot-Analyse bestimmt und in Relation zu Na⁺-K⁺-ATPase beziehungsweise Prohibitin als Standardproteine ausgewertet. Eine Untersuchung der Cx43-Lokalisation wurde immunhistochemisch durchgeführt. Statistik: Student's t-Test oder Einweg-Varianz-Analyse mit Tukey post-hoc test, p<0,05.

Ergebnisse

RIPC führte zu einer signifikanten Abnahme der Infarktgröße (I/R: 73 ± 5% vs. RIPC + I/R: 34 ± 14%, p<0,05). Die Expression der Cx43-mRNA war in allen Gruppen unverändert. In der AAR führte I/R zu einer starken Abnahme der relativen Cx43-Proteinexpression sowohl in der Membran- als auch der mitochondrialen Fraktion. Diese Abnahme war in der RIPC + I/R-Gruppe zum Teil aufgehoben (p<0,05) (Abb. 1). Zudem zeigte sich in der Membranfraktion der non AAR, dass in der RIPC + I/R-Gruppe der Gehalt an Cx43 signifikant höher war als in der I/R-Gruppe. Immunhistochemisch konnte in der AAR ein Verlust des Cx43-Signals durch I/R im Bereich der kardialen Glanzstreifen gezeigt werden, der in der RIPC + I/R-Gruppe weniger stark ausgeprägt zu sein schien als in der I/R-Gruppe.

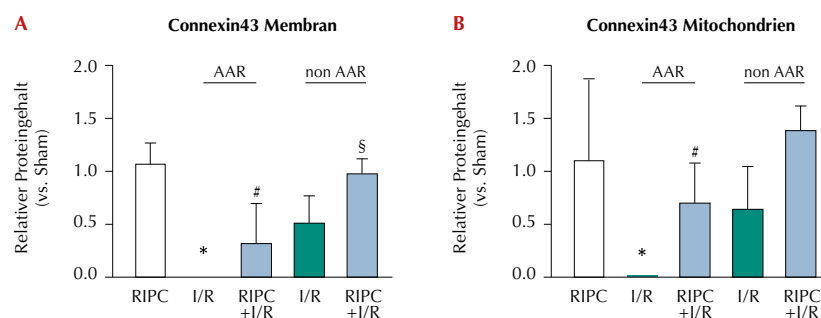
Interpretation

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass RIPC den ischämie-reperusionsabhängigen Verlust von Cx43 in der AAR im Myokard der Ratte reduziert. Da dieser Effekt den Proteingehalt, nicht jedoch den mRNA-Gehalt von Cx43 betrifft, scheint es sich um ein posttranskriptionelles Phänomen zu handeln. Der Erhalt der Cx43-Proteinexpression nach RIPC könnte zum Schutz des Myokards der Ratte beitragen.

Literatur

1. Schulz R, Boengler K, Totzeck A, Luo Y, Garcia-Dorado D, Heusch G: Connexin 43 in ischemic pre- and postconditioning. *Heart Fail Rev* 2007;12(3-4):261-266
2. Schwanke U, Konietzka I, Duschin A, Li X, Schulz R, Heusch G: No ischemic preconditioning in heterozygous connexin43-deficient mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 283(4):H1740-1742
3. Rottlaender D, Boengler K, Wolny M, Michels G, Endres-Becker J, Motloch LJ, Schwaiger A, Buechert A, Schulz R, Heusch G, et al: Connexin 43 acts as a cytoprotective mediator of signal transduction by stimulating mitochondrial ATP channels in mouse cardiomyocytes. *J Clin Invest* 120(5):1441-1453.

Abbildung 1



Western-Blot-Analyse der Cx43-Proteinexpression.

A: Cx43-Proteinexpression in der Membranfraktion

B: Cx43-Proteinexpression in der mitochondrialen Fraktion. MW ± SD, n=6
(RIPC: remote ischemic preconditioning, I/R: Ischämie/Reperfusion).

* p<0,05 vs. Sham, # p<0,05 vs. I/R AAR, § p<0,05 vs. I/R non AAR.

Einfluss des organischen Osmolyts Taurin auf die sekretorische Funktion der Leber nach Ischämie und Reperfusion

S. Braun¹ · M. G. Donner² · T. Kolb² · C. Strucks¹ · P. Cebula² · P. van Caster¹ · D. Herebian³ · I. Bauer¹ · B. Pannen¹ · D. Häussinger²

1 Klinik für Anästhesiologie,

2 Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie,

3 Klinik für Allgemeine Pädiatrie und Neonatologie, Universitätsklinikum Düsseldorf

Korrespondenz: brauns@uni-duesseldorf.de

Fragestellung

Die im Rahmen einer Leberteilresektion auftretende Ischämie und Reperfusion kann zu einer signifikanten hepatozellulären und cholestatischen Leberschädigung führen. Frühere Untersuchungen zeigten, dass das organische Osmolyt Taurin die inflammatorische Aktivität von Kupferzellen moduliert [1] und bei kalter Ischämie und Reperfusion hepatoprotektive Wirkungen entfaltet [2]. Die Mechanismen der Reduktion der Leberschädigung sind bisher unzureichend charakterisiert. Ziel dieser Untersuchung war es, den Einfluss von Taurin auf die hepatozelluläre Integrität und sekretorische Funktion der Leber sowie auf die Expression der hepatobiliären Transporter Bsep, Mrp2, Ntcp, Oatp1, Oatp2 und Oatp4 nach IR zu untersuchen und mit den Effekten einer ischämischen Präkonditionierung (IPC) zu vergleichen.

Methodik

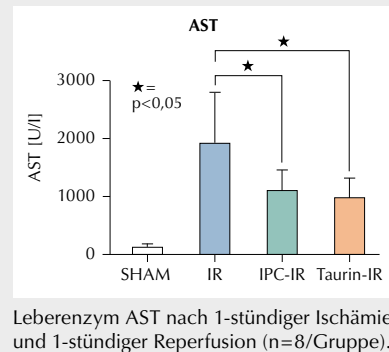
Nach Genehmigung durch die zuständige Behörde wurden 32 männliche Wistar-Ratten randomisiert folgenden 4 Gruppen zugeteilt (n=8/Gruppe): 1: SHAM: Scheinoperation ohne Intervention; 2: IR: 60 min 70%-ige Leberischämie / 60 min Reperfusion; 3: IPC-IR: wie IR mit 10/10-minütiger ischämischer Präkonditionierung; 4: Taurin-IR: wie IR mit vorheriger 7-tägiger Behandlung mit taurinhaltigem Trinkwasser (3%). Bei anesthesierten und beatmeten Ratten wurde nach Kanülierung des Gallengangs in den IR-Gruppen eine 70%-ige Ischämie der Leber ohne Einschränkung des intestinalen venösen Abflusses mit einem Vaskularclip induziert. Die Galle wurde während der Ischämie- und Reperusionszeit asserviert. Die hepatozelluläre Schädigung wurde durch Messung der Leberenzyme AST, ALT und LDH bestimmt. Mittels Immunfluoreszenzmikroskopie wurden die membranständigen hepatobiliären Transporter Bsep, Mrp2, Ntcp, Oatp1, Oatp2 und Oatp4 in perivenösen und periportal Hepatozyten quantifiziert. Das Gallensalzprofil in Galle und Serum wurde mittels HPLC-MS analysiert. Die Effekte der Interventionsgruppen wurden

im Vergleich zur IR-Gruppe mittels t-Test bzw. Mann-Whitney-U-Test verglichen. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt.

Ergebnisse

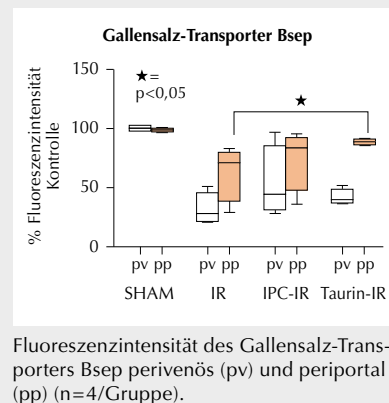
Eine Vorbehandlung mit Taurin und IPC reduzierte die Leberenzyme AST und LDH nach IR der Leber signifikant (Abb. 1). Eine warme

Abbildung 1



Ischämie der Leber führte zu einer deutlichen Reduktion des Gallenflusses während der Reperfusion. Weder durch IPC noch durch Taurin kam es zu signifikanten Veränderungen des Gallenflusses. IR führte zu einer perivenös betonten Reduktion des Membransignals des Gallensalztransporters Bsep. Durch Taurin wurde Bsep in periportal Hepatozyten rekonstituiert (Abb. 2), während IPC zu einer

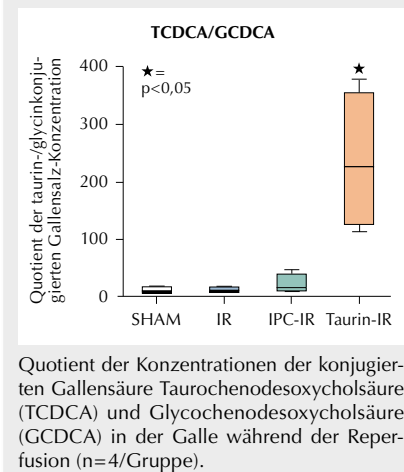
Abbildung 2



Erholung des Membransignals von Mrp2 in perivenösen Hepatozyten führte (Fluoreszenzintensität: IR: Median: 51%/Kontrolle (Q25%: 48%; Q75%: 63%); IPC-IR: Median: 82%/Kontrolle (Q25%: 72%; Q75%: 90%); $p < 0,05$). Die Lokalisation der hepatobiliären Transporter Ntcp, Oatp1, Oatp2 und Oatp4 wurde durch IPC und Taurin gegenüber IR nicht beeinflusst. Taurin reduzierte die gly-

cinkonjugierten Gallensäuren v.a. in der Galle signifikant. Dagegen waren die taurinkonjugierten Gallensäuren signifikant erhöht (exemplarisch dargestellt: Quotient TCDCA/GCDCA) (Abb. 3).

Abbildung 3



Interpretation

Taurin reduziert die hepatozelluläre Schädigung nach IR in gleichem Maße wie eine IPC. Darüber hinaus rekonstituiert Taurin die Expression von Bsep in periportal Hepatozyten. IPC verbessert dagegen die Expression von Mrp2 in perivenösen Hepatozyten. Taurin reduziert die biliäre Konzentration glycykonjugierter Gallensäuren zugunsten hydrophilerer taurinkonjugierter Gallensäuren. Taurin könnte somit nach IR durch eine Modulation der Gallensalzkonjugation eine antiapoptotische Wirkung entfalten [3]. In weiterführenden Untersuchungen soll geklärt werden, wie die Taurin-induzierte periportale Rekonstitution des Gallensalztransportes Bsep vermittelt wird und über welche Signalwege die Veränderung des Gallensalzprofils die Leberschädigung nach IR reduziert.

Dieses Projekt wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft gefördert (DFG KFO 217, TP6).

Literatur

- Warskulat U, Zhang F, Häussinger D: Taurine is an osmolyte in rat liver macrophages (Kupffer cells). *J Hepatol* 1997;26:1340-7
- Wettstein M, Häussinger D: Cytoprotection by the osmolytes betaine and taurine in ischemia-reoxygenation injury in the perfused rat liver. *Hepatology* 1997;26(6):1560-6
- Rust C, Karnitz LM, Paya CV, Moscat J, Simari RD, Gores GJ: The bile acid taurochenodeoxycholate activates a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent survival signaling cascade. *J Biol Chem* 2000;275:20210-6.

Erythropoetin reduziert die Sepsis-assoziierte myokardiale Dysfunktion bei der Maus durch eine Aktivierung des Akt-Signaltransduktionswegs über den β Common-Rezeptor

S. M. Coldewey^{1,2} · A. Khan¹ · M. Rogazzo³ · M. Collino³ · N. SA Patel¹ · A. Kapoor¹ · C. Thiemermann¹

1 The William Harvey Research Institute, Barts and The London School of Medicine & Dentistry, London, Queen Mary University of London, Großbritannien

2 Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin, Medizinische Hochschule Hannover, Deutschland

3 Department of Drug Science and Technology, University of Turin, Italien

Korrespondenz: s.m.coldewey@qmul.ac.uk

Fragestellung

Die myokardiale Dysfunktion tritt bei etwa 40% der Patienten mit schwerer Sepsis und im septischen Schock auf und trägt maßgeblich zur Morbidität und Mortalität der Sepsis bei. Ihre pathophysiologischen Mechanismen sind nicht vollständig verstanden, und die Entwicklung neuer Behandlungskonzepte ist dringend erforderlich. Es konnte gezeigt werden, dass das Hormon Erythropoetin (EPO) zusätzlich zu seinen bekannten hämatopoetischen Effekten auch organprotektive Eigenschaften besitzt. Gegenwärtig sind zwei EPO-Rezeptor Isoformen beschrieben, von denen das Homodimer EPO-R für den durch EPO vermittelten erythropoetischen Effekt verantwortlich ist, und ein Heterodimer aus EPO-R und dem β Common-Rezeptor (β cR, CD131) den gewebeprotectiven Effekt vermitteln soll [1]. Unter Verwendung eines Sepsis-Modells der Endotoxin-induzierten myokardialen Dysfunktion bei Wildtyp-Mäusen (WT) und solchen, denen CD131 fehlt (KO), untersuchen wir in dieser Studie (1) den Effekt von EPO in der Sepsis-assoziierten myokardialen Dysfunktion, (2) zugrunde liegende zelluläre Signaltransduktionswege und (3) die Bedeutung des β cR für die Gewebeprotektion durch EPO.

Material/Methodik

Es wurden 72 C57BL/6 WT-Mäuse und 77 CD131 KO-Mäuse in einem genetischen C57BL-6J Hintergrund verwendet, die eine Standard-Diät und Wasser ad libitum erhielten. Zum Zeitpunkt 0 (T=0 h) wurde entweder Lipopolysaccharid (LPS) intraperitoneal (9 mg/kg KG LPS in 5 ml/kg KG 0,9% NaCl) oder Vehikel (0,9% NaCl 5 ml/kg KG) appliziert, eine Stunde später (T=1 h) erhielten die Mäuse EPO (1000 IE rekombinantes humanes EPO in 10 ml/kg KG 0,9% NaCl) oder Vehikel (10 ml/kg KG 0,9% NaCl) subkutan (s.c.). Die Tiere wurden in sechs verschiedene Gruppen

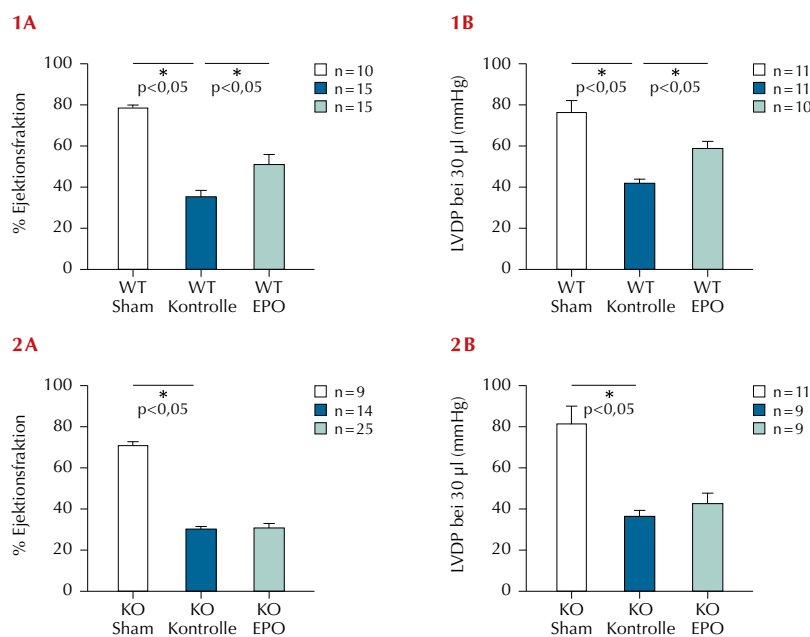
randomisiert: i) WT Sham: T=0 h Vehikel; ii) WT Kontrolle: T=0 h LPS, T=1 h Vehikel; iii) WT EPO: T=0 h LPS, T=1 h EPO; iv) KO Sham: T=0 h Vehikel; v) KO Kontrolle: T=0 h LPS, T=1 h Vehikel; vi) KO EPO: T=0 h LPS, T=1 h EPO. Die kardiale Funktion der Mäuse wurde 18 h nach Applikation von LPS bzw. Vehikel mittels Echokardiographie (zwei unabhängige Untersucher, verblindet) in vivo unter Inhalationsanästhesie mit 0,5-1,0% Isofluran bzw. 16-18 h nach LPS-Applikation ex vivo im isolierten Langendorff-perfundierten Herz untersucht, wie zuvor beschrieben [2]. Als Parameter für die kardiale Funktion wurden echokardiographisch die Ejektionsfraktion (EF), die Verkürzungsfraktion (FS) und die fraktionelle Flächenänderungsrate (FAC) bestimmt. Um die Echo-Ergebnisse unabhängig von Vor- und Nachlast bestätigen zu können, wurden im isolierten Langendorff-perfundierten Herz Veränderungen des isovolämischen linksventrikulären entwickelten Druckes (LVDP) als Antwort auf ein um jeweils 5 μ l ansteigendes Ballonvolumen im linken Ventrikel gemessen und Druck-Volumen-Kurven generiert. Die Expression ausgewählter Signaltransduktionsmoleküle wurde mittels

quantitativer Western-Blot-Analysen ermittelt, wie zuvor beschrieben [3]. Tierversuche erfolgten nach Genehmigung durch das lokale "Animal Use and Care Committee" in London.

Ergebnisse

In unserem Modell der Endotoxin-vermittelten experimentellen Sepsis konnten wir anhand einer signifikanten Reduktion der Parameter EF, FS und FAC in der Echokardiographie und einer signifikanten Reduktion des LVDP, bestimmt bei 30 μ l Ballonvolumen im isolierten Langendorff-perfundierten Herz, zeigen, dass sowohl WT- als auch KO-Mäuse 16-18 h nach der Applikation von LPS im Vergleich zu Sham-behandelten Mäusen eine signifikante myokardiale Dysfunktion entwickeln (Abb. 1, 2). Durch die Behandlung mit EPO konnte diese kardiale Dysfunktion bei den WT-Mäusen in allen genannten Parametern signifikant verbessert werden (Abb. 1). Bei den CD131 KO-Mäusen hatte EPO in allen genannten Parametern keinen signifikanten Effekt auf die Endotoxin-induzierte myokardiale Dysfunktion (Abb. 2). In der Western-Blot-Analyse des Herzens konnten wir keine signifikante Veränderung der Phos-

Abbildung 1 und 2



In WT-Mäusen verbessert die Behandlung mit EPO die Endotoxin-induzierte myokardiale Dysfunktion nach 18 h signifikant im Vergleich zu Kontrolltieren, wie hier beispielhaft an EF (1A) und LVDP bei 30 μ l Ballonvolumen (1B) dargestellt. In CD131 KO-Mäusen hat, bei gleichem Versuchsprotokoll, die Verabreichung von EPO weder in der EF (2A) noch dem LVDP (2B) einen signifikanten Einfluss auf die Endotoxin-induzierte myokardiale Dysfunktion. Werte sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts angegeben. Es erfolgte eine univariate Varianzanalyse, gefolgt vom Dunnett's Post Hoc Test. $p < 0,05$ wurde als signifikant erachtet. Die Anzahl der untersuchten Tiere wurde mit n angegeben.

phorylierung von Akt an Ser⁴⁷³ und GSK-3 β an Ser⁹ der WT-Kontroll- im Vergleich zur WT Sham-Gruppe feststellen. Interessanterweise zeigten Mäuseherzen der WT-EPO- im Vergleich zur WT-Kontroll-Gruppe einen signifikanten Anstieg der Phosphorylierung von Akt an Ser⁴⁷³ und GSK-3 β an Ser⁹. Das Nukleus/ Zytosol-Verhältnis der p65 Untereinheit von NF-kB in der WT-Kontroll-Gruppe stieg im Vergleich zu WT-Sham-Gruppe signifikant an. Die Behandlung der WT-Mäuse mit EPO erbrachte im Vergleich zur WT-Kontroll-Gruppe ein signifikant vermindertes Nukleus/Zytosol-Verhältnis von p65.

Interpretation

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die einmalige Injektion von EPO die myokardiale Dys-

funktion in der Endotoxin-vermittelten experimentellen Sepsis der WT-Maus sowohl in vivo (Echo) als auch in vitro, unabhängig von Vor- und Nachlast (Langendorff), signifikant verbessert. Diese Wirkung tritt nur bei Vorhandensein des β cR auf, was vermuten lässt, dass der kardioprotektive Effekt von EPO partiell oder vollständig über diesen Rezeptor vermittelt wird. Es gibt Evidenz dafür, dass die positiven Eigenschaften von EPO in der septischen Kardiomyopathie der WT-Maus sekundär über die Aktivierung des Akt – GSK-3 β – NF-kB Signaltransduktionswegs vermittelt werden, welcher Zellüberleben und Wachstum positiv reguliert.

SMC wurde durch ein Forschungsstipendium der DFG (CO 912/1-1) gefördert.

Literatur

1. Brines M, Cerami A: Erythropoietin-mediated tissue protection: reducing collateral damage from the primary injury response. *J Intern Med* 2008;264(5):405-32
2. Kapoor A, et al: Protective role of peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta in septic shock. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 182(12):1506-15
3. Collino M, et al: Modulation of the oxidative stress and inflammatory response by PPAR-gamma agonists in the hippocampus of rats exposed to cerebral ischemia/reperfusion. *Eur J Pharmacol* 2006;530(1-2):70-80.

Die unterschiedliche Freisetzung von GABA und Glyzin verändert deren Bedeutung für die spinale Hemmung durch Sevofluran in vitro

V.-S. Eckle · S. Hauser · B. Drexler ·
B. Antkowiak · C. Grasshoff

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

Korrespondenz:

Veit-Simon.Eckle@uni-tuebingen.de

Fragestellung

Volatile Anästhetika induzieren Immobilität durch eine Hemmung der Netzwerkaktivität im Vorderhorn des Rückenmarks [1]. Versuche an Ratten zeigten, dass diese Hemmung zu einem Teil über das glyzinerge Rezeptorsystem vermittelt wird, GABA_A-Rezeptoren jedoch nur eine untergeordnete Rolle spielen [2]. Andererseits moduliert Sevofluran spinale GABA_A- und Glyzin-Rezeptoren in vitro [3]. Es besteht somit eine Diskrepanz zwischen In-vivo- und In-vitro-Versuchen. In der vorliegenden Studie wurde daher getestet, ob Effekte von Sevofluran auf die präsynaptische Freisetzung von GABA die postsynaptischen modulierenden Wirkungen auf GABA_A-Rezeptoren mit zunehmender Konzentration aufheben, während dies für das glyzinerge System nicht zutrifft.

Methodik

Organotypische spinale Kulturen wurden aus embryonalem Gewebe (E 14-15) von C57BL6-

Mäusen gewonnen und für mindestens 10 Tage kultiviert. Die Organentnahme wurde dem zuständigen Regierungspräsidium angezeigt. Die Effekte von 0,5 MAC (0,175 mM) und 1,5 MAC (0,525 mM) Sevofluran auf spontane inhibitorische postsynaptische Ströme (IPSCs) im Vorderhorn des Rückenmarks wurde über Ganzzell-Patch-Clamp-Ableitungen quantifiziert. Pharmakologisch wurden die IPSCs isoliert (für GABAerge IPSCs: Strychnin (1 µM); für glyzinerge IPSCs: Bicucullin (100 µM)). Die auf die jeweiligen Kontrollgruppen normalisierten Ergebnisse sind als Mittelwerte ± S.E.M. dargestellt und mittels t-Test auf Signifikanz überprüft ($p < 0.05$ mit [*] markiert).

Ergebnisse

Die Abklingzeiten GABAerger und glyzinerger IPSCs wurden konzentrationsabhängig durch Sevofluran verlängert (Abb. 1A: GABA_A: 0,5 MAC: $144,3 \pm 11,1\%$, $n=8$; 1,5 MAC: $181,1 \pm 24\%$, $n=9$; Glyzin: 0,5 MAC: $134,5 \pm 10,1\%$, $n=6$; 1,5 MAC: $147,4 \pm 10,8\%$, $n=12$). Die Fläche der IPSCs (AUC) wurde als Maß des negativen Chlorid-Stroms berechnet (GABA_A: 0,5 MAC: $137,7 \pm 13,9\%$; 1,5 MAC: $134,9 \pm 15,7\%$; Glyzin: 0,5 MAC: $127,8 \pm 10,4\%$; 1,5 MAC: $159,6 \pm 16,4\%$). Die Frequenz der spontanen GABAergen IPSCs im ventralen Horn wurde durch die niedrige Sevofluran-Konzentration nicht beeinflusst, während 1,5 MAC Sevofluran zu einer signifikanten Frequenzabnahme führte (Abb. 1B: 0,5 MAC: $85,4 \pm 11,2\%$; 1,5 MAC: $23,6 \pm 5,6\%$). Bei den glyzinergeren IPSCs nahm die Frequenz bei 0,5 MAC leicht ab (Abb. 1B: $82,7 \pm 10,3\%$),

wohingegen bei 1,5 MAC Sevofluran die Frequenz konstant blieb (Abb. 1B: $101,6 \pm 21,5\%$). Aus der AUC und der Frequenz wurde für das GABAerge und das glyzinerge Rezeptorsystem die Sevofluran-vermittelte totale Hemmung ermittelt und normalisiert (GABA_A: 0,5 MAC: $1,32 \pm 0,2$; 1,5 MAC: $0,34 \pm 0,1$; Glyzin: 0,5 MAC: $1,1 \pm 0,2$; 1,5 MAC: $1,45 \pm 0,3$).

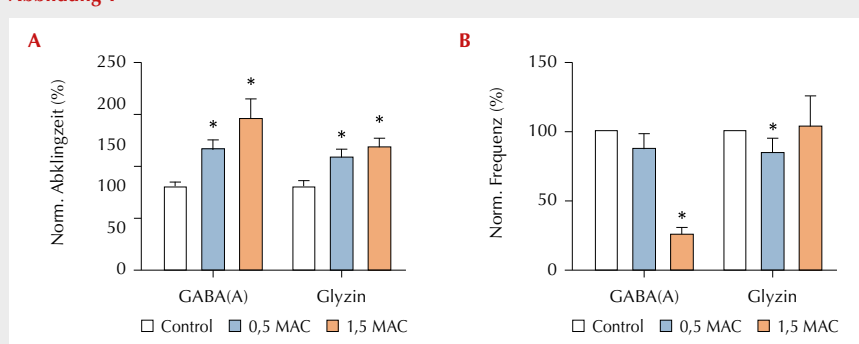
Interpretation

Sevofluran moduliert spinale GABA_A- und Glyzin-Rezeptoren. Die Bedeutung dieser Modulation für die Hemmung auf Netzwerkebene wird durch die präsynaptische Freisetzung des jeweiligen Neurotransmitters bestimmt. Die konzentrationsabhängig zunehmende Reduktion der präsynaptischen GABAergen Freisetzung durch Sevofluran reduziert dessen hemmenden Einfluss auf die Netzwerkaktivität im MAC-Bereich. Diese Beeinträchtigung wurde für Glyzin bei unbeeinflusster präsynaptischer Freisetzung nicht beobachtet. Somit lässt sich die eingeschränkte Bedeutung von GABA für die Hemmung der Netzwerkaktivität im Vorderhorn des Rückenmarks durch Effekte auf die präsynaptische Freisetzung erklären. Dieser Ansatz stärkt gleichzeitig die Bedeutung von Glyzin als molekulares Ziel für die Entwicklung neuer immobilisierender Substanzen. Medikamentös werden bei akut aufgetretenen Rückenschmerzen nicht-steroidale Anti-Rheumatika, Opioide oder Muskelrelaxantien eingesetzt. Selektive Glyzin-Rezeptor-Modulatoren könnten eine neue Medikamentenklasse mit muskelrelaxierender Eigenschaft sein, die im Gegensatz zu GABA_A-Rezeptor-Agonisten keine zentrale Sedierung bewirken und somit für den Patienten im Alltag mit keiner Leistungseinschränkung verbunden sind.

Literatur

1. Jinks S, Bravo M, Hayes S: Volatile anesthetic effects on midbrain-elicited locomotion suggest that the locomotor network in the ventral spinal cord is the primary site for immobility. *Anesthesiology* 2008;108:1016-24
2. Sonner J, Antognini J, Dutton R, Flood P, Gray A, Harris R, et al: Inhaled anesthetics and immobility: Mechanisms, mysteries, and minimum alveolar anesthetic concentration. *Anesth Analg* 2003;97:718-40
3. Grasshoff C, Antkowiak B: Propofol and sevoflurane depress spinal neurons in vitro via different molecular targets. *Anesthesiology* 2004;101:1167-76.

Abbildung 1



Wirkung von Sevofluran (0,5 und 1,5 MAC) auf die Abklingzeiten der GABAergen und glyzinergeren IPSCs (A) und auf die Frequenz GABAerger und glyzinerger IPSCs (B).

Tight Junction Interferenzpeptide zur Öffnung des Perineuriums – neue Modulatoren der regionalen Analgesie

D. Hackel^{1,3} · D. Zwanziger² · A. Böcker¹ ·
I. E. Blasig² · N. Roewer¹ · A. Brack¹ ·
H. L. Rittner¹

- 1 Klinik und Poliklinik für Anaesthesiologie, Universitätsklinikum Würzburg
- 2 Leibniz Institut für Molekulare Pharmakologie, Berlin-Buch
- 3 Klinik für Anästhesiologie, Charité - Campus Benjamin Franklin, Berlin

Korrespondenz:

hackel_d@klinik.uni-wuerzburg.de

Fragestellung

Postoperative Schmerztherapie durch Regionalanästhesieverfahren soll die Weiterleitung nozizeptiver Signale verhindern und Schmerz selektiv ausschalten. Gebräuchliche Lokalanästhetika wirken hingegen auf alle spannungsgesteuerten Natriumkanäle, wie sie auch auf sensorischen und motorischen Fasern zu finden sind. Das Ziel einer nozizeptionsspezifischen Blockade [1] könnte durch Anwendung von spezifischen Natriumkanalblockern (z.B. Nav1.7-1.9) [2] oder durch Opiode ($\text{[D-Ala}^2\text{, N-MePhe}^4\text{, Gly}^5\text{-ol]-enkephalin}$, DAMGO, MOR Agonist) erreicht werden, deren Rezeptoren selektiv auf Nozizeptoren exprimiert werden. Das Perineurium als Barriere verhindert hier die Penetration. Es besteht aus einer mehrlagigen Zellschicht mit Tight Junction Proteinen als Barrierebildner. In den Tight Junction sind u.a. das abdichtende Claudin-1 sowie Claudin-5 und Occludin exprimiert. Kürzlich konnten wir am Modell der Ratte zeigen, dass es nach perineuraler (N. ischiadicus) Applikation von hypertoner Kochsalzlösung zu einer verminderten Expression von Claudin-1 kommt, die Barriere des Perineurium geöffnet wird und sowohl Natriumkanalblocker als auch Opiode eine analgetische Wirkung hervorrufen, ohne die

Motorik zu beeinflussen. Ausgehend vom Clostridium perfringens Enterotoxin, das mit Claudin-5 interferiert, wurden Claudin-1 Peptide aus der ersten Extrazellulärregion entwickelt und ihre Wirkung in vitro und in vivo charakterisiert. In der vorliegenden Studie untersuchten wir: i) die Wirkung von Claudin-1-Interferenzpeptiden (C1C2) bei perineuraler Injektion auf die Wirksamkeit von perineural injizierten Blockern spannungsgesteuerter Natriumkanäle bzw. von hydrophilen Opioiden in Verhaltensexperimenten, ii) das Expressionsmuster von Tight Junction Proteinen (Claudin-1) im Perineurium des N. ischiadicus nach Gabe des Tight Junction Peptide Claudin-1.

Methodik

Das 29 Aminosäuren lange Peptid C1C2 wurde aus dem C-terminalen Teil des extrazellulären Loops von Claudin-1 der Ratte hergestellt und in vitro an Epithelialzellen (Caco-2 =Colorectal adenocarcinoma) getestet. Nach behördlicher Genehmigung wurden in vivo 24 h und 48 h nach perineural Behandlung mit C1C2 (Claudin-1-Peptid), C2C2 (Kontrollpeptid), Wistar-Ratten perineural mit dem Natriumkanalblockern Tetrodotoxin (TTX, 10 μM in 300 μl) (2) und dem Opioid DAMGO (30 μg in 300 μl) behandelt. Anschließend wurden mittels Pfootendrucktest (PPT) mechanische nozizeptive Schwellen gemessen. Die Claudin-1-Expression im Nervengewebe wurde mit konfokaler Lasermikroskopie und Western Blot analysiert.

Ergebnisse

In vitro führt C1C2 zu einer Öffnung der Barriere von Caco-2 Zellen und erhöht den parazellulären Fluss von Ionen und größeren, sonst impermeablen Molekülen. Dies geht einher mit einer verminderten Expression von Claudin-1. In vivo ermöglicht die perineurale Injektion des Claudin-1-Peptids C1C2, nicht aber eines Kontrollpeptids am N. ischiadicus von Wistar-Ratten einen Anstieg der mechanischen nozizeptiven Schwellen durch TTX

und DAMGO 48 h und 72 h nach perineuraler Peptidgabe. Die antinozizeptive Wirkung von C1C2 durch DAMGO hält bis zu 72 h an (Abb. A; Mittelwerte \pm SEM, * $p < 0.05$, ANOVA, Student Newman Keuls, $n = 6$ Ratten/Gruppe). Behandlung mit C1C2 reduziert die Claudin-1 Immunoreaktivität im Perineurium (Abb. B) sowie den Claudin-1-Gehalt in der Membranfraktion (Abb. C).

Interpretation

Für die Entwicklung einer nozizeptionsspezifischen Analgesie in der Regionalanästhesie ermöglichen Claudin-1-Interferenzpeptide eine spezifische, reversible und steuerbare Öffnung des Perineuriums. Darüber hinaus könnten derartige „Barriere-öffnenden“ Peptide zur verbesserten Wirkung von analgetischen Substanzen mit einem günstigen Risikoprofil (z.B. Opiode) für peri- und postoperative Schmerzbehandlung in Betracht gezogen werden.

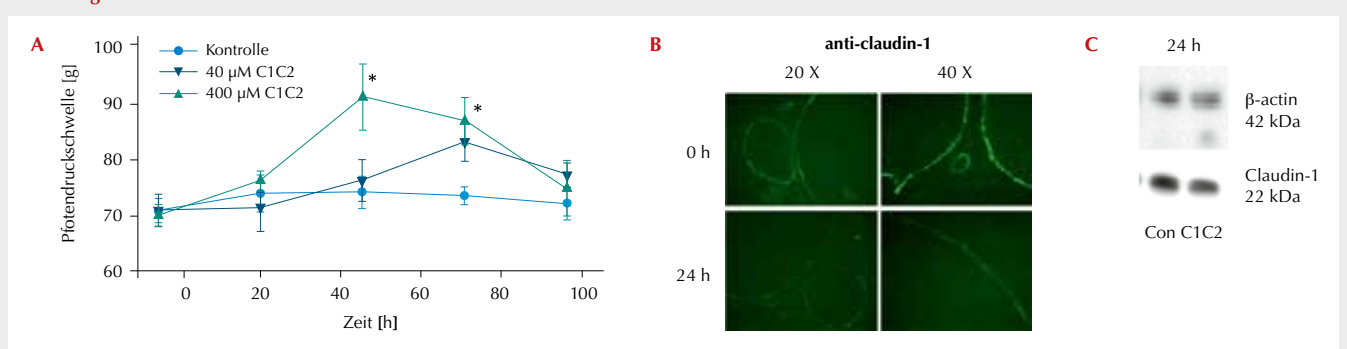
Gefördert durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (FOR 721/2 TP8) und die Else-Kröner-Fresenius Stiftung.

Patent No 11178451.8EM11-FMP 3 (Forschungsverband), 08-00085 (Ascension), B71119 (Bay Pat). Tierprotokoll: Regierung von Unterfranken 55.2-2531.0-40/10.

Literatur

1. Binstok AM, Bean BP, Woolf CJ: Inhibition of nociceptors by TRPV1-mediated entry of impermeant sodium channel blockers. *Nature* 2007;449(7162):607-610
2. Schmalhofer WA, Calhoun J, Burrows R, Bailey T, Kohler MG, Weinglass AB, Kaczorowski GJ, Garcia ML, Koltzenburg M, Priest BT: ProTx-II, a selective inhibitor of Nav1.7 sodium channels, blocks action potential propagation in nociceptors. *Mol Pharmacol* 2008;74(5):1476-1484
3. Rittner H, Hackel D, Yamdeu RS, Mousa SA, Schaefer M, Stein C, Brack A: Antinociception by neutrophil-derived opioid peptides in noninflamed tissue - role of hypertonicity and the perineurium. *Brain Behav Immun* 2009;23(4):548-557.

Abbildung 1



Glukokortikoide und Endocannabinoide interagieren bei der Konsolidierung des traumatischen Gedächtnisses: Ein neuropharmakologisches Modell an der Ratte zur hypermnestischen Wirkung von Propofol

D. Hauer¹ · P. Campolongo² · B. Roozendaal³ · G. Schelling¹

¹ Klinik für Anaesthesiologie, Ludwig-Maximilians-Universität München

² Department of Pharmacology, La Sapienza University of Rome, Italien

³ Department of Neuroscience, University of Groningen, Niederlande

Korrespondenz:

Daniela.Hauer@med.uni-muenchen.de

Fragestellung

Persistierende traumatische Erinnerungen an aversive und bedrohliche Erfahrungen aus der Zeit einer Intensivbehandlung oder nach intraoperativer Wachheit können zur Entwicklung schwerer, stressassoziierter Erkrankungen wie Depression, Angststörungen oder zu einer Post-traumatischen Belastungsstörung führen [1]. Traumatische Erinnerungen werden im emotionalen Gedächtnis gespeichert und können lebenslang persistieren. In der Neuromatrix des traumatischen Gedächtnisses spielt der basolaterale Komplex der Amygdala (BLA) eine Schlüsselrolle. Dieses Hirnareal wird während der frühen Gedächtnisbildung (Konsolidierungsphase) für emotional relevante Informationen über einen glucocorticoid- und einen endocannabinoid-vermittelten Mechanismus aktiviert [2]. In der vorliegenden Studie überprüfen wir an einem tierexperimentellen Modell des aversiven Lernens die Hypothesen, dass diese Aktivierung (a) über schnelle, membrangebundene Glukokortikoid-Rezeptoren (GR) und deren Interaktion mit dem Endocannabinoidsystem (ECS) vermittelt wird und dass (b) diese Interaktion zu einer Gedächtniskonsolidierung unter Stress führt.

Methodik

Alle Versuche waren durch die örtlich zuständigen Behörden genehmigt und wurden an männlichen Sprague-Dawley-Ratten unter Anwendung des sog. Inhibitory-Avoidance (I/A)-Modells des aversiven Lernens durchgeführt. Dabei erhält das Versuchstier während der Lernphase beim vollständigen Betreten des abgedunkelten Anteils des Versuchsaufbaus einen kurzen Stromstoß. 48 h später erfolgt ein Reexpositionversuch. Die Zeit, die die Ratte dabei abwartet, bis sie den abgedunkelten Teil des Versuchsaufbaus wieder betritt, gilt als Maß für die Intensität des traumatischen Gedächtnisses und wird als

„retention latency“ (RL) bezeichnet. Die Versuche wurden mit Ratten durchgeführt, denen 7 Tage vorher stereotaktisch bilateral Kanülen in den BLA implantiert wurden; dies ermöglichte die direkte Verabreichung von Pharmaka über Präzisionspumpen in dieses Kerngebiet. Die statistische Analyse erfolgte mittels two-way ANOVA und Fisher's LSD post-hoc test.

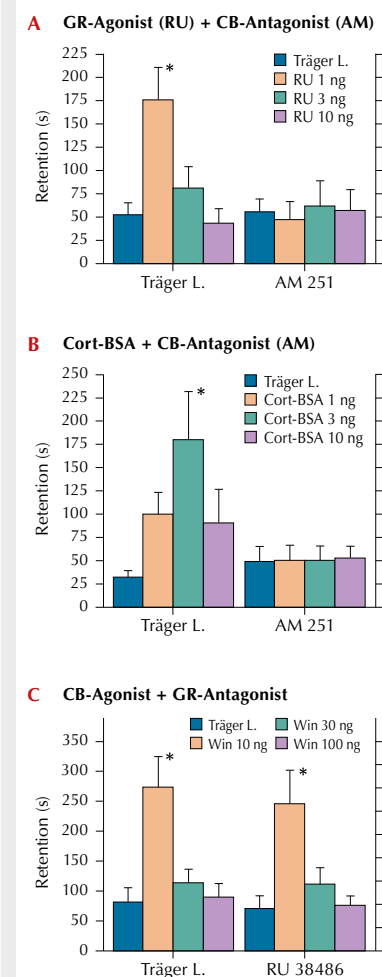
Ergebnisse

Die Tiere erhielten zunächst den Glukokortikoid-Rezeptor (GR)-Agonisten RU28362 (RU) (1, 3, 10 ng/0,2 µl, je n=10-13) oder das membran-impermeable Kortikosteron-Bovine Serum-Albumin (Cort-BSA) (1, 3, 10 ng/0,2 µl, je n=12-13), jeweils entweder alleine oder in Kombination mit dem Cannabinoidrezeptor 1 (CB1)-Blocker AM251 (0,14 ng/0,2 µl, je n=11-13). Zwischen der RU-, der Cort-BSA Dosis und der RL fand sich eine umgekehrt U-förmige Beziehung (Abb. A-C). Sowohl RU (Abb. A, RU 1 ng vs. Träger, *p<0.048) als auch Cort-BSA (Abb. B, Cort-BSA 3 ng vs. Träger, *p=0.008) verlängerten dabei die RL signifikant (=Konsolidierung des traumatischen Gedächtnisses). Dieser Effekt wurde durch die gleichzeitige Gabe von AM251 verhindert (Abb. A, RU 1 ng vs. RU 1 ng + AM251, *p=0.03 und Abb. B, Cort-BSA 3 ng vs. Cort-BSA 3 ng + AM251, *p=0.03). Dies weist auf einen membranständigen GR hin, dessen Signalwirkung einer Co-Aktivierung des ECS bedarf. In einem Folgeexperiment wurde der CB1-Agonist WIN55,212-2 (WIN) (10, 30, 100 ng/0,2 µl) alleine (je n=10-14) oder zusammen mit dem GR-Antagonisten RU38486 (1 ng/0,2 µl, je n=12) in den BLA verabreicht. Dabei führte WIN zu einer signifikanten Verlängerung der RL, was auch durch die gleichzeitige Gabe von RU38486 nicht verhindert werden konnte (Abb. C, *p<0.001, WIN 10 ng vs. Träger und WIN 10 ng + RU38486 vs. Träger).

Interpretation

Die Untersuchung zeigte eine bisher unbekannte Wechselwirkung eines membranständigen GR mit dem ECS mit der Folge einer membranständig vermittelten Konsolidierung des traumatischen Gedächtnisses. Da Propofol über eine Hemmung des Metabolismus des Endocannabinoids Anandamide einen zu WIN vergleichbaren Effekt auf das ECS aufweist, könnte dieser Mechanismus die paradoxe hypermnestische Wirkung von Propofol unter Stress erklären, wie sie unlängst von uns im gleichen I/A-Modell gezeigt wurde [3]. Diese tierexperimentell gefundenen Zusammenhänge sind von großer Wichtigkeit für die klinische Anwendung von Propofol und sollten im nächsten Schritt am Menschen untersucht werden.

Abbildung 1



Studiensponsor: Else-Kröner-Fresenius Stiftung, Projektnummer P50/06//A40/06.

Literatur

1. Kapfhammer HP, Rothenhauser HB, Krauseneck T, Stoll C, Schelling G: Posttraumatic stress disorder and health-related quality of life in long-term survivors of acute respiratory distress syndrome. *Am J Psychiatry* 2004;161:45-52
2. Campolongo P, Roozendaal B, Trezza V, Hauer D, Schelling G, McGaugh JL, Cuomo V: Endocannabinoids in the rat basolateral amygdala enhance memory consolidation and enable glucocorticoid modulation of memory. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:4888-4893
3. Hauer D, Ratano P, Morena M, Scaccianoce S, Briegel I, Palmery M, Cuomo V, Roozendaal B, Schelling G, Campolongo P: Propofol Enhances Memory Formation via an Interaction with the Endocannabinoid System. *Anesthesiology* 2011;114:1380-1388.

Die Eliminierung von P-Rex1 reduziert die Rekrutierung von Neutrophilen in einem murinen Modell der akuten pulmonalen Inflammation

J. M. Herter · J. Rossaint · H. Van Aken · A. Zarbock

Klinik für Anästhesiologie, operative Intensivmedizin und Schmerztherapie, Universitätsklinikum Münster

Korrespondenz: herter@anit.uni-muenster.de

Fragestellung

Trotz aller Fortschritte bei der Einführung neuer Beatmungsstrategien geht das akute Lungenversagen (ALI) noch immer mit einer hohen Letalität einher [1]. Die β_2 -Integrin-abhängige Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten (PMN) in die Lunge, induziert durch infektiöse oder nicht-infektiöse Ursachen, konnte als ein wesentlicher Faktor in der Pathogenese des ALI identifiziert werden. Vor dem Hintergrund der pulmonalen Entzündung bei der Ausbildung des ALI, z.B. im Rahmen einer direkt induzierten Schädigung der Lunge, erscheinen intrazelluläre Signaltransduktionsmoleküle in neutrophilen Granulozyten von außerordentlichem Interesse [2]. Es ist bekannt, dass verschiedene GTPasen für die Aktivierung von β_2 -Integrinen auf neutrophilen Granulozyten notwendig sind [3]. P-Rex1 (Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphat-dependent Rac exchanger) ist ein Aktivator der Rac GTPasen und wird durch Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP3), dem Produkt der aktiven Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K), aktiviert. Um die Rolle von P-Rex1 für die Pathogenese der pulmonalen Entzündung zu untersuchen, wurden P-Rex1-defiziente Mäuse in einem Modell der akuten, Lipopolysaccharid (LPS)-induzierten pulmonalen Inflammation untersucht. Des Weiteren wurde die Bedeutung von P-Rex1 für die einzelnen Schritte der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten mittels Intravitalmikroskopie in vivo und Transmigrations- und Migrationsassays sowie biochemischen Experimenten ermittelt.

Methodik

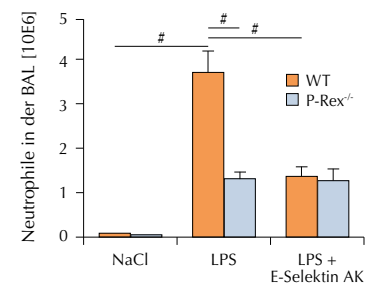
Die Tierschutzkommission genehmigte alle beschriebenen Tierversuche. 24 Stunden nach der intratrachealen LPS-Applikation wurde mittels Durchflusszytometrie die Anzahl der neutrophilen Granulozyten in den verschiedenen Kompartimenten der Lunge

(intravaskuläres, interstitielles und alveoläres Kompartiment) bestimmt. Zur Untersuchung der Rollgeschwindigkeit, Adhäsion und Transmigration von Leukozyten wurden intravitalmikroskopische Untersuchungen am M. cremaster von P-Rex1-defizienten Mäusen sowie Kontrolltieren durchgeführt. Bei einigen Mäusen wurde 2 Stunden vor der Messung intraskrotal Tumornekrosefaktor- α , Pertussis-Toxin oder beides injiziert. Zur Untersuchung des Chemokin-induzierten Arrests erhielten die Tiere 500 ng C-X-C Motif Ligand 1 intraarteriell nach Kanülierung der A. carotis. Zur Quantifizierung der Transmigration in vitro wurden isolierte neutrophile Granulozyten in einem mit kultivierten Endothelzellen beschichtetem Transwellssystem untersucht beziehungsweise zur Beurteilung der Migration in eine Kollagenmatrix eingebettet. Des Weiteren wurde die Aktivierung von Rac-1 nach der Stimulation mit E-Selektin mittels GTPase-Pulldown im Western Blot untersucht. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ANOVA und anschließenden Student-Newmann-Keul-Tests (Daten als Mittelwert \pm SEM, n=4-6).

Ergebnisse

P-Rex1-defiziente Mäuse hatten im Vergleich zu Kontrollmäusen eine signifikant verminderte Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in das alveoläre Kompartiment 24 h nach der intratrachealen LPS-Injektion ($1,3 \times 10^6 \pm 0,15$ vs. $3,7 \times 10^6 \pm 0,5$, $p < 0,05$; s. Abb. 1). Die durchfluss-zytometrische Analyse zeigte, dass P-Rex1-defiziente neutrophile Granulozyten das intravaskuläre Kompartiment nicht verlassen konnten. Hinsichtlich der vaskulären Permeabilität gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen Kontrollmäusen und P-Rex1-defizienten Mäusen ($0,29 \pm 0,04$ vs. $0,23 \pm 0,04$ mg/ml). In intravital-mikroskopischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass P-Rex1 $^{-/-}$ Leukozyten eine erhöhte Rollgeschwindigkeit aufweisen ($6,33 \pm 0,08$ vs. $4,01 \pm 0,05$ $\mu\text{m}/\text{sek}$) und die Anzahl der Selektin-vermittelten intravasal adhärenenten (564 ± 132 vs. 1015 ± 82 Zellen/ mm^2 , $p < 0,05$) sowie transmigrierten Leukozyten ($5,8 \pm 0,4$ vs. $13,0 \pm 0,9$ Zellen/ $15000 \mu\text{m}^2$, $p < 0,05$) bei P-Rex1 $^{-/-}$ Mäusen reduziert ist. Im Gegensatz dazu zeigte sich kein Unterschied zwischen Kontroll- und P-Rex1 $^{-/-}$ -Mäusen bei dem Chemokin-induzierten Arrest in vivo (426 ± 24 vs. 452 ± 27 Zellen/ mm^2) und Transmigration ($31,3\%$ vs. $31,6\%$) und Migration in vitro

Abbildung 1



Nach intratrachealer Applikation von LPS ist die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in das alveoläre Kompartiment in P-Rex1-defizienten Mäusen vermindert. Durch intravenöse Gabe eines blockierenden E-Selektin Antikörpers lässt sich in Kontrollmäusen die Infiltration auf vergleichbare Werte senken. Die Applikation des blockierenden E-Selektin Antikörpers in P-Rex1-defizienten Mäusen führt zu keiner weiteren Abnahme der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in das alveoläre Kompartiment. # $p < 0,05$.

($386 \pm 53 \mu\text{m}$ vs. $347 \pm 47 \mu\text{m}$; $25,7 \pm 3,5$ vs. $23,2 \pm 3,1 \mu\text{m}/\text{min}$). Nach Stimulation der neutrophilen Granulozyten mit E-Selektin konnte eine Aktivierung von Rac-1 mittels Western Blot nachgewiesen werden.

Interpretation

Diese Daten zeigen, dass P-Rex1 nur an einzelnen Schritten der Leukozytenrekrutierung (Selektin-vermittelte β_2 -Integrin-Aktivierung und Leukozytenrekrutierung) beteiligt ist. Die Kenntnis des molekularen Mechanismus der Leukozytenrekrutierung in der akuten pulmonalen Inflammation ist Voraussetzung für die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze beim akuten Lungenversagen.

Literatur

1. Rubenfeld GD, Caldwell E, Peabody E, Weaver J, Martin DP, Neff M, et al: Incidence and outcomes of acute lung injury. N Engl J Med 2005;353(16):1685-1693
2. Ware LB, Matthay MA: The acute respiratory distress syndrome. N Engl J Med 2000;342(18):1334-1349
3. Zarbock A, Singbartl K, Ley K: Complete reversal of acid-induced acute lung injury by blocking of platelet-neutrophil aggregation. J Clin Invest 2006;116(12):3211-3219.

MitoNEET schützt Kardiomyoblasten vor Hypoxie-vermitteltem oxidativem Stress und wird durch Hemmung der Glutathionreduktase-Aktivität induziert

C. Herzog¹ · A. Lorenz¹ · A. Chowdhury¹ · R. Lichtinghagen² · F. Echtermeyer¹ · G. Theilmeier¹

1 Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin, Medizinische Hochschule Hannover

2 Institut für Klinische Chemie, Medizinische Hochschule Hannover

Korrespondenz:

herzog.christine@mh-hannover.de

Fragestellung

Bei der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen ist oxidativer Stress für einen beträchtlichen Anteil des myokardialen Schadens verantwortlich. Eine Erhöhung der anti-oxidativen Kapazität zur Reduktion des oxidativen Stresses könnte demnach kardioprotektiv wirken. Ein interessantes Protein in diesem Zusammenhang ist das 2Fe-2S-Protein mitoNEET, das an der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert ist und durch seine im Cytosol befindlichen Fe-S-Cluster zum Elektronentransfer fähig ist. Der genetische Verlust von mitoNEET führt in isolierten kardialen Mitochondrien zu einer reduzierten oxidativen Kapazität [1]. In dieser Studie untersuchen wir die potentielle anti-oxidative Wirkung von mitoNEET in Kardiomyoblasten im In-vitro-Modell der Hypoxie mit Reoxygenierung (H/R) und gehen der Frage nach, ob es wechselseitige Beziehungen zwischen mitoNEET und anderen anti-oxidativen Systemen, wie dem Glutathion-Redox-System gibt.

Methodik

HL-1 Zellen (murine Kardiomyoblasten-Zelllinie) wurden mit nonsense (ns)-mitoNEET- und Glutathionreduktase (GSR)-siRNA transfiziert sowie mit 2-AAPA [2] (10 µM), einem

spezifischen Inhibitor der GSR, dem endogenen Superoxid-Fänger Tiron (10 mM) und reduziertem Glutathion-Monoethyl-Ester (GSH-MEE; 2 mM) inkubiert, um den Effekt auf Apoptose und Nekrose nach 3-stündiger Hypoxie (0.8% Sauerstoff) und 1-stündiger Reoxygenierung zu untersuchen. Zur Quantifizierung der Apoptose wurde aktive Caspase-3 (cleaved Caspase-3, Cell Signaling, Lieferant: NEB, Frankfurt a. M.) densitometrisch im Western Blot gemessen. Nekrose wurde über Messung von LDH (LDH IFCC kit, Modular P, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) im Zellkulturüberstand ermittelt. Die Quantifizierung von mitoNEET- und GSR-mRNA und -Protein erfolgte durch quantitative Polymerase-Kettenreaktion und densitometrische Auswertung im Western Blot (mitoNEET-Antikörper, SY1094/98, Eurogentec, Köln, Deutschland; GSR-Antikörper, ABIN233969, Antibodies Online, Aachen, Deutschland). Bei der statistischen Analyse wurde aufgrund der signifikant unterschiedlichen Varianzen bei normaler Verteilung der Daten der Mann-Whitney-U-Test gewählt. Die Daten sind als Mittelwert ± SEM angegeben. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0.05$ festgelegt.

Ergebnisse

Eine Reduktion der mitoNEET-Expression mittels siRNA um 75% ($n=12$, $p < 0.01$) führt in HL-1-Zellen nach H/R zu einer um 30% verstärkten Aktivierung der Caspase-3 im Vergleich zu hypoxischen, mit ns-siRNA transfizierten Zellen ($n=5$, $p < 0.05$), während keine Unterschiede im LDH-Gehalt in den Überständen gemessen werden konnten ($n=10$, $p=ns$). Zugabe des Antioxidationsmittels Tiron (ns: $60 \pm 16\%$, mitoNEET-siRNA: $53 \pm 11\%$ bezogen auf H/R-Kontrolle, $n=5$, $p < 0.05$) und reduziertem GSH (ns: $15 \pm 7\%$, mitoNEET-siRNA: $22 \pm 1\%$ bezogen auf H/R-Kontrolle, $n=6$, $p < 0.05$) reduziert die Menge an aktiver Caspase-3 in mitoNEET-siRNA behandelten Zellen auf das gleiche Niveau

wie in ns-siRNA behandelten Zellen. Die Herunterregulation von GSR mittels siRNA führt nach H/R zu einer Reduktion der GSR-Aktivität auf 47% ($n=13$, $p < 0.05$) und zu einer zweifach erhöhten Menge an aktiver Caspase-3 ($n=12$, $p < 0.01$). Die Menge an mitoNEET-RNA und -Protein wird nicht beeinflusst. Im Gegensatz dazu führt die Gabe des GSR-Inhibitors 2-AAPA nach H/R zu einer effektiveren Reduktion der GSR-Aktivität auf 20% ($n=5$, $p < 0.01$) und zu einer deutlichen Reduktion der aktiven Caspase-3 in ns- und mitoNEET-siRNA-behandelten HL-1 Zellen (ns: $23 \pm 6.8\%$; mitoNEET-siRNA: $25 \pm 5.1\%$ bezogen auf H/R-Kontrolle, $n=5$, $p < 0.01$). Die reduzierte Apoptoserate nach H/R wird von einer 4-fach erhöhten Menge an mitoNEET auf Protein-Ebene ($n=6$, $p < 0.05$) begleitet. Dieser Effekt kann durch Zugabe von reduziertem GSH wieder aufgehoben werden ($n=5$, $p < 0.05$).

Interpretation

MitoNEET schützt Kardiomyoblasten vor Apoptose, die durch oxidativen Stress verursacht wird. Die Blockade der GSR durch 2-AAPA führt zu einer erhöhten Expression von mitoNEET und einer damit verbundenen reduzierten Apoptoserate. Dieser Effekt kann durch Zugabe von reduziertem Glutathion, dem Endprodukt der GSR, wieder aufgehoben werden. Demnach kann eine fehlende GSR-Aktivität durch Induktion von mitoNEET kompensiert werden, wobei dies umgekehrt aber nicht gilt. MitoNEET stellt ein antioxidatives System dar, das möglicherweise aufgrund seiner mitochondrialen Lokalisation eine von anderen Redoxsystemen partiell unabhängige Funktion aufweist.

Literatur

1. Wiley, et al: Proc Natl Acad Sci 2007;104(13): 5318-23
2. Seefeldt, et al: J Biol Chem 2009;284(5): 2729-37.

Beeinflussung humaner T-Zell-Funktionen durch ein miR-641 reguliertes Netzwerk im PI3K/AKT-Signalweg

J. Heyn · C. Hinske · S. Kreth

Klinik für Anaesthesiologie, Universität München

Korrespondenz:

Jens.Heyn@med.uni-muenchen.de

Fragestellung

T-Zellen spielen eine zentrale Rolle in der adaptiven Immunantwort und nehmen eine Schlüsselfunktion bei der Entstehung inflammatorischer Krankheitsbilder, wie z.B. Sepsis oder ARDS, ein. Die Regulation der T-Zellfunktionen basiert auf einem bislang nur wenig bekannten komplexen Netzwerk von Signalkaskaden, wobei der PI3K/AKT-Pathway einen Knotenpunkt für die biologischen Antworten und die Differenzierung von T-Zellen darstellt [1]. Da das Gen der zentralen AKT2-Kinase, die intronische miR-641 beherbergt, haben wir die Hypothese formuliert, dass miR-641 regulierend in das Interaktom des Wirtsgens (Hosts) AKT2 eingreift und damit wesentlich zur Kontrolle des Signalwegs beiträgt [2]. Das vorliegende Forschungsvorhaben befasst sich mit der Charakterisierung dieses AKT2/PI3K-Netzwerks und seiner Funktion bei humanen T-Zellen.

Methodik

Die Interaktionspartner des AKT2/PI3K-Netzwerkes wurden mithilfe bio-informatischer Analysen identifiziert [2]. Die 3'-untranslatierten Bereiche (3'-UTR) dieser Gene wurden jeweils mittels PCR amplifiziert und in einen Luciferase-Reporter-Vektor kloniert. Diese Vektoren wurden jeweils zusammen mit pre-miR-641 (bzw. Kontroll-pre-miR) mittels Elektroporation in HEK293-Zellen co-transfiziert. Die Luciferase-Aktivität der verschiedenen Transfektionsansätze wurde mittels Luminometrie quantifiziert (n=9). Die mRNA Expression der Zielgene wurde nach Transfektion von pre-miR-641 (bzw. Kontroll-miR) in Jurkat-T-Zellen mittels real-time PCR bestimmt (n=9). Zur Untersuchung des Einflusses des miRNA-641-kontrollierten Netzwerkes auf die T-Zellfunktionen wurden durch Negativselektion isolierte T-Zellen von gesunden Probanden (n=3, Blutentnahme durch Ethikkommission genehmigt) mit pre-miR-641 (bzw. Kontroll-miR) oder spezifischer siRNA (bzw. Kontroll-siRNA) transfiziert und in vitro stimuliert (24 h, anti-CD3/CD28). Nach Präparation von RNA wurde die Expression von T-Zell-Markern mittels real-time PCR bestimmt (n=3). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test und Bonferroni-Korrektur.

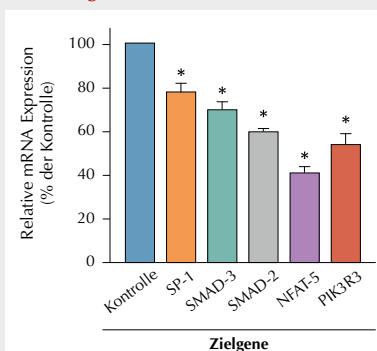
Ergebnisse

Durch bioinformatische Analysen identifizierten wir vier Transkriptionsfaktoren als mögliche Zielgene von miR-641: SP1, SMAD2, SMAD3 als bekannte Regulatoren des PIK3R3 (das AKT2 reguliert) sowie NFAT5, für das bislang keine Funktion für die T-Zellantworten beschrieben wurde. Durch Gen-Silencing-Experimente konnte gezeigt werden, dass NFAT5 ebenfalls ein wichtiger Regulator im PI3K-Netzwerk ist: Transfektion von siRNA gegen NFAT5 führte zu einer signifikanten Reduktion der PIK3R3-mRNA-Expression (0.45 ± 0.1 ; $p < 0.01$). Jurkat-T-Zellen zeigten nach Transfektion von pre-miR-641 eine deutlich verminderte Expression der mRNA-Expression von PIK3R3 (0.57 ± 0.05 ; $p < 0.05$), sowie aller am Netzwerk beteiligten Gene (SP1: 0.78 ± 0.04 , SMAD2: 0.61 ± 0.02 , SMAD3: 0.69 ± 0.04 , NFAT5: 0.41 ± 0.03 ; $p < 0.05$, Abb. 1). Im Luciferase-Assay konnte nachgewiesen werden, dass SMAD2, SMAD3 und NFAT5 direkt durch miR-641 reguliert werden; der stark hemmende Effekt von miR-641 auf PIK3R3 kommt somit indirekt zustande (Abb. 2). In stimulierten primären humanen T-Zellen führte die Transfektion mit miR-641 zu einer verstärkten Expression von Foxp3 und zu einer verminderten Expression von IL-2 (1.42 ± 0.07 und 0.44 ± 0.06 ; $p < 0.05$) gegenüber einer Kontrolle.

Interpretation

Unsere Experimente belegen eine neue Funktion für NFAT5 und beschreiben ein bislang nicht bekanntes, miR-641-reguliertes Netzwerk in der PI3K/AKT-Signalkaskade: Durch die intronisch im AKT2-Gen gelegene miR-641 werden mehrere mit dem Host-Pathway

Abbildung 1



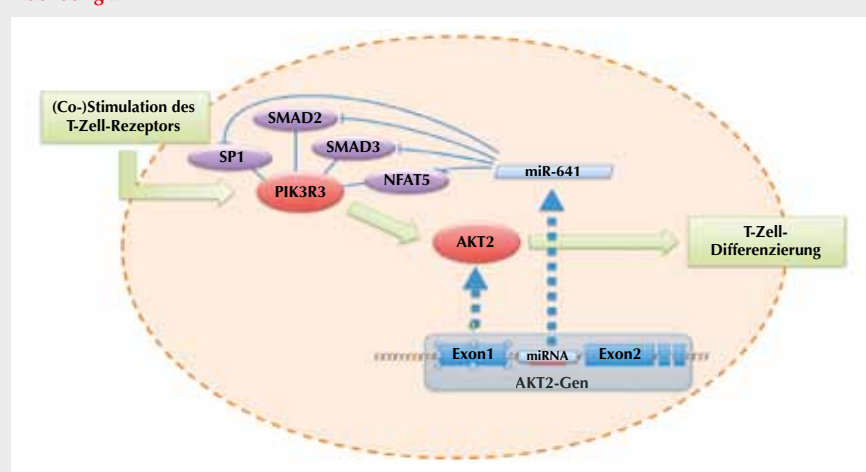
mRNA-Expression der Zielgene nach Transfektion mit pre-miR 641 (Mittelwerte \pm SD, * $p < 0.05$).

interagierende Transkriptionsfaktoren supprimiert, was dann im Sinne eines negativen Feedbacks auf den zentralen PI3K/AKT-Signalweg wirkt. Die Hemmung des Netzwerkes ist von großer Relevanz für die Funktion humaner T-Zellen: Über Transkriptionssteigerung von Foxp3 wird die Differenzierung regulatorischer T-Zellen beeinflusst. Die Nutzung von Netzwerkeffekten birgt ein großes Potenzial für die Entwicklung effektiver therapeutischer Ansätze.

Literatur

1. Xue L, et al: The role of the PI3K-AKT kinase pathway in T cell development beyond the β checkpoint. Eur J Immunol 2008;3200-07
2. Hinske LC, et al: A potential role for intragenic miRNAs on their hosts' interactome. BMC Genomics 2010;11:533.

Abbildung 2



Interaktionspartner des PIK3R3-Netzwerkes, die durch miR-641 reguliert werden.

Statine stabilisieren in vitro die endotheliale Barriere durch Inhibition der Angiopoietin-2-Exozytose

T. Hilbert¹ · M. Aslam² · S. Frede¹ · J. Poth¹ · G. Baumgarten¹ · P. Knüferrmann¹

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

2 Physiologisches Institut, Justus-Liebig-Universität Giessen

Korrespondenz: thilbert@uni-bonn.de

Fragestellung

Bei der Entstehung der septischen endothelialen Dysfunktion kommt dem Angiopoietin-TIE-Rezeptorsystem eine Schlüsselrolle zu [1]. Endothelzellen speichern das Peptid Angiopoietin-2 (Ang-2) in zytoplasmatischen Vesikeln, den Weibel-Palade-Körperchen (WPB), und setzen es auf physikalische (Hypoxie, Trauma) oder chemische Stimuli (Histamin, Thrombin, ATP) hin exozytotisch frei. Nach Bindung an den endothelialen Rezeptor TIE2 kommt es u.a. durch Lockerung interzellulärer Kontakte zu konsekutiv gesteigerter Permeabilität [2]. Statine wirken der Ausbildung einer endothelialen Dysfunktion entgegen, so mindern sie z.B. die Ausprägung der Gefäßleckage im akuten Lungenschaden [3]. In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir, ob Statine die Ang-2-Sekretion durch Endothelzellen und somit die Entwicklung endothelialer Hyperpermeabilität in vitro beeinflussen können.

Methodik

Humane Endothelzellen (HUVEC) wurden auf permeablen Membranen bis zur Ausbildung einer konfluenten Zellschicht kultiviert. Hyperpermeabilität für Trypanblau-markiertes Albumin wurde durch Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) induziert und die Veränderung nach Vorbehandlung mit Simvastatin [5 µM] untersucht. Des Weiteren wurde der Effekt von Statinen [0.1-10 µM] auf den intrazellulären Ang-2-Gehalt bzw. auf die Sekretion von Ang-2 durch HUVEC nach PMA-Stimulation im Zelllysatz bzw. -überstand mittels ELISA gemessen. Zusätzlich wurden Intermediate der Mevalonatsynthese bzw. NO-Antagonisten eingesetzt. Die zelluläre Stickstoffmonoxid-Synthese wurde mittels Griess-Reaktion untersucht. Die Exozytose der WPB selbst wurde fluoreszenzmikroskopisch dargestellt. Statistik: Sekretion: Student's t-Test, MW±SEM, n=3, repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Wiederholungen. Permeabilität: ANOVA, post-hoc test: Tukey. p<0,05 ≙ stat. signifikant.

Ergebnisse

PMA führte zur signifikanten Permeabilitätssteigerung endothelialer Monolayer. Dies ließ sich durch Vorbehandlung mit Simvastatin hemmen (Abb. 1). Stimulation mit PMA induzierte ebenfalls die Sekretion von Ang-2 durch Endothelzellen (142,8±9,6 pg/cm² vs. 93,4±4,0 pg/cm² in der Kontrolle; PMA [50 ng/ml], t=60min, p<0,01). Simvastatin sowie Mevastatin supprimierten diese Sekretion signifikant bis auf das basale Sekretionsniveau, wobei eine klare Dosisabhängigkeit sichtbar wurde (t=24 hrs). Dabei zeigten Statine keine zytotoxischen Effekte. Der intrazelluläre Gehalt an Ang-2-Protein wurde durch die Vorbehandlung nicht vermindert, in der Tendenz eher erhöht (195,9±29,2 pg/cm² vs. 125±12,8 pg/cm² in der Kontrolle; [1.0 µM], n.s.). Simvastatin führte dosisabhängig zu signifikant gesteigerter zellulärer NO-Synthese (1313,4±123 pmol/cm² vs. 750,8±113,8 pmol/cm² in der Kontrolle; [10 µM], p<0,05). Kokultivation mit dem NO-Synthase-Antagonisten L-NNA hob die Suppression der Ang-2-Sekretion nicht nur auf, sondern steigerte sie über das Maß der PMA-Kontrolle hinaus (490±11,1 pg/cm² vs. 258,1±31,1 pg/cm² ohne L-NNA; L-NNA [2,5 mM], p<0,005). Zugabe von Intermediärprodukten der Mevalonatsynthese konnte den Statin-vermittelten Effekt abschwächen (p<0,005 für Mevalonat [100 µM] bzw. p<0,05 für Geranylpyrophosphat [5 µM], jeweils vs. unbehandelte Kontrolle). Fluoreszenzmikroskopisch wurde die Hemmung der stimulierten Exozytose der WPB durch Simvastatin deutlich.

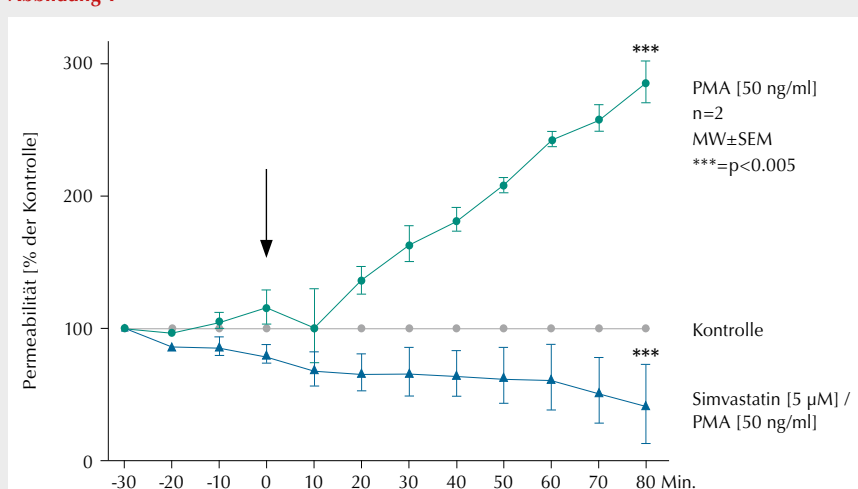
Interpretation

Simvastatin verhindert die Induktion endothelialer Hyperpermeabilität durch PMA in vitro. PMA stellt einen starken Induktor der Sekretion von Ang-2 durch Endothelzellen dar, diese Sekretion wird ebenfalls durch Statine unterdrückt. Ang-2 verursacht endotheliale Hyperpermeabilität durch Bindung am TIE2-Rezeptor, daher ist ein Zusammenhang naheliegend. Die beobachteten Statin-Effekte sind spezifisch. Die Steigerung der endothelialen NO-Produktion führt nicht zur Abnahme der Ang-2-Synthese, sondern zur mikroskopisch beobachtbaren Hemmung der zellulären Exozytose. Schlussfolgernd können Statine über diesen Mechanismus die Entwicklung endothelialer Dysfunktion verhindern.

Literatur

1. Parikh, et al: Excess circulating angiopoietin-2 may contribute to pulmonary vascular leak in sepsis in humans. *PLoS Med* 2006;3(3):e46
2. Scharpfenecker, et al: The Tie-2 ligand angiopoietin-2 destabilizes quiescent endothelium through an internal autocrine loop mechanism. *J Cell Sci* 2005;118(Pt 4):771-80
3. Jacobson, et al: Simvastatin attenuates vascular leak and inflammation in murine inflammatory lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005;288(6):L1026-32.

Abbildung 1



Einfluss von PMA auf die Albumin-Permeabilität endothelialer Monolayer, Veränderung nach 24-stündiger Vorbehandlung mit Simvastatin (signifikant für PMA vs. Kontrolle bzw. für Simvastatin/PMA vs. PMA, repräsentatives Ergebnis aus drei voneinander unabhängigen Wiederholungen).

Die expiratorische Propofolmessung zur Echtzeit-Abschätzung der Propofol-Plasmakonzentration: Ein pharmakokinetisch/-dynamisches Modell an Freiwilligen

C. Hornuß¹ · G. Schelling¹ · K. Tabata² · N. Sambol² · C. C. Apfel³

- 1 Klinik für Anaesthesiologie, Klinikum der Universität München
- 2 Department of Bioengineering & Therap. Sciences, University of California, San Francisco
- 3 Department of Anesthesia and Perioperative Care, University of California, San Francisco

Korrespondenz:

cyrill.hornuss@med.uni-muenchen.de

Fragestellung

Propofol wird nach intravenöser Gabe in geringen Mengen ausgeatmet. Die Propofol-Konzentration im Atemgas (P_{exp}) kann dabei in Echtzeit bestimmt werden [1,2]. Da P_{exp} und die Propofol-Plasmakonzentration (P_{Plasma}) während „steady-state“-Bedingungen eng korreliert sind, könnte die Echtzeit-Bestimmung von P_{exp} zur Steuerung der intravenösen Anästhesie mittels Propofol (TIVA) verwendet werden. Während „non-steady-state“-Bedingungen gleicht sich allerdings P_{exp} – ebenso wie die Wirkort-Konzentration (C_{eff}) – an P_{Plasma} nur mit einer unbekannten zeitlichen Latenz an. Die Echtzeit-Bestimmung von P_{exp} ist jedoch nur dann klinisch sinnvoll, wenn P_{exp} zeitnah Veränderungen von P_{Plasma} und vor allem C_{eff} widerspiegelt. Wir führten deshalb eine Freiwilligenstudie durch, um ein pharmakokinetisch/-dynamisches Modell für Propofol im Atemgas zu entwickeln und um die Zeitverläufe von P_{exp} und C_{eff} miteinander zu vergleichen.

Methodik

Nach Zustimmung durch die Ethikkommission und schriftlicher Einwilligung untersuchten wir an der University of California, San Francisco, 20 Freiwillige (ASA Status I, Alter 29 ± 8 Jahre, 11 Frauen) während Propofol-Monoanästhesie. Propofol wurde als Dauerinfusion ($0,4 \text{ mg/kg/min}$) für 10 min verabreicht, gefolgt von einer 20minütigen Infusionspause. Die Propofolzufuhr wurde dann mittels „target-controlled infusion“ (Schnider-Modell) mit vier ansteigenden Zielkonzentrationen von 2, 3, 4 und $5 \text{ } \mu\text{g/ml}$ von jeweils 15 min Dauer wiederaufgenommen, anschließend wurde die Propofolgabe beendet, und es folgte eine

Beobachtungsphase von 180 min. P_{exp} wurde in Echtzeit mittels Ionen-Molekül-Reaktions-Massenspektrometrie (IMR-MS, Fa. V&F, Absam, Österreich) bestimmt, wobei das IMR-MS System direkt mit der Larynxmaske der Probanden verbunden war (Seitenstrommessung). Pro Proband wurden 21 arterielle Blutproben abgenommen und P_{Plasma} mittels Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie bestimmt. Der Bispektrale Index (BIS Vista, Fa. Covidien, Boulder, CO, USA) diente zur Abschätzung des hypnotischen Propofol-Effektes. Pharmakokinetisch/-dynamische Populations-Modelle für P_{Plasma} , P_{exp} und C_{eff} wurden auf der Grundlage von nicht-linearen gemischten Effekten mittels NONMEM Software (Fa. ICON, Elliot City, MD, USA) erstellt. Zur Überprüfung des Goodness-of-fit der Modelle verwendeten wir diagnostische Plots und Likelihood-Ratio-Tests.

Ergebnisse

Der Zusammenhang zwischen P_{Plasma} und P_{exp} konnte mit einem 6-Kompartiment-Modell mit drei Kompartimenten für P_{Plasma} , zwei zusätzlichen Transit-Kompartimenten sowie einem Verteilungskompartiment für P_{exp} beschrieben werden. C_{eff} wurde mit einem zusätzlichen Wirkort-Kompartiment modelliert. Der mediane absolute Vorhersagefehler und

der mediane Vorhersagefehler [3] des Populationsmodells für P_{exp} betrugen 26,7% bzw. -2,8%. Die Zeitverläufe der modellierten P_{exp} und von C_{eff} sind sehr ähnlich (Abb. 1).

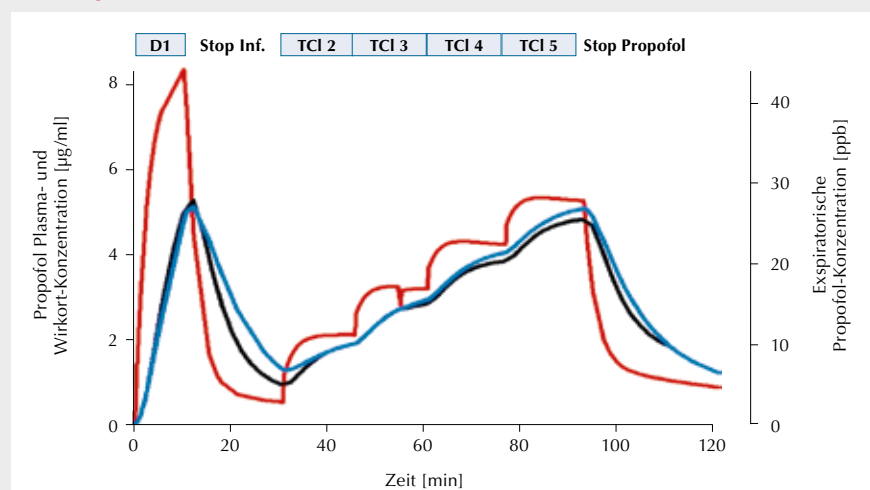
Interpretation

Ein pharmakokinetisches 6-Kompartiment-Modell für die in Echtzeit gemessene P_{exp} erlaubt die Vorhersage von P_{Plasma} auch während „non-steady-state“-Bedingungen. Der sehr ähnliche Zeitverlauf von P_{exp} und C_{eff} deutet darauf hin, dass die expiratorische Propofolmessung auch Veränderungen der Wirkortkonzentration zeitnah widerspiegelt und zukünftig einen wichtigen Beitrag zur Steuerung der Narkosetiefe bei TIVA leisten kann.

Literatur

1. Hornuss C, Praun S, Villinger J, et al: Real-time monitoring of propofol in expired air in humans undergoing total intravenous anesthesia. *Anesthesiology* 2007;106:665-74
2. Takita A, Masui K, Kazama T: On-line monitoring of end-tidal propofol concentration in anesthetized patients. *Anesthesiology* 2007; 106:659-64
3. Masui K, Upton RN, Doufas AG, et al: The Performance of Compartmental and Physiologically Based Recirculatory Pharmacokinetic Models for Propofol. *Anesth Analg* 2010;111:368-79.

Abbildung 1



Zeitverlauf der modellierten Konzentrationen von P_{Plasma} (rot), C_{eff} (blau) und P_{exp} (schwarze Linie), in einem Beispielprobanden während Propofol-Monoanästhesie. Das zeitliche Propofol-Infusionschema ist am oberen Rand dargestellt: DI = Dauerinfusion mit $0,4 \text{ mg/kg/min}$, TCI 1-5 = TCI-Plasma-Zielkonzentration von 2,3,4, bzw. $5 \text{ } \mu\text{g/ml}$.

Kardioprotektion im Alter durch Aktivierung von mK_{Ca} -Kanälen in der Ratte in vivo

R. Huhn¹ · F. Behnenburg¹ · I. Bauer¹ · M. W. Hollmann² · A. Heinen¹

1 Klinik für Anästhesiologie, Universitätsklinikum Düsseldorf

2 Klinik für Anästhesiologie, Universitätsklinikum Amsterdam, Niederlande

Korrespondenz:

Ragnar.Huhn@med.uni-duesseldorf.de

Fragestellung

Der Effekt der myokardialen Präkonditionierung (PC) ist im Alter aufgehoben, kann aber über eine Aktivierung mitochondrialer Kalzium-abhängiger Kaliumkanäle (mK_{Ca}) wieder hergestellt werden [1]. Die Proteinkinase A (PKA) ist ein möglicher Regulator von mK_{Ca} -Kanälen [2]. In dieser Studie untersuchten wir, ob 1) eine Kardioprotektion durch PKA-Aktivierung über mK_{Ca} -Kanäle vermittelt wird; 2) es altersbedingte Unterschiede bei der Protektion durch Aktivierung von PKA bzw. mK_{Ca} -Kanälen gibt und 3) die Regulation der PKA altersbedingten Veränderungen unterliegt.

Methodik

Mit Genehmigung der zuständigen Behörde wurde bei Pentobarbital-anästhesierten jungen (2-3 Monate) und alten (22-24 Monate) männlichen Wistar-Ratten ein Hauptast der linken Koronararterie für 25 min okkludiert, gefolgt von 2 h Reperfusion. Am Versuchsende wurde die Infarktgröße mittels Triphenyltetrazoliumchlorid-Färbung bestimmt (n=5-6 für alle Gruppen). Zur Bestimmung der niedrigsten protektiven Dosis des PKA-Aktivators Forskolin (For) sowie des mK_{Ca} -Kanalaktiva-

tors NS1619 (NS) wurden zunächst zwei Serien zur Dosis-Findung durchgeführt. Hierbei wurden junge Tiere entweder einer Vehikel-behandelten Kontrollgruppe und verschiedenen Dosen Forskolin (10, 30, 100, 300 $\mu\text{g/kg}$ i.v.; 10 min vor der Ischämie) oder einer Kontrollgruppe und verschiedenen Dosen NS1619 (0,3, 1, 3, 10, 30 $\mu\text{g/kg/min}$ i.v. über 10 min vor der Ischämie) randomisiert zugeordnet. Basierend auf diesen Ergebnissen, wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen PKA-Aktivierung und mK_{Ca} -Kanälen untersucht. Junge Tiere wurden randomisiert einer Kontroll- und einer For30-Gruppe, einer Iberitoxingruppe (Ibtx, mK_{Ca} -Kanalblocker, 10 $\mu\text{g/kg/min}$ i.v. über 15 min vor der Ischämie) sowie einer Ibtx-Gruppe in Kombination mit Forskolin (For30+Ibtx) zugeordnet. Die Wahl der Dosis von Ibtx basiert auf Studien am gleichen Modell, in welchen eine Blockade protektiver Effekte gezeigt wurde [3]. Des Weiteren wurden in alten Tieren insgesamt 5 Gruppen untersucht: Kontrolle, die in jungen Tieren niedrigsten protektiven Dosen von Forskolin (For30) und NS1619 (NS10) sowie die nächst höhere Dosis der beiden Aktivator (For100 und NS30). Zur Bestimmung der cAMP-Spiegel sowie der PKA-Aktivität wurden Experimente in jungen und alten Tieren durchgeführt. Die Herzen (je n=6) wurden 5 Minuten nach For30 bzw. Vehikel entnommen. Die cAMP-Spiegel wurden mit ELISA bestimmt. Als Marker der PKA-Aktivität wurde das Verhältnis von phosphoryliertem zu Gesamtphospholamban mittels Western-Blot-Analyse bestimmt. Statistik: ANOVA mit Tukey post-hoc test. Daten sind MW \pm SD.

Ergebnisse

Bei jungen Tieren betrug die niedrigste protektive Dosis von Forskolin 30 $\mu\text{g/kg}$ (Abb. 1A) und von NS1619 10 $\mu\text{g/kg/min}$ (Abb. 1B). Der

kardioprotektive Effekt von Forskolin wurde durch Ibtx blockiert (Abb. 1C). Im alten Herzen führte Forskolin zu keiner Infarktgrößenreduktion; NS1619 war demgegenüber kardioprotektiv (Abb. 1D). Die Analyse der cAMP-Spiegel zeigte einen Anstieg sowohl in jungen (For30: $5,3 \pm 0,8$ pmol/mg Protein vs. Con: $4,3 \pm 0,4$ pmol/mg Protein; $P < 0,05$) als auch alten (For30: $5,1 \pm 1,2$ pmol/mg vs. Con: $3,4 \pm 0,5$ pmol/mg; $P < 0,05$) Herzen. Forskolin führte zu einer Steigerung der Phospholamban-phosphorylierung bei jungen (For30: $2,4 \pm 0,7$ vs. Con: $1,1 \pm 0,4$; $P < 0,05$) und alten (For30: $2,4 \pm 1,3$ vs. Con: $0,9 \pm 0,5$; $P < 0,05$) Tieren.

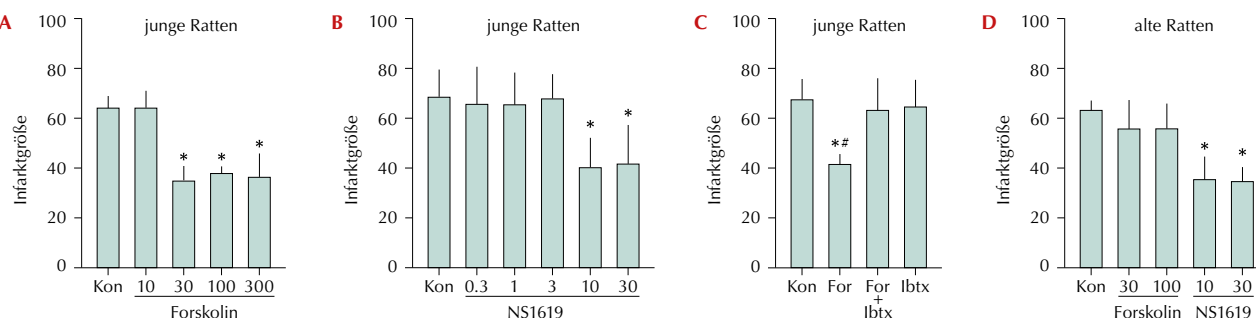
Interpretation

Diese Ergebnisse zeigen, dass: 1) eine Kardioprotektion durch PKA-Aktivierung über mK_{Ca} -Kanäle vermittelt wird, 2) eine Aktivierung von mK_{Ca} -Kanälen mit NS1619 protektiv im alten Herzen wirkt und 3) eine Gabe von Forskolin zu vergleichbaren Effekten auf den cAMP-Spiegel und die PKA-Aktivität bei jungen und alten Herzen führt.

Literatur

1. Huhn R, Weber NC, Preckel B, Schlack W, Bauer I, Hollmann MW, Heinen A: Age-related loss of cardiac preconditioning: Impact of protein kinase A. *Exp Gerontol* 2012 Jan; 47(1):116-21
2. Redel A, Lange M, Jazbutyte V, Lotz C, Smul TM, Roewer N, Kehl F: Activation of mitochondrial large-conductance calcium-activated K^+ channels via protein kinase A mediates desflurane-induced preconditioning. *Anesth Analg* 2008 Feb; 106(2):384-91
3. Heinen A, Huhn R, Smele KM, Zuurbier CJ, Schlack W, Preckel B, Weber NC, Hollmann MW: Helium-induced preconditioning in young and old rat heart: impact of mitochondrial Ca^{2+} -sensitive potassium channel activation. *Anesthesiology* 2008 Nov; 109(5):830-6.

Abbildung 1



Infarktgrößen (in % des Risikogebietes). * $P < 0,05$ vs. Kon, # $P < 0,05$ vs. For+Ibtx; n=5-6 je Gruppe.

Sphingomyelinase als Effektor der Wirtsreaktion bei polymikrobieller Sepsis

N. Jbeily · F. A. Gonnert · I. Suckert · M. Bauer · R. A. Claus

Klinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie, und Integriertes Forschungs- und Behandlungszentrum Sepsis und Sepsisfolgen (CSCC), Universitätsklinikum Jena

Korrespondenz:

nayla.jbeily@med.uni-jena.de

Fragestellung

Sphingolipide fungieren neben ihrer vermeintlichen Hauptaufgabe als inerte Strukturkomponente in Zellmembranen als hochaktive Metabolite für zahlreiche Stoffwechselprozesse wie Stressantwort, Apoptose und Inflammation. Die Metabolite der Sphingomyelinhydrolyse, insbesondere Ceramid, einschließlich der Aktivität des Schrittmacherenzym der raschen Ceramidbildung, die saure Sphingomyelinase (ASM), in der Plasma-sezernierten Form sind bei Patienten mit Sepsis schweregradabhängig erhöht [1,2]. Innerhalb der Zellmembran neigt Ceramid zur Selbstaggregation in Makrodomänen, in welchen Rezeptorproteine zu funktionell aktiven Komplexen assemblieren und eine Vielzahl von Signalkaskaden (TNF- α , CD95 u.a.) zwischen immunkompetenten Zellen verstärken. Die Sekretion der ASM wird durch proinflammatorische Zytokine stimuliert, andererseits vermindern funktionelle Inhibitoren die Endotoxin-induzierte Zytokinfreisetzung in vitro [3]. Desipramin, ein unspezifischer Inhibitor der ASM, verbessert in einer klinischen Studie bei cystischer Fibrose sowohl den pulmonalen Infektionsstatus (verbesserte Clearance *P. aeruginosa*) als auch Lungenfunktionsparameter. Vor diesem Hintergrund sollte eine mögliche Rolle des Enzyms ASM bei der Wirtsantwort und bei der Entwicklung eines Organversagens untersucht werden.

Methodik

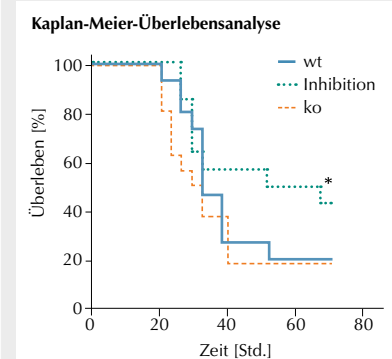
Nach Genehmigung wurden Mäuse einer polymikrobiellen Infektion durch i.p. Applikation einer Stuhlsuspension unterzogen. Neben der Überlebensrate wurden 6 h und 24 h nach Infektion das Zytokinprofil, Organfunktionsparameter, Phagozytose, Bakterienlast und mittels Intravitalmikroskopie die Leukozyten-Endothel-Interaktion analysiert und innerhalb folgender Versuchsgruppen verglichen: (i) Mäuse mit gen. ASM-Defizienz, (ii) deren WT-littermates sowie (iii) Mäuse nach pharmakologischer Inhibition

der ASM mit Desipramin. Blut- und Gewebeproben wurden in Mehrfachnutzung aus mindestens 5 unabhängigen Versuchstieren gewonnen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test, bei Mehrfachvergleichen mittels one-way ANOVA, in der Überlebensanalyse mittels Logrank-Test.

Ergebnisse

Nach Induktion der polymikrobiellen Sepsis entwickeln alle Tiere unabhängig von Genotyp oder Vorbehandlung das erwartete Krankheitsbild. Inhibition verhindert den Sepsis-induzierten ASM-Aktivitätsanstieg. Plasma-zirkulierende Zytokinkonzentrationen erlauben eine Gruppen-bezogene Differenzierung: beispielhaft stiegen bei WT-Tieren die Werte für MCP-1 auf 1.000 (6 Std.) und 8.000 pg/ μ L an, bei ASM-defizienten Mäusen ist die Zytokinantwort signifikant stärker ausgeprägt (2.500 bzw. 14.000 pg/ μ L, $p < 0.05$). Die pharmakologische Hemmung resultiert in einer veränderten Kinetik und Dynamik der Zytokinfreisetzung: nach 6 Std. werden Werte von 9.000 pg/ μ L erreicht ($p < 0.05$), welche jedoch rasch auf niedrige Werte absinken (2.000 pg/ μ L, $p < 0.05$). Ein ähnliches Verhalten wiesen auch TNF- α , IL1 β und IL-6 auf. Die veränderte Wirtsantwort spiegelt sich in einer signifikant höheren Bakterienlast im Blut und im Lebergewebe genetisch defizienter Tiere wider, was mit einer signifikant erhöhten Phagozytoseleistung vergesellschaftet ist. Mittels intravitaler Mikroskopie wurden Unterschiede hinsichtlich der Leukozyten-Endothel-Interaktion in der Leber analysiert: Sechs Stunden nach Sepsisinduktion bei WT-Tieren steigt der Anteil rollender Leukozyten von 6 auf 11/100 Leukozyten an ($p < 0.05$), wobei in beiden Vergleichsgruppen bei ähnlichem Ausgangsniveau kein Anstieg zu verzeichnen ist. Ebenso steigt nur bei WT-Tieren die Anzahl adhärenter Leukozyten signifikant an (von 39 auf 65/mm², $p < 0.05$). Vice versa, fällt bei ASM-Defizienz oder Inhibition die Expression des leukozytären Aktivierungsmarkers CD49d signifikant vom Ausgangswert ab, was mit der verminderten endothelialen Adhärenz korrespondiert. Bei der Betrachtung von Parametern der Leberschädigung war lediglich bei den genetisch defizienten Tieren der ALT-Level signifikant erhöht. In der Überlebensanalyse spiegelte sich die überschießende Wirtsantwort der KO-Tiere in einer tendenziell höheren und zeitlich früheren Mortalität im Vergleich zur WT-Gruppe wider. Darüber hinaus war die Absterbekinetik bei den Inhibitor-behandelten Tieren verzögert und die Überlebensrate erhöht (vgl. Abb. 1).

Abbildung 1



Überlebensanalyse: PCI wurde in WT-Tieren, ASM-defizienten und in Desipramin-behandelten Tieren (je 16) induziert.

Während der Beobachtungszeit wurden die Tiere einer sc. Volumensubstitution unterzogen (2x tgl. 25 μ L/g BW Vollelektrolytlösung) und mindestens alle 3 Std. inspiziert.

Logrank-Test belegt einen signifikanten Unterschied (*) der Überlebenswahrscheinlichkeit in der Inhibitionsgruppe vs. ASM-defizienten Tieren.

Interpretation

Die Daten weisen auf eine wichtige Rolle der ASM während Sepsis hin. Dem Enzym kann möglicherweise eine duale, phasenabhängige Rolle zugeschrieben werden: In der frühen Phase ist ein Aktivitätsanstieg essentiell für adäquate Keimelimination. Die Restaktivität (ca. 10% Basalwertes) nach pharmakologischer Inhibition scheint für primäre Keimabwehr ausreichend, die Hemmung der überschießenden Aktivität protektiv bez. der Stressantwort infektortferner Organe wirksam. In Zusammenschau mit dem Zytokinprofil, verbessertem Gewebeschaden und dem Überlebensvorteil sollte ein möglicher positiver Inhibitionseffekt zeitversetzt nach Infektion überprüft werden.

Nayla Jbeily dankt für Unterstützung durch ein Stipendium der International Leibniz Research School Jena.

Literatur

1. Claus RA, Bunck AC, et al: FASEB J 2005;19: 1719-21
2. Delogu G, Famularo G, et al: Crit Care Med 1999;27:2413-7
3. Roumestan C, Michel A, et al: Respir Res 2007;8:35.

Die Rolle von Fibrin Fragment E während der Entzündung

C. Jennewein¹ · P. Paulus¹ · N. Tran¹ · P. Ellinghaus² · J. A. Eble³ · K. Zacharowski¹

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

2 Bayer Schering Pharma AG, Wuppertal

3 Zentrum für Molekulare Medizin, Klinikum der Goethe-Universität Frankfurt am Main

Korrespondenz: carla.jennewein@kgu.de

Fragestellung

SIRS und Sepsis sind nicht nur charakterisiert durch eine überschießende Entzündungsreaktion, sondern auch durch massive Aktivierung der Gerinnungskaskade [1]. Hierbei kommt es zur Bildung von Fibrinfragmenten wie z.B. D-Dimeren, aber auch dem Fibrin Fragment E (FnE) [2]. Es konnte bereits gezeigt werden, dass FnE die Leukozytenmigration beeinflusst [3], wobei dessen Rolle in Gänze bisher nicht untersucht wurde. Im Folgenden sollte die Frage geklärt werden, inwieweit FnE zur endothelialen Entzündungsantwort beiträgt.

Methodik

FnE wurde durch Verdau von Fibrinogen mit Thrombin und Plasmin und nachfolgender Gelfiltration aufgereinigt und auf Endotoxinverunreinigung getestet. Zur Analyse der Ent-

zündung wurden HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) mit FnE stimuliert und die Chemokin- bzw. Adhäsionsmolekülexpression mittels realtime PCR, ELISA und Immunfluoreszenzfärbung bestimmt. Um Thrombineffekte auszuschließen, wurden HUVEC zusätzlich mit dem Thrombin-Inhibitor Lepirudin (60 µg/ml) behandelt. Zum Vergleich wurden die Zellen außerdem mit Lipopolysaccharid (LPS, 100 ng/ml) stimuliert. Die Daten wurden mittels one-way ANOVA analysiert und $p < 0,05$ als signifikant angenommen (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, $n \geq 4$).

Ergebnisse

HUVEC wurden mit steigenden Konzentrationen von FnE bzw. LPS für 4 h stimuliert und die mRNA Expression von CD62E (E selectin) und ICAM-1 (intracellular cell adhesion molecule 1) bestimmt. FnE führte konzentrationsabhängig und thrombinunabhängig zur Induktion von CD62E und ICAM-1 (Abb. 1A und B) als auch MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1), VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) CXCL-8 (CXC ligand 8) und IL-6 (interleukin-6, Daten nicht gezeigt). Weiterhin wurde die Proteinkonzentration der Chemokine MCP-1 und CXCL-8 im Überstand von HUVEC bestimmt, welche mit 100 µg/ml FnE stimuliert wurden. FnE führte hier zeitabhängig zur Induktion der MCP-1 und

CXCL-8 Level im Überstand (Abb. 1C und D). Die Induktion von CD62E und ICAM-1 konnte mittels Immunfluoreszenz bestätigt werden (HUVEC stimuliert für 6 h mit 100 µg/ml FnE. Abb. 1E und F).

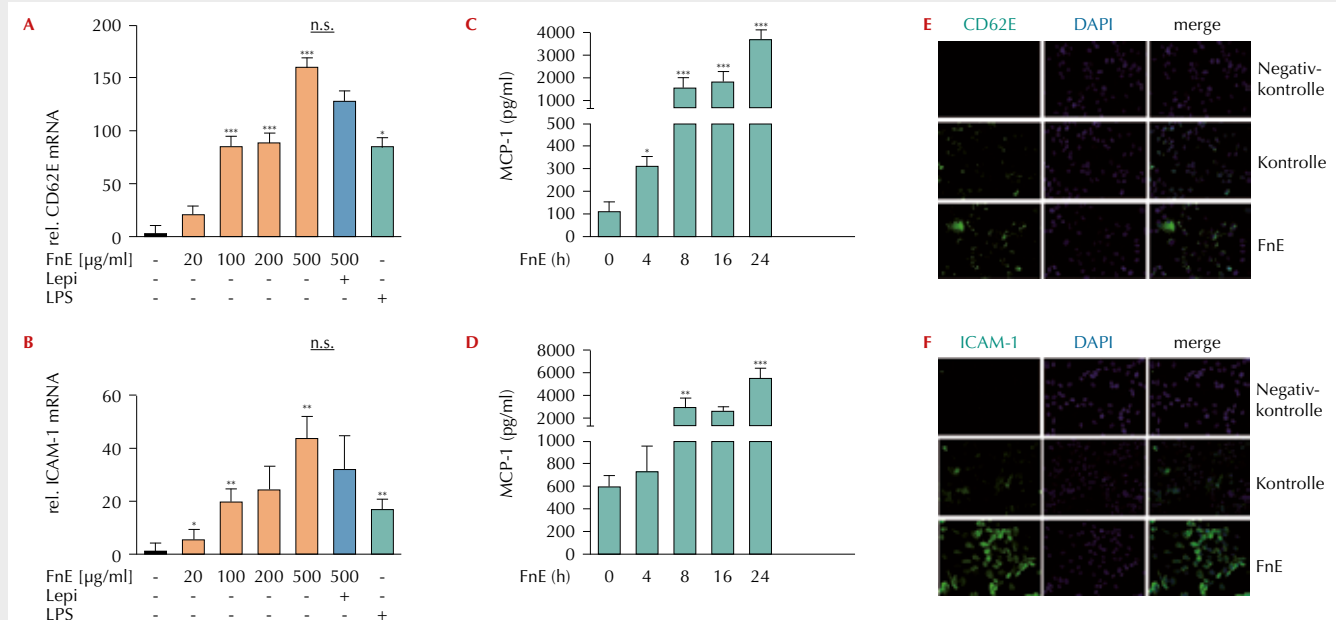
Interpretation

FnE führt in Endothelzellen zur Induktion von Chemokinen, E-Selektin und verschiedenen Adhäsionsmolekülen, welche besonders für die Rekrutierung und Migration von Leukozyten eine wichtige Rolle spielen. Erhöhte D-Dimerspiegel in septischen Patienten lassen außerdem auf erhöhte FnE-Level schließen. Daher vermuten wir, dass FnE während der Sepsis die Entzündungsantwort verstärkt und damit zum Krankheitsverlauf beiträgt.

Literatur

1. Levi M: The coagulant response in sepsis and inflammation. *Haemostaseologie* 2010;30:10-16
2. Jennewein C, Tran N, Paulus P, Ellinghaus P, Eble JA, Zacharowski K: Novel aspects of fibrin(ogen) fragments in the course of inflammation. *Mol Med* 2011;17:568-73
3. Petzelbauer P, Zacharowski PA, Miyazaki Y, Friedl P, Wickenhauser G, Castellino FJ, et al: The fibrin-derived peptide Bbeta15-42 protects the myocardium against ischemia-reperfusion injury. *Nat Med* 2005;11:298-304.

Abbildung 1



Inflammatorische Wirkung von FnE. mRNA Expression von **A**) CD62E (E-Selektin) und **B**) ICAM-1 in HUVEC stimuliert mit FnE für 4 h. **C**) MCP-1 und **D**) CXCL-8 Proteinlevel im Überstand von HUVEC stimuliert mit 100µg/ml FnE. **E**) CD62E und **F**) ICAM-1 Expression in HUVEC stimuliert mit 100 µg/ml FnE für 6 h detektiert mittels Immunfluoreszenz.

Genetische Varianten im β_2 -Adrenozeptorsystem beeinflussen den Vasopressorbedarf unter thorakaler Epiduralanästhesie

J. Karlik · U. H. Frey · F. Herbstreit · J. Peters

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

Korrespondenz:

jan.karlik@uk-essen.de

Fragestellung

β -adrenerge Signaltransduktion ist essentieller Bestandteil zellulärer wie systemischer neurohumoraler Regulation. Neuere Daten unterstreichen zudem die Rolle deren genetischer Varianten für perioperatives Risiko [1] und Kreislauferkrankungen [2]. Schwachpunkt bisheriger Erkenntnis ist indes, dass mit genetischen Varianten assoziierte Alterationen zumeist nur im Ruhezustand unter steady-state Bedingungen untersucht wurden, nicht aber unter standardisierten Herausforderungen. Insoweit ist der Stellenwert genetischer Varianten für den Phänotyp „Regulation unter Anästhesie“ weitgehend unbekannt. Wir testeten die These, dass genetische Einflüsse im β -adrenergen Signaltransduktionsweg auf arteriellen Druck bzw. Vasopressorbedarf nach weitgehender Ausschaltung sympathischer Kreislaufantriebe durch thorakale Epiduralanästhesie (EDA) demaskiert werden können.

Methodik

Nach positivem Ethikkommissionsvotum wurden bislang 93 elektive, abdominalchirurgische Patienten (ASA 1-3; Alter: 60 Jahre \pm 11, Spanne: 31-80) prospektiv eingeschlossen. Nach Anlage von arteriellem (A. radialis) und thorakalem epiduralem Katheter (Th6/7-Th9/10, 3 ml (Testdosis) + 10 ml Carbostesin 0,5%) in Oberflächenanästhesie wurden arterieller Blutdruck und Ausdehnung der sensiblen Blockade (warm/kalt Diskrimination, mittlere Ausdehnung: rostral Th2/3, caudal L2/3) zunächst für 20 Minuten im Wachzustand in Rückenlage und sodann unter standardisierter Anästhesieeinleitung (Thiopental 5 mg/kg, Fentanyl 4 μ g/kg, Rocuronium 0,6 mg/kg, Isofluran 0,8% endtidal) mit maschineller Beatmung (Normocarbie, PEEP: 5 mbar) gemessen. Bei Abfall des arteriellen Mitteldruckes

(MAD) unter 70 mmHg (Interventionsgrenze) wurde der α -Agonist Phenylephrin injiziert (Einzeldosis 100 μ g bzw. nach klinischer Notwendigkeit, ggf. wiederholt). Die β_2 -Adrenozeptor Polymorphismen ADRB2 Arg16Gly, Gln27Glu sowie die resultierenden ADRB2 Haplotypen wurden nach DNA-Isolation aus Vollblut mittels Slowdown PCR [3] und Pyrosequenzierung bestimmt. Statistik: ANOVA, χ^2 -Test, multivariate Analyse mit linearer Regression; $p < 0,05$.

Ergebnisse

Bei 86 (92%) der Patienten musste Phenylephrin (mittlere kumulative Dosis pro Patient über die gesamte Untersuchungsperiode: 654 μ g \pm 450) verabreicht werden. Gly16 Allel-Träger (Gly16: 686 μ g \pm 449 vs. Arg16Arg: 313 μ g \pm 327; $p=0,024$), Glu27 Allel-Träger (Glu27: 741 μ g \pm 463 vs. Gln27Gln: 387 μ g \pm 277; $p=0,001$) sowie die korrespondierenden Haplotypen (Gly16-Glu27: 741 μ g \pm 463, Gly16-Gln27: 427 μ g \pm 249, Arg16Arg-Gln27Gln: 313 μ g \pm 327; $p=0,003$) zeigten einen höheren kumulativen Vasopressorbedarf. Einen höheren Vasopressorbedarf zeigten zudem Männer (746 μ g \pm 464 vs. 526 μ g \pm 401 bei Frauen; $p=0,019$), Patienten mit rostralerer epiduraler Punktion (Th6/7+7/8 vs. Th8/9+9/10: 743 μ g \pm 440 vs. 506 μ g \pm 433; $p=0,013$), Patienten mit geringerem Ausgangsblutdruck vor EDA ($p < 0,001$) sowie tendenziell auch Patienten mit rostralerer Ausbreitung der sensiblen Blockade ($p=0,055$) und ältere Patienten ($p=0,065$). Die univariate Analyse anderer Variablen (Körperlänge bzw. -gewicht, Vorerkrankungen, Vormedikation, kaudale Ausbreitung der sensiblen Blockade) ergab keine signifikanten Zusammenhänge. Die multivariate Analyse zeigte unabhängige signifikante Einflüsse der ADRB2-Polymorphismen wie auch klinischer Faktoren (Tab. 1). Zudem erreichten Haplotypen mit dem Gly16 Allel eindeutig früher und zu 91,4% die kritische Blutdruckgrenze von 70 mmHg nach Anästhesie-Einleitung und während Überdruckbeatmung im Vergleich zu 60% beim Arg16-Gln27 Haplotyp (Abb. 1).

Interpretation

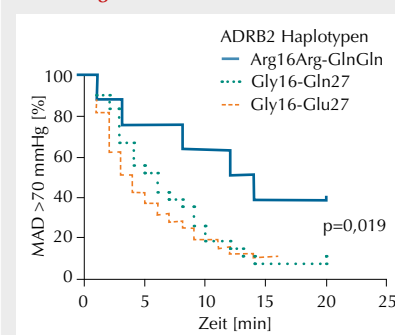
β_2 -Adrenozeptor-Polymorphismen sind somit unabhängige, relevante Prädiktoren von Blutdruckabfall bzw. Vasopressorbedarf bei Herausforderungen des Kreislaufes durch

Tabelle 1

Grad des Einflusses genetischer und klinischer Variablen auf Vasopressorbedarf.

| Variable | Anteil (%) | p-Wert |
|-------------------|------------|--------|
| ADRB2 Gly16 | 3,6 | 0,049 |
| ADRB2 Glu27 | 9,3 | <0,001 |
| ADRB2 Haplotypen | 7,5 | 0,002 |
| Geschlecht | 2,9 | 0,049 |
| Punktionshöhe | 7,5 | 0,002 |
| Ausgangsblutdruck | 17,3 | <0,001 |

Abbildung 1



Anteil normotensiver Patienten (arterieller Mitteldruck > 70 mmHg) nach Anästhesieeinleitung in Abhängigkeit vom ADRB2 Haplotyp.

weitgehende Ausschaltung sympathischer Antriebe mittels thorakaler Epiduralanästhesie. Anästhesieverfahren erscheinen sui generis als Modell zur Demaskierung genetischer Einflüsse auf die neurohumorale Regulation.

Literatur

1. Frey UH, Kottenberg E, Kamler M, et al: Genetic interactions in the β -adrenoceptor/G-protein signal transduction pathway and survival after coronary artery bypass grafting: a pilot study. Br J Anaesth 2011;107:869-878
2. Von Homeyer P, Schwinn DA: Pharmacogenomics of β -Adrenergic Receptor Physiology and Response to β -Blockade. Anesth Analg 2011;113:1305-1318
3. Frey UH, Bachmann HS, Peters J, et al: PCR-amplification of GC-rich regions: 'slowdown PCR'. Nature Protoc 2008;3:1312-7.

Alveolarepithelzellen registrieren CO_2 mit Hilfe des Citratzyklus

P. Keller · S. Tank · M. Kiefmann ·
A. Mecklenburg · C. Olotu · A.E. Goetz ·
R. Kiefmann

Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie,
Zentrum für Anästhesiologie und Intensivmedizin,
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Korrespondenz:
r.kiefmann@uke.de

Fragestellung

Perfusionsausfälle in der Lunge induzieren Atelektasen zur Minimierung des Ventilations-/Perfusions-mismatch [1]. In früheren Untersuchungen konnten wir bereits zeigen, dass Alveolarepithelzellen (AEZ) einen mit einem Perfusionsausfall einhergehenden Abfall der alveolären CO_2 -Konzentration über ein Ca^{2+} -Signal erkennen und darüber die Surfactant-Sekretion reduzieren [2]. Dieses Hypokapnie-bedingte Ca^{2+} -Signal wird durch eine Verschiebung von Ca^{2+} aus dem Zytosol in die Mitochondrien verursacht. Ziel der Untersuchung war die Entschlüsselung des mitochondrialen Mechanismus, der dem CO_2 -Sensing in AEZ zugrunde liegt. Als wesentlicher Bestandteil dieses Mechanismus wurde von uns eine im Citratcyclus stattfindende CO_2 -abhängige Beeinflussung der NADH-Entstehung und eine sich daraus ergebende Veränderung des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\psi$) als treibende Kraft für die mitochondriale Ca^{2+} -Aufnahme angenommen.

Methodik

Alveolarkarzinomzellen A 549, die Eigenschaften von AEZ vom Typ II aufweisen, wurden unter Standardbedingungen kultiviert. Die Messung der zytosolischen sowie der mitochondrialen Ca^{2+} -Konzentration $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{Zyt}}$ bzw. $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{Mito}}$ erfolgte nach Färbung der A 549-Zellen mit den Fluoreszenzfarbstoffen Fura-2 oder Rhod-2 mittels Epifluoreszenzmikroskopie. Zusätzlich wurden zur Bestimmung von $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{Mito}}$ die Zellen mit der 4mitD₃-CPV-Plasmid-DNA transfiziert und mit Hilfe der fluorescence resonance energy transfer

(FRET)-Technik die emittierten CFP- und YFP-Fluoreszenzen simultan und im Verhältnis zueinander gemessen. Dy wurde mit dem Fluorophor Tetramethylrhodamin-Methyl-Ester (TMRM) bestimmt, das in Abhängigkeit vom elektrischen Potential über der inneren mitochondrialen Membran akkumuliert [3]. Die Bestimmung der mitochondrialen NADH-Konzentration erfolgte mittels fluoreszenzmikroskopischer Messung der NADH-Autofluoreszenz nach Überprüfung von dessen Co-Lokalisation mit dem Mitochondrienfarbstoff MitoTracker Green. Zusätzlich quantifizierten wir die NADH-Konzentration biochemisch durch Verwendung eines NAD⁺/NADH-Assays. Alle Messungen erfolgten unter Ausgangsbedingungen bei einem CO_2 -Partialdruck (pCO_2) von 40 mmHg (Normokapnie) oder bei einem pCO_2 von <10 mmHg (Hypokapnie) und bei jeweils konstantem pH von 7,4. Zur Untersuchung der Rolle des NADH produzierenden Citratzyklusenzym Isocitrat-Dehydrogenase-1 (IDH-1) auf die Hypokapnie-induzierten Veränderungen von $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{Zyt}}$ bzw. $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{Mito}}$ sowie von $\Delta\psi$ und der NADH-Konzentration wurde die IDH-1 mittels Gen-knock down unter Verwendung von siRNA herunterreguliert. Der Erfolg dieser Methode wurde mittels rt-PCR und Western Blot überprüft. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm SEM angegeben.

Zur statistischen Analyse wurden der ANOVA on ranks- sowie Mann-Whitney Rank Sum Test angewandt.

Ergebnisse

Unter Ausgangsbedingungen lag $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{Zyt}}$ in AEC bei $91\pm 7\text{ nM}$. 10 Minuten nach Absenkung des pCO_2 auf <10 mmHg kam es zu einer Abnahme von $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{Zyt}}$ um $32\pm 5\%$ ($p<0,05$, $n=8$). Im Gegensatz dazu bewirkte die Hypokapnie eine Zunahme der mitochondrialen Rhod-2-Fluoreszenz um $128\pm 6\%$ vs. Ausgangsbedingung ($p<0,05$, $n=8$) sowie einen Abfall des CFP/YFP-Verhältnisses um $16\pm 3\%$ vs. Ausgangsbedingung ($p<0,05$, $n=5$) gleichbedeutend mit einem Anstieg von $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{Mito}}$. Zusätzlich induzierte die Hypokapnie einen Anstieg des Verhältnisses aus mitochondria-

ler und zytosolischer TMRM-Fluoreszenz um $121\pm 4\%$ vs. Ausgangsbedingung ($p<0,05$, $n=4$) und somit einen Anstieg von $\Delta\psi$. Im Gegensatz dazu reduzierte Rotenone ($50\mu\text{M}$), ein Inhibitor des Cytochrom 1-Komplexes, die TMRM-Ratio um $26\pm 2\%$ vs. Ausgangsbedingung ($p<0,05\%$, $n=5$), welche nach einer anschließenden Hypokapnieinduktion konstant blieb. Die Hypokapnie alleine änderte die mitochondriale NADH-Autofluoreszenz nicht. Jedoch führte die Hypokapnie nach Inhibition des NADH konsumierenden Enzyms Cytochrom 1 durch Rotenone ($50\mu\text{M}$) zur Steigerung der NADH-Autofluoreszenz um $217\pm 39\%$ vs. Ausgangsbedingung ($p<0,05\%$, $n=6$). Im biochemischen NADH-Assay lag die NADH-Konzentration unter Ausgangsbedingungen bei $3\pm 1\text{ nM}$, wohingegen jene nach Hypokapnie in Kombination mit Rotenone ($50\mu\text{M}$) auf $8\pm 1\text{ nM}$ anstieg ($p<0,05$, $n=8$). Darüber hinaus konnten die Hypokapnie-induzierten Antworten auf $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{Zyt}}$ $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{Mito}}$ $\Delta\psi$ sowie NADH-Konzentration durch den Gen-knock down der NADH produzierenden IDH-1 inhibiert werden ($p<0,05$ vs. Hypokapnie alleine, $n=5-8$). Die Transfektion der Zellen mit unspezifischer RNA hatte keinen Einfluss auf alle Hypokapnie-bedingten Antworten.

Interpretation

Eine alveoläre Hypokapnie führt unabhängig vom pH über einen negativen Feedback-Mechanismus zu einer Aktivierung des Citratzyklus in den Mitochondrien. Die dadurch verursachte Steigerung der NADH-Produktion induziert über eine Zunahme von $\Delta\psi$ einen Calcium-Shift vom Zytosol in die Mitochondrien. Der dadurch bedingte Abfall von $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{Zyt}}$ könnte dazu beitragen, dass im nicht-perfundierten Lungenareal die Ca^{2+} -abhängige Surfactantsekretion und nachfolgend die Ventilation inhibiert und darüber das Ventilation/Perfusions-mismatch verbessert werden.

Literatur

1. Swenson EW, et al: JCI 1961;40:828-835
2. Kiefmann R, et al: A&I 2009;50:434
3. Scaduto RC, et al: Biophys J 1999;76:469-477.

Das pulmonale Endothel registriert *S. pneumoniae* über ein Pneumolysin-vermitteltes Calcium-Signal – Gibt es Hinweise auf die Aktivierung von spezifischen Rezeptoren?

A. Mecklenburg¹ · A. Albrecht¹ · F. Gniech¹ · C. Olotu¹ · S. Hammerschmidt² · A.E. Goetz¹ · R. Kiefmann¹

- 1 Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
- 2 Institut für Genetik und Funktionelle Genomforschung, Ernst Moritz Arndt Universität Greifswald

Korrespondenz:

a.mecklenburg@uke.de

Fragestellung

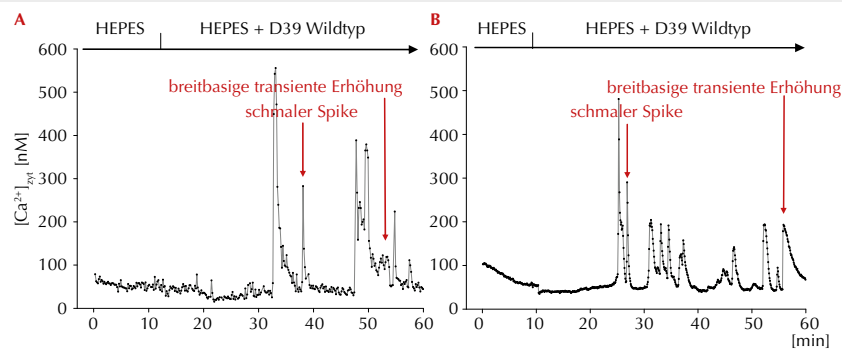
Invasive Infektionen mit *S. pneumoniae* können durch Schädigung des pulmonalen Endothels mit der Ausbildung eines akuten Lungenschadens einhergehen. Es ist bekannt, dass der Virulenzfaktor Pneumolysin (PLY) durch Porenbildung eine Zytolyse an den Wirtszellen induzieren kann [1]. Aktuelle Studien geben zusätzlich Hinweise auf eine differenzierte Regulation inflammatorischer Prozesse durch *S. pneumoniae* [2]. Hier soll die Frage beantwortet werden, ob und wie *S. pneumoniae* aktiv von pulmonalen Endothelzellen erkannt werden kann. Calcium spielt bei einer Vielzahl von Signalwegen als second messenger eine essentielle Rolle [3] und stand daher im Fokus unserer Untersuchungen.

Methodik

Die Lungen von männlichen Sprague-Dawley-Ratten wurden isoliert und bei konstanten arteriellen, venösen und alveolären Drücken von 7, 2 und 5 cmH₂O perfundiert und ventiliert. Subpleural gelegene Venolen wurden in situ mittels Epifluoreszenzmikroskopie untersucht. Über einen Mikrokatheter wurde HEPES-Puffer allein oder in Kombination mit 5x10⁵ CFU/ml *S.pneumoniae* bzw. 5 ng/ml PLY über 45 Minuten intrakapillär appliziert. Analog dazu wurden In-vitro-Versuche an konfluenten humanen pulmonalen mikrovaskulären Endothelzellen (HPMEC) durchgeführt. Bei den verwendeten Bakterienstämmen handelte es sich um D39Wildtyp,

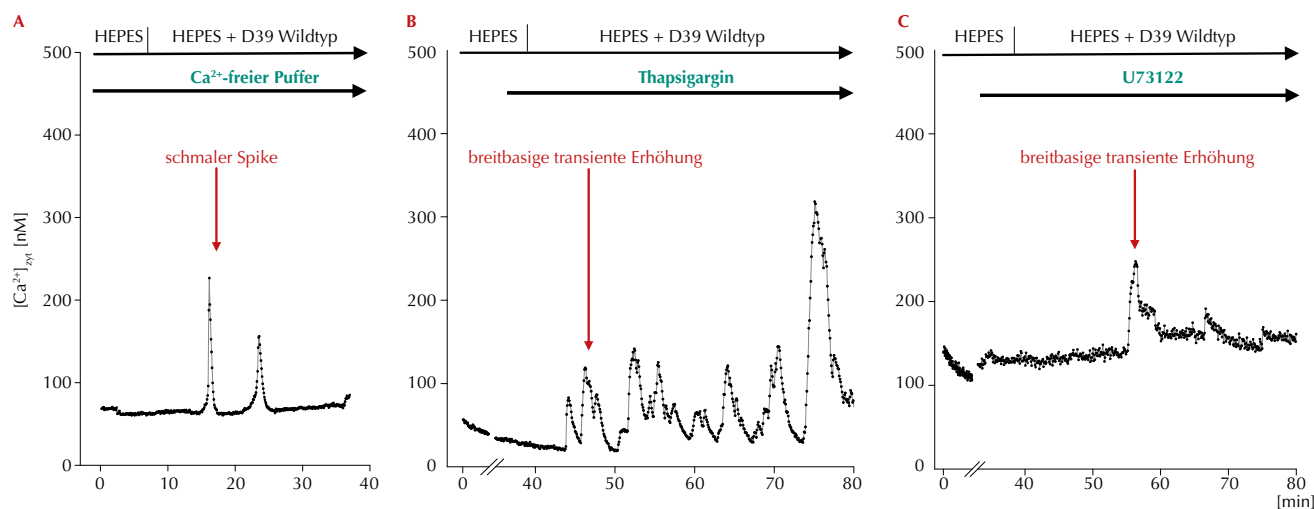
D39ACPS (Kapsel-defizient) und D39APLY (PLY-defizient). Isoliertes PLY wurde aus D39Wildtyp gewonnen. Die Quantifizierung der zytosolischen Calciumkonzentration [Ca²⁺]_{zyt} erfolgte mittels Fura-2 Ratio Imaging. In-vitro-Experimente wurden zudem in Ca²⁺-freien HEPES-Puffer, nach Vorinkubation mit 5 µM Thapsigargin (Inhibitor der Endoplasmatischen Retikulum (ER)-Ca²⁺-ATPase) oder 2 µM U73122 (Inhibitor der Phospholipase C (PLC)) bzw. dessen Kontrollsubstanz U73343 durchgeführt. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte±Standardabweichung angegeben, und die statistische Analyse erfolgte mittels Mann-Whitney Rank Sum Test mit einem Signifikanzniveau von p < 0,05.

Abbildung 1



Repräsentative Darstellung von [Ca²⁺]_{zyt} in Endothelzellen subkapillärer Venolen (A) und in HPMEC (B) vor und während der Applikation von D39Wildtyp in Ca²⁺-haltigen HEPES-Puffer.

Abbildung 2



Repräsentative Darstellung von [Ca²⁺]_{zyt} in HPMEC vor und während der Applikation von D39Wildtyp in Ca²⁺-freien HEPES-Puffer (A) und nach Vorinkubation mit Thapsigargin (B) bzw. U73122 (C).

Ergebnisse

Die intrakapilläre Applikation von D39Wildtyp [n=5] und D39ΔCPS [n=5] induzierte in situ Ca^{2+} -Oszillationen im Zytosol pulmonaler Endothelzellen mit einer maximalen $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ von 408 ± 94 bzw. 464 ± 193 nM vs. 141 ± 54 bzw. 131 ± 24 nM unter Ausgangsbedingungen ($p < 0,05$; Abb. 1A). Es war eine Unterscheidung in zwei Signalanteile möglich: schmale Ca^{2+} -Spikes (Oszillationsdauer < 3 min) und breitbasige transiente Ca^{2+} -Erhöhungen (Oszillationsdauer > 3 min). HEPES-Puffer allein [n=5] und D39ΔPLY [n=5] zeigten dagegen keine Veränderung der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$, wohingegen isoliertes PLY [n=8] wiederum ein Ca^{2+} -Signal mit einer maximalen $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ von 590 ± 206 vs. 86 ± 15 nM zu Ausgangsbedingungen ($p < 0,05$) induzierte.

Diese Ergebnisse waren in vitro reproduzierbar (Abb. 1B). Unter Ca^{2+} -freien Bedingungen induzierte D39Wildtyp zudem lediglich schmale Ca^{2+} -Spikes [n=9], im Gegensatz dazu nach Vorinkubation mit Thapsigargin [n=6] oder U73122 [n=4] (Abb. 2) breitbasige transiente Ca^{2+} -Erhöhungen.

Interpretation

Wir konnten zeigen, dass *S. pneumoniae* in pulmonalen Endothelzellen PLY-abhängig ein Ca^{2+} -Signal induziert, welches einerseits durch einen Ca^{2+} -Einstrom ins Zytosol von extrazellulär sowie andererseits unabhängig davon aus dem ER hervorgerufen wird. Letzterer wird vermutlich über eine Aktivierung der PLC vermittelt. Dies könnte darauf hinweisen, dass Endothelzellen pulmonaler Kapillaren

S. pneumoniae über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aktiv erkennen und so die Aktivierung einer spezifischen Signaltransduktionskaskade initiieren können. Die Beschreibung dieses Rezeptors und der funktionalen Bedeutung des Ca^{2+} -Signals könnte zu einem verbesserten Verständnis der Pathogenese lebensbedrohlicher invasiver Infektion der Lunge mit *S. pneumoniae* beitragen.

Literatur

1. Marriot HM, et al: Curr Mol Med 2008; 8(6):497-509
2. Lüttge M, et al: Cell Microbiol 2011; [im Druck]
3. Sandoval R, et al: J Physiol 2001;1;533 (Pt 2):433-45.

Der Neogeninrezeptor besitzt pro-inflammatorische Funktionen während einer akuten Entzündungsreaktion im Mausmodell

V. Mirakaj^{1,2} · K. König^{1,2} · T. Granja^{1,2} · D. Gatidou¹ · P. Rosenberger^{1,2}

1 Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin, Eberhard-Karls-Universität Tübingen

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

Korrespondenz:

valbona.mirakaj@klinikum.uni-tuebingen.de

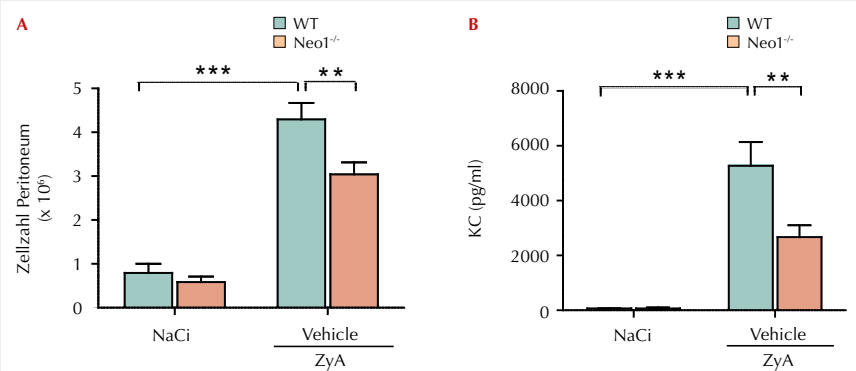
Fragestellung

Während der Frühphase einer akuten Entzündung kommt es zu einer Extravasation und Infiltration neutrophiler Granulozyten (PMN) in das betroffene Gewebsareal. Dieser Prozess wird vor allem durch Chemokine gesteuert, kann aber auch durch Neuronale Guidance-Proteine (NGP) beeinflusst werden [1,2]. Zwei wichtige Vertreter der NGP mit anti-inflammatorischer Funktion sind Netrin-1 und das Repulsive Guidance Molecule A (RGM-A) [2,3]. Im Zentralnervensystem vermitteln diese beiden Proteine ihre Funktion teilweise während der embryonalen Entwicklung durch den Neogeninrezeptor. Da die Funktion des Neogeninrezeptors während einer akuten Entzündungsreaktion aber bisher unbekannt ist, untersuchten wir in der vorliegenden Arbeit dessen Rolle bei einer experimentell induzierten, akuten Peritonitis.

Methodik

Die Tierversuchsgenehmigung des zuständigen Regierungspräsidiums lag vor. Die Expression von Neogenin in murinem Gewebe wurde mittels Rt-PCR, Western Blot und Immunhistochemie in vivo und in vitro untersucht sowie die Neogenin-Expression in Epithelzellen (CaCo) nach Stimulation mit TNF- α eruiert. In vivo wurde bei Wildtyp-Mäusen (WT; +/- anti-Neogenin Antikörper Injektion), Neogenin-Knockout-Mäusen (Neo1^{-/-}) und chimären Mäusen durch Zymosan-A (ZyA, 1 mg/ml, 1 ml/Maus i.p.) eine Peritonitis induziert. Die Rekrutierung inflammatorischer Zellen in den Peritonealraum wurde mittels Lavage (5ml NaCl 0.9%, 4°C) nach 8 Stunden bestimmt. Eine Aktivierung von NF- κ B durch den Neogeninrezeptor wurde durch Western-Blot-Analyse evaluiert. Zusätzlich wurde die Myeloperoxidase (MPO)-Aktivität, die

Abbildung 1



Nach Induktion einer durch Zymosan-A induzierten Peritonitis in WT- und Neo1^{-/-}-Mäusen wurde eine Peritoneallavage entnommen und **A**) die Zellzahl (x10⁶) und **B**) die Konzentration von KC (pg/ml) bestimmt (n=8 / Gruppe, *p<0.05, ***p<0.001).

Proteinkonzentration sowie die Konzentration von TNF- α , Interleukin-1 β , Interleukin-6 und keratinocyte-derived chemokine (KC) 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

Mittels Rt-PCR, Western Blot und Immunhistochemie konnte eine Expression von Neogenin im Gehirn sowie in der Lunge, Leber, Milz und Darm nachgewiesen werden. Die Stimulation mit TNF- α führte zu einem Anstieg der Neogenin-Expression in CaCo-Zellen. In vivo führte die Induktion einer akuten Peritonitis bei Neo1^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu Kontrolltieren zu einer signifikanten Reduktion der Zellzahl in der Peritoneallavage (Zellzahl x 10⁶: Neo1^{-/-} 3,02 \pm 0,3 vs. WT 4,3 \pm 0,4, p<0.05; n=8; Abb. 1A), der MPO-Aktivität und dem Proteingehalt. Auch die Konzentration der Zytokine war bei Neo1^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu WT-Tieren signifikant reduziert (KC pg/ml; Neo1^{-/-} 2657 \pm 446 vs. WT 5270 \pm 853, p<0.05; n=8; Abb. 1B). Die histologische Beurteilung des peritonealen Fettgewebes und des parietalen Peritoneums bestätigten die verminderte Entzündungsreaktion bei Neo1^{-/-}-Mäusen. Bei WT-Tieren wurde durch Blockade des Neogeninrezeptors mittels Antikörper die Entzündungsreaktion im Peritoneum signifikant reduziert.

Bei chimären Mäusen fand sich eine signifikante Reduktion der akuten Inflammation in der Gruppe mit hämatopoetischem Neo1^{-/-}-Phänotyp (Zellzahl x 10⁶: hämatopoetisch WT 6,30 \pm 0,53 vs. hämatopoetisch Neo1^{-/-} 2,915 \pm 0,419; KC pg/ml: hämatopoetisch WT 2951 \pm 523,9 vs. hämatopoetisch Neo1^{-/-} 1548,5 \pm 548,2; n=6).

Interpretation

Der Neogeninrezeptor besitzt pro-inflammatorische Funktionen während einer experimentell induzierten Peritonitis. Eine maßgebliche Rolle spielt dabei die hämatopoetische Komponente der Neogeninexpression. Durch Blockade des Neogeninrezeptors wird eine akute Entzündungsantwort im Peritoneum signifikant reduziert.

Literatur

- Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S: Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 11:519-531
- Mirakaj V, Laucher S, Mielke C, Morote-Garcia JC, Unertl KE, Rosenberger P: Netrin-1 dampens Pulmonary Inflammation during Acute Lung Injury. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2010; Apr 15;181(8):815-24
- Mirakaj V, Brown S, Laucher S, Steinl C, Klein G, Köhler D, Skutella T, Meisel C, Brommer B, Rosenberger P, Schwab JM, et al: Repulsive guidance molecule-A (RGM-A) inhibits leukocyte migration and mitigates inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 6555-6560.

Korrelation zwischen einer standardisierten oder gewichtsadaptierten Dosierung von Enoxaparin auf den Anti-Xa-Spiegel bei kritisch kranken Patienten

K. Morsbach¹ · G. Eichner² ·
A. Meier-Hellmann³ · S.N. Stehr¹

- 1 Klinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie, Universitätsklinikum Jena
- 2 Mathematisches Institut der Justus-Liebig-Universität Gießen
- 3 Klinik für Anästhesie, Intensivmedizin und Schmerztherapie, HELIOS Klinikum Erfurt

Korrespondenz:

sebastian.stehr@gmx.de

Fragestellung

Zur Reduktion des deutlich erhöhten Risikos einer Thrombose wird bei Intensivpatienten eine Thromboembolieprophylaxe (TP) durchgeführt. Es ist unlängst gezeigt worden, dass eine einmalige tägliche standardisierte Gabe von 40 mg Enoxaparin zusätzlich zu nicht-medikamentösen Methoden der TP nicht zu einer signifikanten Reduktion der Mortalität führt [1]. Eine signifikante Reduktion der Inzidenz von Thrombosen im Rahmen der TP mit niedermolekularen Heparinen wird durch einen Anti-Xa-Spiegel von $\geq 0,1$ U/ml erreicht. Wir untersuchten den Anti-Xa-Spiegel nach entweder standardisierter oder gewichtsadaptierter Gabe von Enoxaparin bei kritisch kranken Patienten.

Methodik

Diese unizentrische, prospektive Studie wurde durch die zuständige Ethikkommission und durch das Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte genehmigt und bei EudraCT (2005-005380-28) registriert. 80 Intensivpatienten mit klinischer Indikation zur TP und einem SAPS-II-Score von mindestens 35 Punkten wurden nach erfolgter Aufklärung balanciert in zwei Gruppen randomisiert. Eine Hälfte der Patienten erhielt Enoxaparin zum Zeitpunkt 0 in einer Standarddosierung (SDD) von 40 mg s.c., die andere Hälfte gewichtsadaptiert (GAD) mit 0,5 mg/kg Körpergewicht s.c. Zum Zeitpunkt 24 h wurden einmalig die Behandlungsregime gewechselt (Cross-Over-Design). Jeweils 12 h nach der Gabe von Enoxaparin wurden Serumproben entnommen und der Anti-Xa-Spiegel bestimmt (COAMATIC®Heparin, Fa. Chromogenix, Schweden [U/ml]). Die statistische Auswertung erfolgte mit R Version 2.13.2 (<http://www.R-project.org>).

Ergebnisse

80 Patienten wurden eingeschlossen (52 Männer und 28 Frauen). Die Behandlungsregime

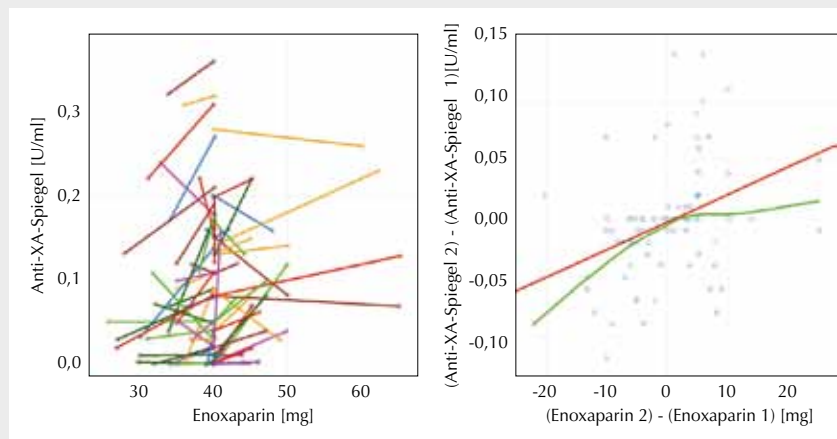
Tabelle 1

Auswahl signifikanter Parameter im Vergleich der nach Anti-Xa-Spiegel gruppierten Patienten.

| | Anti-Xa [U/ml] | Standarddosierung | Gewichtsadaptiert |
|-----------------|----------------|-------------------|-------------------|
| Quick [% ± SD] | <0,1 | 86,8 ± 20,1 | 86,8 ± 19,6 |
| | ≥0,1 | 100,6 ± 15,0* | 101,3 ± 15,5* |
| AT III [% ± SD] | <0,1 | 60,4 ± 16,4 | 61,1 ± 16,1 |
| | ≥0,1 | 80,7 ± 14,5* | 80,0 ± 16,4* |

(Mann-Whitneys-U-Test, * = $p < 0,05$ nach Holm-Adjustierung für multiples Testen).

Abbildung 1



Links: Intraindividuelle Profile der Beziehung zwischen Anti-Xa-Spiegel und Enoxaparin-Gabe für jeden der 80 Patienten. **Rechts:** Beziehung zwischen intraindividuellen Unterschieden im Anti-Xa-Spiegel und ebenso in der Enoxaparingabe.

Rot: einfache lineare Regressionsgerade (Steigung 0,0024; $p < 0,001$; Pearsonscher Korrelationskoeffizient: 0,375). **Grün:** eine nichtparametrische Glättungskurve.

unterschieden sich jeweils 12 h nach Enoxaparin nicht signifikant in den Anti-Xa-Spiegeln im intraindividuellen Vergleich (SDD Median 0,05 U/ml [1. & 3. Quartil: 0,01 bzw. 0,13], GAD 0,065 U/ml [1. & 3. Quartil 0,01 bzw. 0,125], Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtest $p = 0,905$). Nur 33,8% ($n = 27$) der Anti-Xa-Spiegel im Regime SDD und 32,5% ($n = 26$) im Regime GAD erreichten einen Wert über 0,1 U/ml. Bei den zugehörigen Patienten war sowohl im SDD- als auch im GAD-Regime der Quick- und der AT-III-Wert signifikant höher als bei Patienten mit einem Anti-Xa-Spiegel von $< 0,1$ U/ml (Tab.1). In der Korrelationsanalyse der intraindividuellen Unterschiede in der Enoxaparindosierung und in dem Anti-Xa-Spiegel zeigte sich eine signifikante Pearsonsche, d.h. lineare Korrelation (Abb. 1).

Über eine einfache lineare Regression der intraindividuellen Veränderung des Anti-Xa-Spiegels an der intraindividuellen Veränderung der Enoxaparindosierung zeigte sich folgender Zusammenhang: Eine Erhöhung

der Enoxaparindosis um 1 mg ging tendenziell mit einer Zunahme des Anti-Xa-Spiegels um 0,0024 U/ml (95% KI 0,0010 - 0,0037) einher.

Interpretation

Sowohl eine standardisierte als auch eine gewichtsadaptierte Dosierung von Enoxaparin führt nur bei einem Drittel der Intensivpatienten unseres Kollektivs zu einem ausreichenden Anti-Xa-Spiegel. Bei Patienten mit einem Anti-Xa-Spiegel $< 0,1$ U/ml findet sich ein signifikant erniedrigter AT-III- und Quick-Wert. Eine Berechnung des Anti-Xa-Zielspiegels mit der Formel $(\text{Anti-Xa-Ziel} - \text{Anti-Xa-ist}) / 0,0024$ erscheint möglich, jedoch darf aufgrund der quantitativ niedrigen Korrelation keine unkritische Übertragung in die Praxis erfolgen.

Literatur

1. Kakkar AK, et al: Low-molecular-weight heparin and mortality in acutely ill medical patients. N Engl J Med 2011;29;365(26):2463-72.

Reaktive Sauerstoffradikale in der Schmerzentscheidung bei Ratten

A. Neumann · D. Hackel · D. Pflücke · N. Roewer · A. Brack · H. Rittner

Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie, Universitätsklinikum Würzburg

Korrespondenz:

annickneumann@aol.com

Fragestellung

Schmerz ist ein Hauptsymptom der Entzündung. Die Bedeutung einzelner Leukozyten-subpopulationen für die Entstehung einer inflammatorischen Hyperalgesie ist weitgehend unbekannt. Durch lokale Injektion von Chemokinen können Leukozytenpopulationen selektiv rekrutiert und deren Relevanz für die Schmerzentscheidung untersucht werden. Die durch CXCL2/3 induzierte Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten führt zu keiner Änderung der Schmerzschwellen, während durch Rekrutierung von Monozyten mittels CCL2 (= MCP-1 monocyte chemoattractant protein-1) eine Hyperalgesie entsteht [1]. Hyperalgesie entsteht durch die bei Gewebeschädigung freigesetzten proalgetischen Mediatoren wie Bradykinin, Prostaglandine, reaktive Sauerstoffradikale (ROS) sowie Lipidperoxidationsprodukte (u.a. 4-Hydroxynonenal (4-HNE)). Wir postulieren, dass die CCL2-induzierte Hyperalgesie auf der Sekretion reaktiver Sauerstoffradikale aus Makrophagen und der Bildung von Lipidperoxidationsprodukten beruht.

Methodik

Mechanische und thermische nozizeptive Schwellen wurden nach intraplantarer Injektion des Chemokins CCL2 in Wistar- und Dark-Agouti (DA)-Ratten quantifiziert. DA-Ratten haben einen Defekt des für die ROS-Bildung verantwortlichen Enzyms, der NADPH-Oxi-

dase [2]. DA-Ratten haben in Verhaltensexperimenten geringere Schmerzschwellen und entwickeln nach Injektion von komplettem Freund'schen Adjuvans (CFA) ebenfalls eine inflammatorische Hyperalgesie. Im Gewebe wurden die rekrutierten Leukozytenpopulationen durchflusszytometrisch analysiert. Peritonealmakrophagen aus Wistar- und DA-Ratten wurden mit CCL2 stimuliert und die ROS-Produktion durchflusszytometrisch mit dem Farbstoff 123DHR quantifiziert. In Gewebeproben wurde der HNE-Gehalt mittels ELISA nach lokaler CCL2 Injektion gemessen. Verhaltensexperimente und biochemische Untersuchungen erfolgten erneut nach Leukozytendepletion (mittels Cyclophosphamid) sowie nach Gabe von Sauerstoffradikalfängern (TEMPOL) bzw. Blockade der ROS-Produktion (Catalase). Mit Genehmigung der zuständigen Tierschutzbehörden wurden die Versuche unter folgenden Protokollnummern durchgeführt. (Tierprotokoll: Landesamt für Gesundheit und Soziales, Berlin G0431/09, Regierung von Unterfranken 55.2-2531-01-22/10).

Ergebnisse

Nach intraplantarer Injektion von CCL2 war eine mechanische und thermische Hyperalgesie bei Wistar-, aber nicht bei DA-Ratten nachweisbar, die durch Leukozytendepletion vollständig blockierbar war (Abb. 1, * $p < 0,05$, ANOVA, $n = 6$, Mittelwert \pm Standardfehler). Durchflusszytometrisch war die Einwanderung von hauptsächlich Makrophagen und wenigen Neutrophilen nachweisbar. Peritonealmakrophagen aus Wistar- und DA-Ratten exprimieren den CCR2-Rezeptor, und CCL2 führt zur signifikanten Steigerung der ROS-Bildung (Abb. 2, repräsentatives Beispiel, $n = 12$). Intraplantare Injektion von CCL2 führt bei Wistar-, aber nicht bei DA-Ratten zu einer Zunahme von 4-HNE in der Pfote (Abb. 3,

* $p < 0,05$, verbundener t-Test, $n = 6$, normierte Daten, Mittelwert \pm Standardfehler). Die durch CCL2 induzierte Hyperalgesie ist dosisabhängig durch TEMPOL bzw. Catalase blockierbar (jeweils; * $p < 0,05$, Two-way-ANOVA RM, $n = 6$).

Interpretation

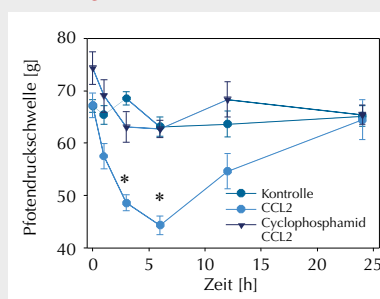
Diese Studie zeigt einen molekularen Link zwischen der Leukozytenrekrutierung und Induktion einer inflammatorischen Hyperalgesie. Das Chemokin CCL2 führt zur Rekrutierung von Monozyten, triggert die Bildung reaktiver Sauerstoffradikale in Makrophagen und führt zur Bildung von Lipidperoxidationsprodukten (4-HNE) im Gewebe. CCL2 induziert eine mechanische und thermische Hyperalgesie in Wistar-, aber nicht in DA-Ratten mit einem Gendefekt in der ROS-Bildung [2]. Reaktive Sauerstoffradikale und durch ROS entstehende Lipidperoxidationsprodukte aktivieren den TRPA1-Kanal und induzieren eine inflammatorische Hyperalgesie [3]. Reaktive Sauerstoffradikale aus Monozyten könnten sich daher als Target für die Therapie des Entzündungsschmerzes anbieten.

Gefördert durch das Interdisziplinäre Zentrum für klinische Forschung der Universität Würzburg (N-112).

Literatur

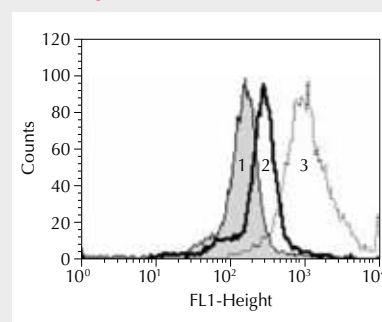
1. Rittner HL, et al: Selective local PMN recruitment by CXCL1- or CXCL2/3-injection does not cause inflammatory pain. *J Leukoc Biol* 2006;79(5):1022-32
2. Hultqvist M, Olofsson P, et al: A new arthritis therapy with oxidative burst inducers. *PLoS medicine* 2006;3(9):e348
3. Andersson DA, et al: Transient receptor potential A1 is a sensory receptor for multiple products of oxidative stress. *J Neurosci* 2008; 28(10):2485-2494.

Abbildung 1



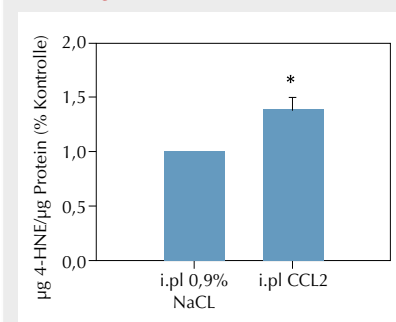
Verhaltensexperimente (Dr. D. Hackel)
CCL2-induzierte mechanische Hyperalgesie bei Wistar-Ratten ist durch vorherige Myeloablation aufhebbar.

Abbildung 2



FACS Histogramm, Peritonealmakrophagen (Wistar) bilden nach Stimulation mit CCL2 ROS. (1) Kontrolle, (2) CCL2, (3) PMA.

Abbildung 3



4-HNE ELISA, i.p.l. CCL2-Injektion in Hinterpfote erhöht die Bildung von Lipidperoxidationsprodukten bei Wistar-Ratten.

Einfluss zirkulierender mitochondrialer DNA auf Genexpression und Letalität bei Intensivpatienten

S.T. Schäfer^{1,2} · S. Frede² · S. Winning² · J. Walden¹ · N. Schönborn¹ · J. Fandrey² · A. Limmer³ · J. Peters¹ · M. Adamzik¹

- 1 Klinik für Anästhesiologie & Intensivmedizin,
- 2 Institut für Physiologie, Universitätsklinikum Essen
- 3 Institute of Molecular Medicine and Experimental Immunology, Universität Bonn

Korrespondenz:

simon.schaefer@uni-due.de

Fragestellung

Gewebeuntergang kann eine systemische Inflamationsreaktion auslösen, deren klinisches Erscheinungsbild der bakteriellen Sepsis ähnelt [1]. Wie kürzlich nachgewiesen, ist hieran auch mitochondriale DNA (mtDNA) beteiligt, die bei Gewebetrauma freigesetzt wird und z.B. Toll-like-Rezeptor 9 vermittelt, die Immunantwort mononukleärer Zellen verändern kann [2,3]. Es ist jedoch unklar, ob mtDNA auch bei Sepsis freigesetzt wird und ob diese einen Einfluss auf die Genexpression in mononukleären Zellen hat. Daher testeten wir die Hypothesen, dass die Serumkonzentration zirkulierender mtDNA 1) im Serum septischer sowie postoperativer Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden erhöht ist, 2) mit einer Änderung der mRNA-Expression des Hypoxie induzierbaren Faktors-1 α (HIF-1 α) assoziiert ist und 3) mit der 30-Tage-Letalität korreliert. Des Weiteren analysierten wir ob in vitro 4) eine Stimulation humaner Monozyten mit mtDNA ebenfalls eine Änderung der HIF-1 α mRNA Expression bewirkt.

Methodik

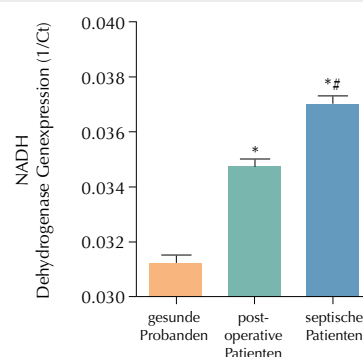
239 Patienten (135 Patienten mit Sepsis, 56 postoperative Patienten und 48 gesunde Probanden) wurden nach Billigung durch die Ethikkommission prospektiv eingeschlossen. Patientencharakteristika, klinische und laborchemische Variablen sowie der Schweregrad der Erkrankung (Simplified Acute Physiology Score II, SAPS II) wurden dokumentiert. Mitochondriale DNA wurde mittels alkoholischer Fällung aus Serum gewonnen und die Serumkonzentration der mitochondrialen Gene, Nicotinamidadenosindinucleotid (NADH) und Cytochrom C Oxidase III (Cyt C) sowie des mitochondrial und nukleär kodierten Gens Adenosintriphosphat Synthase beta (ATP Syn β) bestimmt (real time PCR; 1/ct-Werte). Der Einfluss von mtDNA auf die HIF-1 α -mRNA Expression wurde in humanen Monozyten (THP-1-Zellen) in vitro analysiert (real time PCR) und die Ergebnisse auf die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase-Expression

normiert (2^{- $\Delta\Delta\text{ct}$} -Werte). Statistik: Mittelwerte \pm Standardabweichung; Ein-Wege-ANOVA mit post-hoc Student's t-Test; Spearman-Korrelation; Binär logistische Regression, $p < 0,05$.

Ergebnisse

Bei septischen Patienten war die mtDNA-Serumkonzentration im Vergleich zu gesunden Probanden ca. 15-fach, bei postoperativen Patienten ca. 10-fach erhöht, wie anhand der 1/ct-Werte für NADH (septische Patienten: $0,0369 \pm 0,0045$, postoperative Patienten: $0,0363 \pm 0,0163$, gesunde Probanden: $0,0301 \pm 0,0017$; alle $p = 0,001$; Abb. 1) gezeigt werden konnte. Cyt C war bei septischen Patienten gegenüber postoperativen Patienten und gesunden Kontrollen ca. 8-fach erhöht (septische Patienten: $0,034 \pm 0,0037$; postoperative Patienten: $0,0301 \pm 0,0025$, gesunde Probanden: $0,032 \pm 0,002$; $p = 0,0001$ für septische Patienten vs. postoperative Patienten; $p = 0,01$ für septische Patienten vs. gesunde Probanden). Die Serumkonzentration des nukleär und mitochondrial kodierten Gens ATP Syn β war bei septischen Patienten jedoch nur leicht erhöht (septische Patienten: $0,0317 \pm 0,0036$; postoperative Patienten: $0,0310 \pm 0,0020$, gesunde Probanden: $0,0289 \pm 0,0006$; $p = 0,0001$ für postoperative und septische Patienten vs. gesunde Kontrollen, $p = \text{n.s.}$ für postoperative Patienten vs. septische Patienten). Hohe Serumkonzentrationen zirkulierender mtDNA waren mit einer Abnahme der HIF-1 α -mRNA-Expression in Leukozyten ($r^2 = 0,3$, $p = 0,0001$) assoziiert. Vor allem aber zeigte sich in der binär logistischen Regression, dass das Vorliegen von mtDNA im Serum ein unabhängiger Prädiktor für die

Abbildung 1



NADH Serumkonzentration (1/Ct-Werte) bei gesunden Probanden sowie postoperativen und septischen Patienten

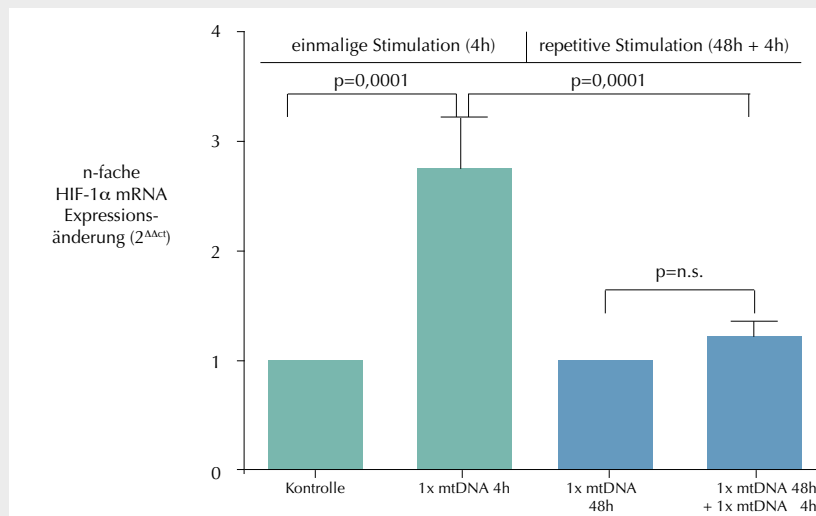
* $p = 0,001$ vs. gesunde Probanden
$p = 0,001$ vs. postoperative Patienten.

30-Tage-Letalität ist ($p < 0,005$). In vitro konnte ebenfalls ein Einfluss von mtDNA auf die HIF-1 α -mRNA-Expression nachgewiesen werden. Repetitiv mit mtDNA stimulierte humane Monozyten wiesen eine geringere HIF-1 α -mRNA-Expression als einmalig stimulierte Zellen auf ($p = 0,0001$; Abb. 2).

Interpretation

Wir konnten erstmals zeigen, dass mtDNA nicht nur bei Gewebetrauma, sondern auch bei Sepsis in die Blutbahn freigesetzt wird. Dies hat funktionelle Konsequenzen, da mtDNA die Genexpression in Leukozyten

Abbildung 2



HIF-1 α mRNA Expression in einmalig und repetitiv mit mitochondrialer DNA (mtDNA) inkubierten humanen Monozyten.

beeinflusst, wie anhand der Assoziation von NADH-Serumkonzentration und HIF-1 α -mRNA-Expression in vivo sowie bei Inkubation humaner Monozyten mit mtDNA in vitro gezeigt werden konnte. Vor allem ist mtDNA aber ein unabhängiger Prädiktor für die 30-Tage-Letalität. In weiteren Studien ist geplant, den zugrundeliegenden Pathomechanismus zu analysieren.

Literatur

1. Bone RC: Toward an epidemiology and natural history of SIRS (systemic inflammatory response syndrome). JAMA 1992;268:3452-5
2. Zhang Q, Raoof M, Chen Y, Sumi Y, Sursal T, Junger W, Brohi K, Itagaki K, Hauser CJ: Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. Nature 2010; 464:104-7
3. Hayashi F, Means TK, Luster AD: Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. Blood 2003;102: 2660-9.

Eine PAI-1-vermittelte überschießende Aktivierung der Gerinnung ist ein entscheidender Faktor für den sekundären Hirnschaden nach Schädel-Hirn-Trauma

E.-V. Schaible¹ · I. Petkovic¹ · M. Burek² · C. Förster² · N. Roewer² · C. Werner¹ · K. Engelhard¹ · S.C. Thal¹

¹ Klinik für Anästhesiologie, Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

² Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie, Universitätsklinikum Würzburg

Korrespondenz:

schaibev@uni-mainz.de

Fragestellung

Nach mechanischer Hirnschädigung führen multiple pathophysiologische Kaskaden innerhalb der ersten Stunden zum Untergang von gesundem Hirnparenchym. Neben neuroinflammatorischen Vorgängen könnten ischämische Prozesse entscheidend den Gewebeeruntergang nach Schädel-Hirn-Trauma (SHT) bewirken. Bereits zwei Stunden nach Trauma ist mittels Intravital-Mikroskopie eine erhöhte Rate von Thromben darstellbar [1]. Diese und andere Daten deuten darauf hin, dass nach SHT eine verstärkte Aktivierung der Gerinnung vorliegt. Wenig ist in diesem Zusammenhang über die Rolle der Fibrinolyse als Gegenspieler der Gerinnung bekannt. Diese gewinnt bei der Entstehung des sekundären Hirnschadens an Aktualität, da S3-Trauma-Leitlinien die Gabe des Antifibrinolytikums Tranexamsäure empfehlen. Eine überschießende Gerinnungsaktivierung wird unter physiologischen Bedingungen durch Plasmin kontrolliert, welches Fibrin-Netze von Blutgerinnseln spaltet. Der zentrale Faktor Plasmin wird durch Abspaltung aus Plasminogen freigesetzt und aktiviert. Diese Aktivierung wird von den Serin-Protease-Inhibitoren Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-Typ 1 und 2 (PAI-1/2) negativ reguliert, welche die gewebespezifischen und Urokinase-Plasminogenaktivatoren inhibieren. Die vorliegende Studie untersucht die Regulation von PAI-1/2 sowie deren Rolle bei der Entstehung von Mi-

krothromben und der Expansion des sekundären Hirnschadens nach experimentellem SHT im Mausmodell.

Methodik

Nach Genehmigung durch das Landesuntersuchungsamt Koblenz wurden Isofluran anästhesierte männliche Mäuse randomisiert einer pneumatischen kontrollierten kortikalen Kontusion (controlled cortical impact [CCI]) unterzogen. Die PAI-1/2-mRNA-Expression wurde mittels real-time Polymerase-Kettenreaktion in Hirngewebe von C57Bl/6N-Mäusen quantifiziert (nativ, 15 min, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h nach CCI; je n=6). Der Einfluss der Fibrinolyse auf den sekundären Hirnschaden (Nissl-Färbung) und die neurologische Funktion wurde 24 h nach CCI mittels pharmakologischer Hemmung durch Tranexamsäure (0,25 g/kg KG s.c., 30 min nach CCI) bzw. Aktivierung durch PAI-1-Inhibitor PAI-039 (1 mg/kg KG s.c., 30 min und 6 h nach CCI) untersucht, und anschließend wurden die Ergebnisse mit PAI-1^{-/-}, PAI-2^{-/-} und Wildtyp (WT)-Mäusen (je n=9) verifiziert. Die Primärläsion (je n=7) wurde 15 min nach CCI evaluiert. In PAI-1 inhibierten bzw. defizienten Mäusen sowie deren Vergleichsgruppen wurden die zerebrale Inflammation (TNF- α , IL1- β) gemessen und die perikontusionale Gerinnselbildung (CD31/CD41-Färbung) mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie dargestellt.

Statistik

Die Nullhypothese wurde mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit von unter 5% abgelehnt. Die mRNA-Expression wurde mittels Varianzanalyse, die Kontusionsvolumina und die neurologische Funktion wurden mit Wilcoxon-Mann-Whitney-Test analysiert und die p-Werte nach Bonferroni-Holm für multiples Testen korrigiert.

Ergebnisse

Die PAI-1-mRNA-Expression steigt nach 3 Stunden um das 4-fache mit einer 360-fachen maximalen Erhöhung 12 Stunden nach Trauma ($p<0,05$). Die PAI-2-mRNA-Expression zeigt ihren maximalen 86-fachen Anstieg ebenfalls 12 Stunden nach Trauma ($p<0,05$).

Nach Tranexamsäuregabe vergrößert sich das Läsionsvolumen um 25% ($p=0,038$; Abb. 1), wohingegen eine periphere PAI-1-Inhibition mittels PAI-039 dieses um 26% verringert ($p=0,005$; Abb. 2). Das Kontusionsvolumen ist bei PAI-1-defizienten Mäusen ebenfalls minimiert ($p=0,042$; Abb. 3), wohingegen PAI-2-defiziente Mäuse keinen Unterschied zum Wildtyp aufweisen. TNF- α und IL1- β steigen über die Zeit an ($p<0,05$), weisen jedoch ebenso wie die neurologische Funktion keinen Unterschied zwischen den Gruppen auf. Immunhistochemisch sind perikontusionale mehr Mikrothromben in den Vehikel- sowie Wildtypgruppen gegenüber PAI-1-inhibierten bzw. -defizienten Mäusen zu visualisieren.

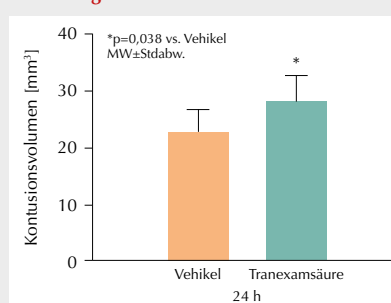
Interpretation

Die Ergebnisse deuten auf eine PAI-1-vermittelte posttraumatische Inhibition der Fibrinolyse hin, welche den sekundären Hirnschaden durch Mikrothrombenbildung verstärkt. Obwohl die PAI-1- und PAI-2-mRNA-Expression nach Trauma stark ansteigt, bewirken lediglich die PAI-1-Inhibition sowie -Defizienz eine verringerte Thrombusbildung und Reduktion des Schadens. PAI-2 spielt somit für die posttraumatische Dysregulation der Gerinnung eine nur untergeordnete Rolle. Da die Daten die Annahme unterstützen, dass Mikrothromben eine perikontusionale Perfusionstörung hervorrufen, und eine Expressionssteigerung von PAI-1 auch in humanem Gewebe nach SHT gezeigt werden konnte [2], könnte der sekundäre Hirnschaden durch undifferenzierte Gabe eines Antifibrinolytikums bei isoliertem SHT ohne Blutungskomplikation verstärkt werden.

Literatur

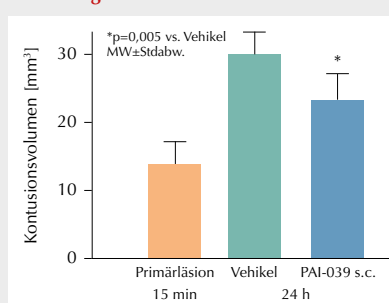
- Schwarzmaier SM, et al: Temporal profile of thrombogenesis in the cerebral microcirculation after traumatic brain injury in mice. J Neurotrauma 2010;27:121-130
- Dietzmann K, et al: Expression of the plasminogen activator system and the inhibitors PAI-1 and PAI-2 in posttraumatic lesions of the CNS and brain injuries following dramatic circulatory arrests: an immunohistochemical study. Pathol Res Pract 2000;196:15-21.

Abbildung 1



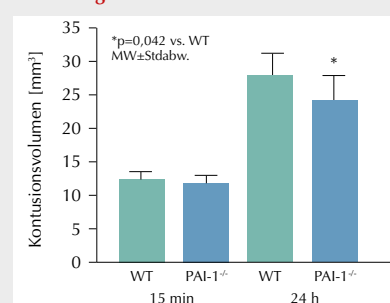
Hemmung der Fibrinolyse mittels Tranexamsäure.

Abbildung 2



Aktivierung der Fibrinolyse mittels PAI-1-Inhibitor PAI-039.

Abbildung 3



PAI-1-Defizienz (PAI-1^{-/-}) versus Wildtyp (WT).

Therapeutische Inhalation von Kohlenmonoxid hemmt den Ischämie-Reperfusions-Schaden retinaler Ganglienzellen der Ratte

N. Schallner¹ · T. Loop¹ · H. Bürkle¹ · W. A. Lagrèze² · J. Biermann² · U. Göbel¹
1 Anästhesiologische Universitätsklinik Freiburg
2 Universitäts-Augenklinik Freiburg

Korrespondenz:
nils.schallner@uniklinik-freiburg.de

Fragestellung

Ein cerebraler Ischämie-Reperfusions (I/R)-Schaden im Rahmen eines Schlaganfalls führt durch Inflammation und Apoptose auf Grund des geringen regenerativen Potentials neuronaler Organe zu irreversiblen Schädigungen und erhöht die perioperative Mortalität [1]. Die inhalative Präkonditionierung mit Kohlenmonoxid (CO) kann neuronale Zellen in der Retina vor einem solchen I/R-Schaden schützen [2]. Für eine potentielle klinische Anwendung von CO ist die inhalative CO-Applikation nach einer neuronalen Ischämie von großer Relevanz, aber bisher nur unzureichend untersucht [3]. Wir haben die Hypothese aufgestellt, dass die inhalative Applikation von CO nach einer Ischämie protektiv auf neuronale Ganglienzellen (RGZ) der Ratte wirkt.

Methodik

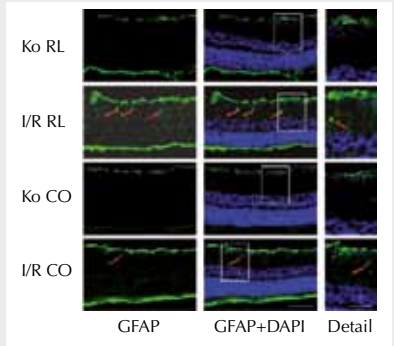
Nach Genehmigung durch das Regierungspräsidium erfolgte bei Sprague-Dawley-Ratten (n=8 pro Gruppe) die Induktion eines retinalen I/R-Schadens durch Erhöhung des intra-

okulären Drucks auf 120 mmHg für 1 h. CO wurde in einer luftdichten Box (Gasgemisch aus synthetischer Luft +250 ppm CO, 1 h) appliziert und die Konzentration kontinuierlich kontrolliert (MX6 iBRID™ Gasmessgerät). Retinales Gewebe für die Analyse der mRNA (RT-PCR) und Protein-Expression (Western Blot) von Bcl-2, Bax, Caspase-3, Hämoxxygenase-1 (HO-1), Hitzeschockprotein-70 (HSP-70) und der Phosphorylierung des nukleären Transkriptionsfaktors (NF)-κB und der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen p38 und ERK-1/2 (Western Blot) wurde nach 12, 24, 48 und 72 h gewonnen. Die DNA-Bindungsaktivität von NF-κB und Hitzeschockfaktor-1 (HSF-1) wurde mittels „bandshift assay“ (EMSA) analysiert. Die Quantifizierung der RGZ-Dichte erfolgte nach vorheriger retrograder In-vivo-Fluorogold-Anfärbung 7 Tage nach dem I/R-Schaden mittels Fluoreszenz-Mikroskopie. Histologisch analysierten wir die Gliazellaktivierung (GFAP-Färbung) und die Phosphorylierung von ERK-1/2. Die In-vivo-Inhibition von ERK-1/2 erfolgte durch den spezifischen Inhibitor PD98059 (2 mg/kg i.v.). Die Daten wurden mittels Varianzanalyse (two-way ANOVA mit post-hoc Holm-Sidak Test, Signifikanzniveau p<0,05) verglichen.

Ergebnisse

Die Inhalation von CO nach der Ischämie inhibierte die Gliazell-Aktivierung (Abb. 1). CO hemmte die Phosphorylierung (Tab. 2) und DNA-Bindung von NF-κB. Die Expression des Proteins Bax wurde inhibiert, die Expression von Bcl-2 wurde induziert (Tab. 1 und 2). CO unterdrückte die Caspase-3-Expression (Tab. 1) und -Spaltung (Tab. 2). Weiterhin wurde

Abbildung 1



Exemplarische histologische Einzelaufnahmen nach GFAP- und DAPI-Färbung mit Darstellung der Gliazell-Aktivierung.

Ko=Kontrolle; RL=Raumluft; I/R=Ischämie/Reperfusion; CO=Kohlenmonoxid; Maßstabsbalken 100 (Bilder) bzw. 50 µm (Detail).

die DNA-Bindung von HSF-1 und die Expression von HSP-70 (Tab. 1) und von HO-1 (Tab.1 und 2) gehemmt. Die Phosphorylierung von p38 wurde durch CO unterdrückt, wohingegen die ERK-1/2-Phosphorylierung durch CO induziert wurde (Tab. 2). Histologische Doppelfärbungen für phospho-ERK-1/2 und Thy-1, einen neuronalen Zellmarker, zeigten eine CO-vermittelte ERK-1/2-Phosphorylierung vorrangig in der retinalen Ganglienzellschicht. Die CO-Applikation nach der retinalen Ischämie verhinderte in vivo die durch den I/R-Schaden bedingte Abnahme der RGZ-Dichte (Abb. 2). Die Inhibition von ERK-1/2 hob diesen CO-vermittelten Schutz nicht auf (Abb. 2).

Tabelle 1

Relative mRNA-Induktion in I/R-geschädigtem retinalem Gewebe gegenüber Kontrollgewebe (kontralaterales Auge) von CO- und RL-behandelten Tieren 12 h und 24 h nach I/R-Schaden.

| | Caspase-3 | | Bax | | Bcl-2 | | HO-1 | | Hsp-70 | |
|--------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-----------|-----------|------------|-----------|
| | 12 h | 24 h | 12 h | 24 h | 12 h | 24 h | 12 h | 24 h | 12 h | 24 h |
| I/R RL | 2,0 ± 0,26 | 1,9 ± 0,29 | 1,9 ± 0,33 | 1,5 ± 0,29 | 1,2 ± 0,21 | 1,11 ± 0,12 | 158 ± 107 | 3,8 ± 2,1 | 6,5 ± 4,3 | 1,2 ± 0,2 |
| I/R CO | 1,5 ± 0,13* | 1,2 ± 0,17* | 1,4 ± 0,21* | 1,2 ± 0,12* | 1,6 ± 0,28* | 1,5 ± 0,25* | 52 ± 46* | 2,6 ± 1,3 | 2,1 ± 0,8* | 1,2 ± 0,3 |

Mittelwert ± Stabw, n=8; * = p<0,05 I/R RL vs. I/R CO.

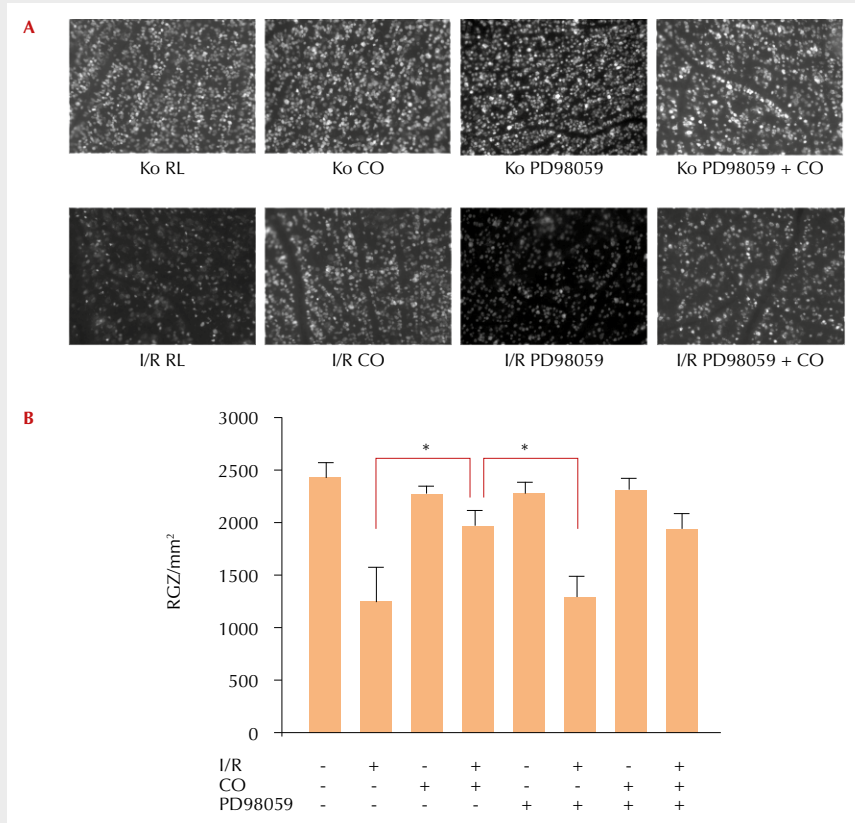
Tabelle 2

Relative Protein-Induktion in I/R-geschädigtem retinalem Gewebe gegenüber Kontrollgewebe (kontralaterales Auge) von CO- und RL-behandelten Tieren 24 h und 48 h nach I/R-Schaden; densitometrische Western-Blot-Analyse.

| | phospho-NF-κB | | Bax | | Bcl-2 | | cleaved Caspase-3 | | HO-1 | | phospho-p38 | | phospho-ERK1/2 | |
|--------|---------------|------------|-------------|-------------|------------|-------------|-------------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|----------------|-------------|
| | 24 h | 48 h | 24 h | 48 h | 24 h | 48 h | 24 h | 48 h | 24 h | 48 h | 24 h | 48 h | 24 h | 48 h |
| I/R RL | 1,5 ± 0,20 | 1,0 ± 0,15 | 1,2 ± 0,13 | 1,4 ± 0,16 | 1,1 ± 0,09 | 0,9 ± 0,06 | 1,9 ± 0,34 | 1,6 ± 0,05 | 1,4 ± 0,17 | 2,2 ± 0,14 | 1,7 ± 0,18 | 2,0 ± 0,47 | 1,2 ± 0,28 | 1,9 ± 0,38 |
| I/R CO | 0,9 ± 0,03* | 1,0 ± 0,04 | 0,9 ± 0,33* | 1,1 ± 0,10* | 1,1 ± 0,07 | 1,2 ± 0,06* | 1,3 ± 0,18* | 1,1 ± 0,25* | 1,1 ± 0,11 | 1,3 ± 0,18* | 1,2 ± 0,17* | 1,1 ± 0,29* | 2,7 ± 0,25* | 4,7 ± 1,22* |

Mittelwert ± Stabw, n=8; * = p<0,05 I/R RL vs. I/R CO.

Abbildung 2



Exemplarische Einzelaufnahmen (A) und Quantifizierung (B) der FG-markierten retinalen Ganglienzellen. n=8 pro Gruppe, 12 systematische Einzelaufnahmen pro Retina; Quantifizierung als retinale Ganglienzellen (RGZ) pro mm².

Mittelwert ± Standardabweichung, *p<0,05 I/R vs. I/R CO und I/R CO vs. I/R PD98059.

Interpretation

Die therapeutische Inhalation von CO nach einer retinalen Ischämie wirkt durch Inhibition der Gliazell-Aktivierung und differentielle Regulation zahlreicher inflammatorischer und apoptotischer Signalwege neuroprotektiv auf retinale Ganglienzellen der Ratte. Die CO-vermittelte Aktivierung des ERK-1/2-Signaltransduktionsweges scheint nicht der molekulare Mechanismus der CO-vermittelten Neuroprotektion zu sein, da eine Inhibition von ERK-1/2 die CO-vermittelte Protektion in vivo nicht aufzuheben vermag.

Literatur

1. Anesthesiology 2011;114:1289-96
2. Invest Ophthalmol Vis Sci 2010;51:3784-91
3. Neurotox Res 2009;15:133-7.

BDA BERUFSVERBAND
DEUTSCHER
ANÄSTHESISTEN

BDA-App

Um die vielen verfügbaren verbandspolitischen Informationen in Zukunft noch effektiver kommunizieren zu können, steht neben den etablierten Werkzeugen nun auch eine BDA-App für Smartphones zur Verfügung.

Die Links zum Download für iPhone/iPad und Android finden Sie unter:

www.bda.de



[Für iPhone und iPad](#)

Erhältlich im
App Store

[Für Android Smartphones](#)

Available in
Android
Market

Der inflammatorische Zusammenbruch der intestinalen Epithelbarriere in vivo und in vitro ist cAMP/RhoA-abhängig

M. A. Schick¹ · N. Schlegel² · W. Baar¹ · M. Meir² · S. Flemming² · N. Roewer¹ · C. Wunder¹

- 1 Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie, Universitätsklinikum Würzburg
- 2 Chirurgische Klinik und Poliklinik I, Universitätsklinikum Würzburg

Korrespondenz:

Schick_M@klinik.uni-wuerzburg.de

Fragestellung

Der Pathomechanismus des Zusammenbruches der intestinalen Epithelbarriere (IEB) bei kritisch Kranken ist weitestgehend ungeklärt. Vorarbeiten lieferten indirekte Hinweise dafür, dass Veränderungen des zyklischen Adenosinmonophosphates (cAMP) in Enterozyten eine wichtige Rolle bei der inflammatorischen Destruktion der IEB spielt. Ziel der aktuellen Studie war es, den Mechanismus der entzündungsinduzierten Destruktion der IEB zu charakterisieren, indem wir eine mögliche Rolle von cAMP und dessen Beeinflussung der Signaltransduktion durch die RhoGTPasen Rac1 und RhoA untersuchten [1].

Methodik

Nach behördlicher Genehmigung wurden männliche Sprague-Dawley-Ratten mit einer Kombinationsnarkose (Isofluran 0,6-0,8 Vol%, Midazolam 0,7 mg/100g KG/h und Fentanyl 7µg/100g KG/h i.v.) anästhesiert und instrumentiert (ZVK, invasive Blutdruck-, HZV-Messung, Tracheotomie und kontrollierte Beatmung) [2]. Die Tiere wurden in drei Gruppen (je n=6) randomisiert: Kontrolle (K), LPS, LPS+Phosphodiesterase-4-Inhibitor (PD-4-I). Die Kontrolle blieb unbehandelt, wohingegen den anderen Gruppen 0,5 mg/100g KG LPS i.v. appliziert wurden. Zur cAMP-Erhö-

hung erhielten Tiere der Gruppe LPS+PD-4-I 5 min vor LPS-Gabe einen i.v. Bolus von 3 mg/kg PD-4-I Rolipram und anschließend 0,04 µg/100g KG/h. Für die funktionelle Messung der intestinalen Barrierefunktion wurden die Tiere nach 2h laparotomiert, ein 7 cm langes Ileumstück zweifach ligiert, gespült und intraluminal 10 mg 4 kD FITC-Dextran injiziert. Nach 1h wurden den Tieren Blut entnommen und der FITC-Dextran-Gehalt im Serum mittels photometrischer Bestimmung analysiert. In unserem Zellkulturmodell der Darmbarriere an differenzierten humanen Caco-2-Zellen erfolgten immunhistochemische Untersuchungen der junctionalen Proteine E-Cadherin, Claudin 1,5 und Occludin, sowie Färbungen des Actin-Zytoskelettes. Permeabilitätsveränderungen wurden durch Messungen des 4 kD FITC-Dextran-Flux über den Caco-2-Zellen unter Kontrollbedingungen, nach Behandlung mit jeweils 100 ng/ml LPS oder TNF, sowie in Kombination mit 10 µMol des PD-4-I durchgeführt [2]. Danach erfolgten ELISA-basierte Messungen von cAMP-Spiegeln sowie Bestimmungen der Aktivitäten von RhoA und Rac1. Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test und Varianzanalyse (ANOVA mit post hoc n. Duncan, p<0,05; mean±SD).

Ergebnisse

In unserem In-vivo-Modell der systemischen Inflammation führte die Applikation von LPS zu einer signifikanten Erhöhung der FITC-Dextrankonzentrationen im Serum im Vergleich zu den Kontrollen (K 0,3±0,1; LPS 10,5±6,7 [µg/ml]), was einen Zusammenbruch der IEB nach LPS-Behandlung zeigt. Dagegen führte die Behandlung mit dem PD-4-I zu einer signifikanten Verminderung des Permeabilitätsanstiegs (2,4±3,6 [µg/ml]) nach LPS-Gabe. Morphologisch konnte anhand von immunhistologischen Untersuchungen des Darms ein Ausbleiben der Umverteilung der Tight Junction Proteine Claudin 1,5 und des Adherens Junction Proteins E-Cadherin an den Zellgrenzen in der PD-4-I

Gruppe im Vergleich zu LPS nachvollzogen werden. Permeabilitätsmessungen an unserem In-vitro-Modell der Darmbarriere zeigten einen signifikanten Anstieg der Permeabilität nach Inkubation mit LPS (2,84±0,33 [cm/s*10⁻⁶]) und TNF-α (7,75±2,74 [cm/s*10⁻⁶]) vs. K (1,89±0,19 [cm/s*10⁻⁶]). Dies konnte auch in vitro durch den PD-4-I (LPS+PD-4-I 2,24±0,26 [cm/s*10⁻⁶]; TNF-α+PD-4-I 3,40±0,27 [cm/s*10⁻⁶]) vermindert werden. Ebenso konnte die Inkubation der Caco2-Zellen mit PD-4-I die LPS und TNF-α beobachteten Veränderungen der Tight- und Adhärensjunctionen verhindern. Es zeigten sich keine signifikanten Veränderungen der intrazellulären cAMP-Spiegel bei den Caco2-Zellen. Während ebenfalls keine Veränderungen der Aktivität von Rac1 durch TNF-α stattfand, beobachteten wir eine signifikante Erniedrigung der RhoA-Aktivität (85±8% der K). Diese Reduktion wurde durch Applikation des PDI-4-I (91±6% der K) gehemmt.

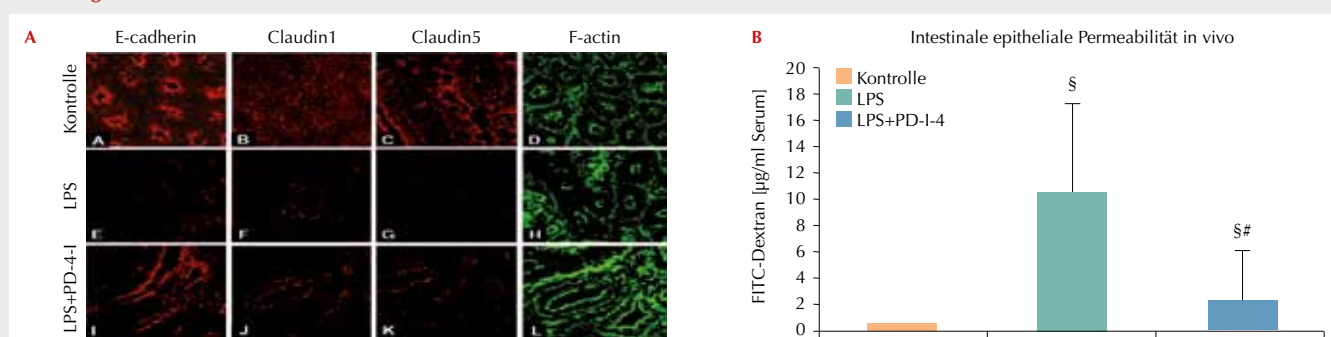
Interpretation

Zusammenfassend zeigen unsere Daten, dass der in vivo beobachtete protektive Effekt des PD-4-Inhibitors auf die Darmbarriere durch direkte Effekte an Enterozyten induziert wird. Ein globaler Abfall des cAMP-Spiegels in den Enterozyten konnte nicht nachvollzogen werden, wohingegen der beobachtete Abfall der RhoA-Aktivität cAMP-abhängig zu sein scheint. Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass der entzündungsinduzierte Zusammenbruch der Darmepithelbarriere durch eine RhoA-Inaktivierung in den Enterozyten induziert wird.

Literatur

1. Schlegel N, Waschke J: VASP is involved in cAMP-mediated Rac 1 activation in microvascular endothelial cells. *AJ Physiol Cell Physiol* 2009;296(3):453-62
2. Schick MA, Isbary TJ, Schlegel N, Brugger J, Waschke J, Muellenbach R, Roewer N, Wunder C: The impact of crystalloid and colloid infusion on the kidney function in rodent sepsis. *ICM* 2010;36(3):541-8.

Abbildung 1



A) Immunhistochemische Darstellung der Zell-Zell-Kontakte des Ileums der Ratte. B) Darstellung des FITC-Dextran-Efflux bei intakter (Kontrolle) oder geschädigter (LPS) Darmbarriere. PD-4-I konnte die LPS-Schädigung signifikant verbessern (p<0,05; § vs. Kontrolle; # vs. LPS).

Aktive, flusskontrollierte Expiration reduziert das pulmonale Ödem und verbessert die Atemmechanik bei beatmeten Schweinen mit Ölsäure-induziertem Lungenschaden

J. Spaeth¹ · C. Dassow¹ · J. Guttman¹ · J. Haberstroh² · K. Förster² · S. Schumann¹ · U. Goebel¹

¹ Anästhesiologische Universitätsklinik und
² Experimentelle Chirurgie, BioMed Zentrum, Freiburg

Korrespondenz:

johannes.spaeth@uniklinik-freiburg.de

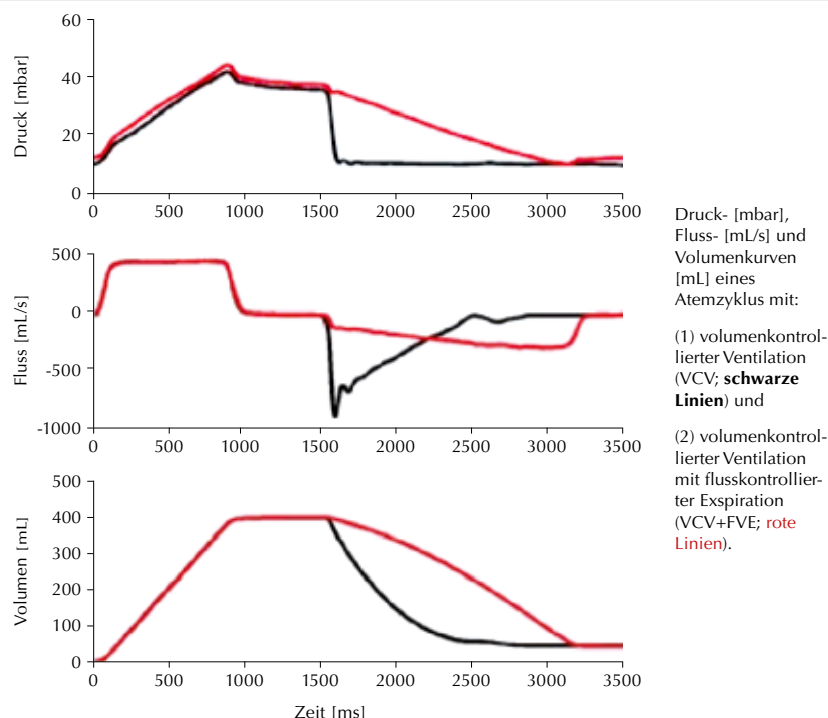
Fragestellung

Die kontrollierte mechanische Beatmung besteht aus einer aktiven, respiratorgesteuerten Inspiration und einer passiven Expiration. Während das inspiratorische Atemmuster durch diverse Inspirationsmodi vom Respirator aktiv beeinflusst wird, gilt die passive Expiration mit exponentiellem Abfall von Fluss und Volumen bisher geradezu als Paradigma der mechanischen Beatmung [1]. Allenfalls die Einstellung des positiven end-expiratorischen Druckes (PEEP) führt zu Veränderungen der Expiration, ohne allerdings die Charakteristik der passiven Expiration anzutasten [2]. Wir haben die Hypothese aufgestellt, dass die aktive Kontrolle der Expiration durch eine Modifikation des expiratorischen Flussprofils (flusskontrollierte Expiration; FCE) den Kollaps der Atemwege und die Bildung eines pulmonalen Ödems im Modell des akuten Lungenversagens beim mechanisch beatmeten Schwein reduziert und den Lungenschaden verringert.

Methodik

Nach Genehmigung durch das Regierungspräsidium Freiburg wurden Schweine (n=15; Deutsche Landrasse, 62±5 kg) mit Fentanyl und Propofol anästhesiert, mit Vecuronium relaxiert und kontrolliert beatmet (FiO₂=0,21, PEEP=8 cm H₂O, V_T=7-8 ml/kg, f/min=14). Die Überwachung der Hämodynamik erfolgte nach Anlage eines arteriellen Katheters (A. carotis communis), eines Zentralvenenkatheters (V. jugularis externa) und eines Swan-Ganz-Katheters. Die Induktion des Lungenversagens erfolgte durch i.v. Applikation von Ölsäure (1-2 ml/kg KG über eine Stunde), bis ein Horowitz-Quotient (PaO₂/FiO₂) von weniger als 200 erreicht war. Die Tiere wurden 2 Gruppen zugeordnet: volumenkontrollierte Ventilation (VCV, n=8) und volumenkontrollierte Ventilation mit flusskontrollierter Expiration (VCV+FCE, n=7). Die Parameter der Hämodynamik, der Atemmechanik und des Gasaustausches wurden kontinuierlich über den gesamten Versuchszeitraum aufgezeichnet. Am Ende des Experiments wurden die Tiere durch intravenöse Kaliumgabe getötet und die Lungen zur Gewinnung von Gewebe-

Abbildung 1



proben entnommen. Aus den Gewebeproben wurden histologische Präparate angefertigt und Nass- und Trockengewichtsdifferenzen bestimmt. Die über den Zeitraum von 0-6 h erfassten seriellen Messwerte der jeweiligen Parameter wurden zunächst nach der Methode der „summary measures“ aufbereitet und die Mittelwerte zwischen den Gruppen mittels Mann-Whitney-U-Test verglichen (Signifikanzwert $p < 0,05$).

Ergebnisse

Das Ausmaß des Lungenschadens war während des gesamten Versuches bei allen Tieren – gemessen am Horowitz-Quotienten – konstant. In der VCV+FCE-Gruppe war gegenüber der VCV-Gruppe ein zur analogen Oxygenierung notwendiger PEEP signifikant niedriger (12±2 vs. 9±2 cm H₂O; $p=0,029$). Die dynamische Compliance des respiratorischen Systems war in der VCV+FCE-Gruppe signifikant höher als in der VCV-Gruppe (22,4±3,8 vs. 18,3±1,7 ml/cm H₂O; $p=0,006$). Verglichen mit der VCV-Gruppe ergaben die Messungen des mittleren pulmonal-arteriellen Druckes (MPAP) und des pulmonal-kapillären Verschlussdruckes (PCWP) signifikant niedrigere Werte in der VCV+FCE-Gruppe ([MPAP] 40±4 vs. 34±4 mmHg; $p=0,029$; [PCWP] 11±1 vs. 9±1 mmHg; $p=0,009$). Das Verhältnis von Nass- zu Trockengewicht als quantitatives Maß für das pulmonale Ödem war in der VCV+FCE-Gruppe sowohl in den

ventralen als auch in den dorsalen Lungenanteilen gegenüber der VCV-Gruppe signifikant reduziert ($p < 0,001$). Histomorphologische Kriterien (inflammatorische Zellen, alveoläre Hämorrhagie und Ödembildung) zeigten eine signifikant geringere Lungenschädigung in der VCV+FCE-Gruppe (4,9±0,1 vs. 2,6±0,1, $p < 0,001$). Die histologisch gemessene Alveolarwanddicke und die Zahl der pulmonal migrierten Makrophagen war in der Gruppe VCV signifikant höher als in der VCV+FCE-Gruppe (97±21 vs. 43±20, $p < 0,05$).

Interpretation

Die Ergebnisse zeigen, dass eine aktive, flusskontrollierte Expiration zu einer signifikanten Verbesserung der pulmonalen Hämodynamik und der Atemmechanik führt mit signifikanter Reduktion des pulmonalen Ödems. Die möglichen protektiven Effekte für die Lunge zeigen sich in einem verminderten histomorphologischen Lungenschaden. Die flusskontrollierte Expiration könnte eine neue therapeutische Alternative in der Behandlung schwerer Oxygenierungsstörungen darstellen.

Dieses Projekt wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft unterstützt (DFG GU 691/6-1).

Literatur

1. Curr Opin Crit Care 2009;15(1):44-51
2. Curr Opin Crit Care 2011;Jun;17(3):268-74.

Eine potente und Lokalanästhetika-ähnliche Inhibition des kardialen Natriumkanals Nav1.5 als möglicher Mechanismus maligner Rhythmusstörungen durch Methadon

C. Stoetzer¹ · V. Schulze¹ · E. Eberhard² · N. Foadi¹ · J. de la Roche¹ · J. Ahrens¹ · A. Lampert² · A. Leffler¹

1 Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin, Medizinische Hochschule Hannover
2 Institut für Physiologie und Pathophysiologie, Universität Erlangen-Nürnberg

Korrespondenz:

Stoetzer.Carsten@mh-hannover.de

Fragestellung

Methadon ist ein starker Agonist des μ -Opioid-Rezeptors und wird hauptsächlich zur Behandlung von starken Schmerzen und zur Substitutionstherapie eingesetzt. Die Aktivierung des μ -ORs und damit auch die analgetische Wirkung durch Methadon ist stark stereospezifisch, d.h. Levomethadon ist ein starkes Opioid, während Dextromethadon nahezu keine analgetische Wirkung induziert [1]. Methadon kann im Gegensatz zu anderen Opioiden über eine Verlängerung der QT-Zeit maligne Rhythmusstörungen verursachen. Diese proarrhythmogene Wirkung unterliegt ebenfalls einer relevanten Stereospezifität, Dextromethadon > Levomethadon, und wird in der Literatur durch eine Inhibition kardialer HERG-Kanäle erklärt [2]. Methadon zeigt allerdings auch lokalanästhetische Effekte (3), und somit kommt als weiterer Wirkmechanismus eine Inhibition spannungsabhängiger Natriumkanäle in Frage. In dieser Studie sollte daher evaluiert werden, ob der kardiale Natriumkanal Nav1.5 durch Methadon beeinträchtigt wird und somit einen relevanten Mechanismus für die Kardiotoxizität von Methadon darstellt.

Methodik

Die Wirkungen vom Racemat von Methadon (D/L -Methadon), den Enantiomeren Levomethadon und Dextromethadon sowie von Bupivacain auf den humanen kardialen Natriumkanal Nav1.5 in HEK293-Zellen und

auf Natriumströme der neuronalen Zelllinie ND7/23 wurden mittels der whole-cell Patch-Clamp-Technik untersucht.

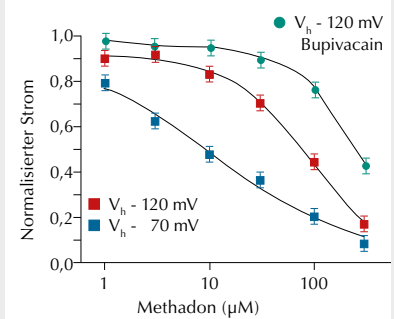
Ergebnisse

D/L -Methadon induziert eine konzentrationsabhängige und reversible tonische Blockade von ruhenden Nav1.5-Kanälen mit einer mittleren inhibitorischen Konzentration (IC_{50}) von $90 \pm 7 \mu M$ ($n=10$). Der korrespondierende IC_{50} -Wert des Lokalanästhetikums Bupivacain ist $254 \pm 13 \mu M$ ($n=9$). Neuronale Natriumkanäle in ND7/23-Zellen werden ebenfalls durch D/L -Methadon inhibiert (IC_{50} $134 \pm 4 \mu M$, $n=8$). Die Interaktion von D/L -Methadon mit Nav1.5 ist stark konformationsabhängig: 1. die Affinität zu inaktivierten Kanälen ist signifikant höher als zu ruhenden (IC_{50} $10 \pm 6 \mu M$, $n=13$) ($p < 0.01$ ungepaarter t-Test), 2. $100 \mu M$ induziert eine signifikante frequenzabhängige Blockade bei 10 Hz ($25 \pm 2\%$ versus Kontrolle $4 \pm 1\%$, $n=14$) ($p < 0.001$, gepaarter t-Test) und 3. 3 bis $100 \mu M$ induzieren eine prominente hyperpolarisierende Verschiebung der spannungsabhängigen schnellen und langsamen Inaktivierung. Diese konformationsabhängige Blockade ist eine typische Eigenschaft für Lokalanästhetika, demzufolge wurde die Wirkung von D/L -Methadon auf die Lokalanästhetika-insensitiven Nav1.5-Mutanten F177A und N406K untersucht. Sowohl die tonische Blockade (IC_{50} F177A $650 \pm 30 \mu M$, $n=10$ und N406K $190 \pm 21 \mu M$, $n=11$) ($p < 0.01$ bzw. 0.05, ANOVA mit Bonferroni post-hoc test) als auch die frequenzabhängige Blockade bei 10 Hz (F177A $9 \pm 2\%$, $n=10$ und N406K $7 \pm 3\%$, $n=11$) (beide $p < 0.01$, ANOVA mit Bonferroni post-hoc test) waren signifikant reduziert im Vergleich zum Wildtyp. Eine signifikante Stereospezifität für die tonische Blockade ruhender Kanäle konnte nicht festgestellt werden (IC_{50} Levomethadon $81 \pm 10 \mu M$ versus Dextromethadon $131 \pm 13 \mu M$, $n=8$) (beide $p > 0.05$, ungepaarter t-Test).

Interpretation

In dieser Studie konnten wir zeigen, dass Methadon ein potenter, aber stereospezifischer Inhibitor des kardialen spannungsabhängigen Natriumkanals Nav1.5 ist. Diese Inhibition durch Methadon ist konformationsabhängig

Abbildung 1



Dosis-Wirkungskurve für die tonische Blockade von ruhenden (Haltepotential V_h -120 mV) und inaktivierten (Haltepotential V_h -70 mV) Nav1.5-Kanälen durch D/L -Methadon und Bupivacain. Die Substanzen wurden in Konzentrationen zwischen 1 und $300 \mu M$ appliziert. Die partielle Blockade der einzelnen Konzentrationen wurde durch eine Normalisierung mit dem Kontrollwert errechnet, und der IC_{50} -Wert wurde mittels der Hill-Gleichung ermittelt.

und beruht auf einer Interaktion mit den intrazellulären Bindungsstellen für klassische Lokalanästhetika. Methadon ist potenter als das kardiotoxische Lokalanästhetikum Bupivacain und zeigt eine relevante Inhibition von Nav1.5 in Konzentration, die als relevante und potentiell kardiotoxische Plasmakonzentrationen beschrieben wurden ($\sim 3.5 \mu M$) [2].

Literatur

1. Kristensen K, Christensen CB, Christrup LL: The $\mu 1$, $\mu 2$, δ , κ opioid receptor binding profiles of methadone stereoisomers and morphine. Life Sci 1995;56:PL45-50
2. Katchman AN, McGroarty KA, Kilborn MJ, Kornick CA, Manfredi PL, Woosley RL, Ebert SN: Influence of opioid agonists on cardiac human ether-a-go-go-related gene K(+) currents. J Pharmacol Exp Ther 2002;303: 688-94
3. Kolesnikov YA, Oksman G, Pasternak GW: Topical methadone and meperidine analgesic synergy in the mouse. Eur J Pharmacol 2010; 638:61-4.

Die Inhibition der proteasomalen Degradation von Glukokortikoid-Rezeptoren bewirkt die Aufrechterhaltung der Blut-Hirn-Schranken-stabilisierenden Wirkung von Dexamethason nach experimentellem Schädelhirntrauma bei Mäusen

S. C. Thal¹ · E.-V. Schaible¹ · W. Neuhaus² · D. Scheffer² · M. Brandstetter¹ · N. Roewer² · C. Werner¹ · K. Engelhard¹ · C. Wunder² · C. Förster²

1 Klinik für Anästhesiologie, Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

2 Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie, Universitätsklinikum Würzburg

Korrespondenz:

E-Mail: thal@uni-mainz.de

Fragestellung

Nach Schädel-Hirn-Trauma (SHT) führen sekundäre Prozesse zu einer Störung der Barrierefunktion zerebraler Endothelzellen. In der Folge entsteht ein Hirnödem, welches eine schwere Komplikation nach SHT darstellt und mit einer Verschlechterung der Prognose assoziiert ist [1]. Verschiedene therapeutische Ansätze wurden deshalb entwickelt, um die Störung der Blut-Hirn-Schranken (BHS)-Integrität zu verringern. Die prominenteste Substanzklasse sind die Glukokortikoide, welche u.a. in vitro die BHS stabilisieren und bei zerebralen Neoplasien effektiv den Hirnwassergehalt (HWG) verringern. Für die Anwendung von Steroiden beim SHT existieren jedoch widersprüchliche Daten. Die kürzlich publizierte MRC CRASH-Studie zeigte eine mangelnde Effektivität nach SHT [2].

In der vorliegenden Arbeit wurde der molekulare Mechanismus für die mangelnde Wirksamkeit der Glukokortikoide nach mechanischer Hirnverletzung untersucht. Ziel der Studie ist die Untersuchung des posttraumatischen endothelialen Expressionsprofils von Glukokortikoid-Rezeptoren (GR) und die Evaluation der Rolle der proteasomalen GR-Degradation für den

posttraumatischen Wirkungsverlust der Barriere-stabilisierenden Wirkung von Steroiden.

Methodik

Nach Genehmigung durch das Landesuntersuchungsamt Koblenz wurde bei männlichen C57Bl/6N-Mäusen unter Isofluran-Anästhesie (1,4 Vol%) rechts parietal ein pneumatisches Kontusionstrauma (Controlled Cortical Impact, CCI) erzeugt. Die Charakterisierung der GR-Expression erfolgte auf mRNA- (real-time Polymerase Kettenreaktion) und Protein-Ebene (konfokale Fluoreszenzmikroskopie) im Hirngewebe von gesunden Tieren (nativ) und im traumatischen Fokus (15 Minuten, 24 und 72 Stunden nach CCI, je n=6 Tiere/Gruppe).

Der Einfluss der proteasomalen GR-Degradation auf die Glukokortikoid-Wirkung wurde bei männlichen C57Bl/6N-Mäusen untersucht, welche 30 Minuten nach Insult randomisiert subkutan Vehikel (0,9% NaCl, Veh), Bortezomib (0,2 mg/kg KG, Borte), Dexamethason (10 mg/kg KG, Dexa) oder eine Kombination aus Bortezomib (0,2 mg/kg KG) und Dexamethason (10 mg/kg KG, Komb) erhielten (n=5/Gruppe). Der HWG wurde gravimetrisch 24 Stunden nach Trauma bestimmt (wet dry ratio). Der Einfluss der proteasomalen Inhibition und Dexamethason-Gabe auf den sekundären Hirnschaden wurde randomisiert und verblindet bei separaten Mäusen untersucht, welche 30 Minuten nach CCI subkutan Vehikel (0,9% NaCl, Veh), Bortezomib (0,2 mg/kg KG, Borte), Dexamethason (10 mg/kg KG, Dexa) oder eine Kombination aus Bortezomib (0,2 mg/kg KG) und Dexamethason (10 mg/kg KG, Komb) erhielten (n=11/Gruppe). 24 Stunden nach CCI wurden die Gehirne entnommen und der Hirnschaden volumetrisch in Kresylviolett gefärbten Gefrierschnitten bzw. die BHS Integrität mittels IgG-Fluoreszenzmikroskopie und Färbung des BHS-Proteins Occludin quantifiziert. Die Bestimmung der primären Läsion erfolgte in einer separaten Gruppe mit 5 Min. Überleben nach CCI (n=4, PL).

Statistik: Die Nullhypothese wurde mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit von unter 5% abgelehnt. Der Hirnwassergehalt, die Kontusionsvolumina und die Daten der mRNA-Expression

wurden mit Wilcoxon-Mann-Whitney-Test analysiert und die p-Werte nach Bonferroni für multiple Testung korrigiert.

Ergebnisse

Nach CCI wird die mRNA-Expression der GR nicht reguliert (15 Minuten: $116 \pm 22\%$ nativ; 24 Stunden: $85 \pm 11\%$ nativ; 72 Stunden: $89 \pm 21\%$ nativ), während das GR-Proteinsignal in Endothelzellen perikontusionell abnimmt. Die Abnahme der GR-Signale wird durch die Gabe des Proteasom-Inhibitors Bortezomib verhindert. Während die Gabe von Dexamethason oder Bortezomib als Monotherapien das Ausmaß des HWG und Hirnschadens nicht beeinflusste, stabilisierten die Substanzen in Kombination signifikant die BHS und verringerten das Hirnödem (Abb. A) und den sekundären Schaden (Abb. B).

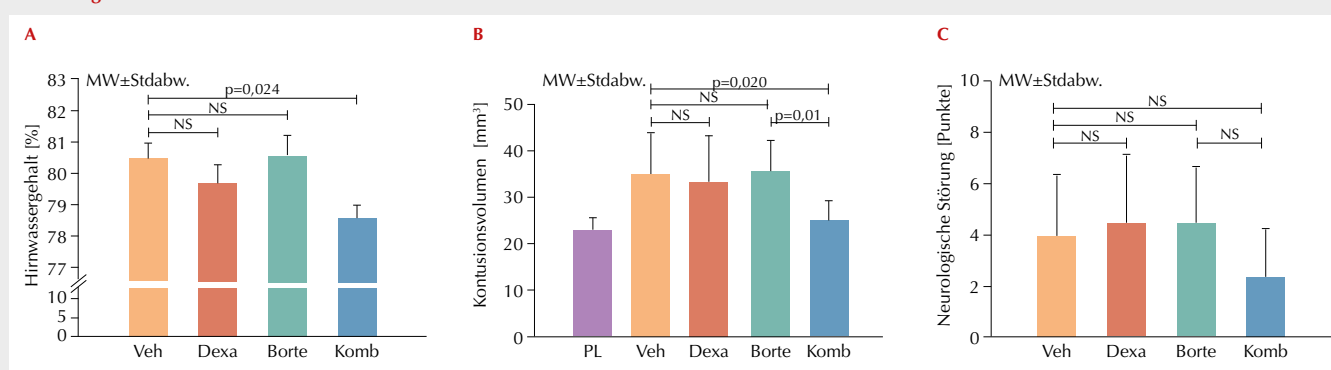
Interpretation

Die Ergebnisse zeigen, dass die stabilisierende Wirkung von Glukokortikoiden auf die BHS nach zerebralen Läsionen durch proteasomalen Abbau der Glukokortikoid-Rezeptoren in zerebralen Endothelzellen verhindert und durch Hemmung des proteasomalen Abbauwegs wiederhergestellt wird. Die Ergebnisse liefern somit einen grundlegenden Mechanismus für die klinisch beobachtete Unwirksamkeit von Glukokortikoiden nach SHT. Um eine Stabilisierung der BHS mit Steroiden zu erreichen, muss die GR-Degradation verhindert werden. Eine kombinierte Behandlungsstrategie könnte helfen Trauma-induzierte Hirnödeme-Bildung und neuronale Schäden als sekundäre klinische Auswirkungen des SHT zu mildern.

Literatur

1. Willeumier K, Pulst SM, Schweizer FE: Proteasome inhibition triggers activity-dependent increase in the size of the recycling vesicle pool in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* 2006;26:11333-41
2. Roberts I, Yates D, Sandercock P, et al: Effect of intravenous corticosteroids on death within 14 days in 10008 adults with clinically significant head injury (MRC CRASH trial): randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2004;364:1321-8.

Abbildung 1



Die Langzeitblockade beta1-adrenerger Rezeptoren hebt die Kardioprotektion durch Desfluran-induzierte Postkonditionierung auf

T. Tischer-Zeitz¹ · S.-C. Kim² · J. Stumpner¹ · C. Lotz¹ · P. Knüfermann² · G. Baumgarten² · M. Lange^{1,3} · N. Roewer¹ · T. M. Smul¹

- 1 Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie, Universitätsklinikum Würzburg
- 2 Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin, Universitätsklinikum Bonn
- 3 Klinik für Anästhesie und Intensivmedizin, Mathias-Spital Rheine

Korrespondenz:

Tischer_T@klinik.uni-wuerzburg.de

Fragestellung

In der Behandlung von Patienten mit erhöhtem kardiovaskulärem Risiko nehmen Betablocker eine bedeutende Stellung ein [1]. Tierexperimentell wurde gezeigt, dass eine kurzfristige Aktivierung beta₁-adrenerger Rezeptoren (ADRB1) entscheidend für die Vermittlung der Anästhetika-induzierten Postkonditionierung (APOST) ist [2]. Wie sich eine kontrollierte Langzeit-Betablockade (LTBB) auf die Kardioprotektion durch Desfluran (Des) auswirkt, ist bislang unbekannt. Wir testeten die Hypothese, dass eine LTBB Veränderungen des ADRB1-abhängigen Signaltransduktionsweges induziert und die Des-induzierte Postkonditionierung aufhebt.

Methodik

Nach Genehmigung durch die zuständige Behörde wurden männlichen C57BL/6-Mäusen osmotische Miniaturpumpen implantiert, die entweder Metoprolol (Meto 10 mg/kg/d) oder 0,9%ige NaCl-Lösung für mindestens 21 Tage kontinuierlich applizierten. Tiere mit einer Herzfrequenz (HF)-Reduktion um $\geq 9\%$ wurden als suffizient betablockiert definiert und in die Meto-Gruppen eingeschlossen. Die Effektivität der LTBB wurde zusätzlich mittels linksventrikulären Conductance-Katheters unter Dobutamin-Stimulation (2 mg/kg i.p.) verifiziert. Anschließend erhielten alle Tiere unter Pentobarbital-Narkose eine Ischämie/Reperfusion-Protokoll (I/R) mit 45-minütiger Koronararterien-Okklusion, gefolgt von 3 h Reperfusion. Kontrolltiere (CON) erhielten keine weitere Intervention. In den APOST-Gruppen wurde Des (1,0 MAC), beginnend drei Minuten vor Reperfusion, für 18 Minuten appliziert. Das Risikoareal (AAR) und die Infarktgröße (IS) wurden gravitoplanimetrisch bestimmt.

Myokardgewebe wurde für molekularbiologische Tests vor bzw. nach I/R entnommen. Die relative Protein- bzw. mRNA-Konzentration von ADRB1, Arrestin beta 1 (Arrb1) und der alpha-Untereinheit des G_s-Proteins (Gnas) wurde mittels Western-Immunoblotting bzw. RT-PCR bestimmt. Die Daten wurden mittels Ein- bzw. Zwei-Wege-ANOVA und post-hoc Duncan's test ausgewertet. Mittelwert \pm SEM sind angegeben.

Ergebnisse

Meto (n=30) führte zu einer signifikanten HF-Reduktion verglichen mit NaCl (n=21; *p<0,05) und verglichen mit Messungen vor Pumpen-Implantation (*p<0,0056) (Abb. 1, Tag 0 = Pumpenimplantation). Dies ging mit einem Anstieg der ADRB1-mRNA, jedoch nicht der Proteinkonzentration einher (Abb. 2). Dobutamin-Stimulation führte in Kontrolltieren zu einem signifikanten HF-Anstieg. Die Kontraktilität nahm in Kontrolltieren stärker zu als unter Meto. Des-induzierte Postkonditionierung verminderte die IS (32,2 \pm 2%, n=7; *p<0,05) im Vergleich zur CON (48 \pm 3%, n=6; Abb. 3). Meto beeinflusste die IS nicht (41 \pm 3%), inhibierte jedoch die APOST (43 \pm 3%, n=6). Der durch Meto nach I/R gemessene Anstieg der ADRB1-, Arrb1- und Gnas-mRNA wurde in Kombination mit Des aufgehoben.

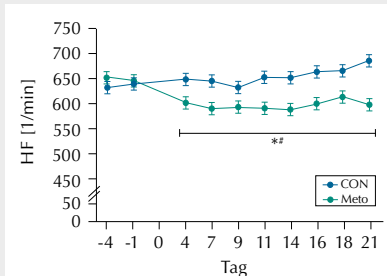
Interpretation

Das in der vorliegenden Untersuchung etablierte Modell einer effektiven LTBB induzierte Veränderungen im Profil der ADRB1-abhängigen Signaltransduktionswege, die durch die APOST beeinflusst wurden. In dieser klinisch relevanten Konstellation wurde die kardioprotektive Wirkung der Des-induzierten Postkonditionierung durch eine LTBB aufgehoben. Inwiefern die durch LTBB induzierten transkriptionellen Veränderungen damit in Zusammenhang stehen, ist Gegenstand zukünftiger Untersuchungen.

Literatur

1. Smith SC Jr, Benjamin EJ, Bonow RO, et al: AHA/ACC Secondary Prevention and Risk Reduction Therapy for Patients with Coronary and Other Atherosclerotic Vascular Disease: 2011 Update: A Guideline from the American Heart Association and American College of Cardiology Foundation. *Circulation* 2011;124:2458-2473.
2. Lange M, Redel A, Lotz C, et al: Desflurane-induced postconditioning is mediated by beta-adrenergic signalling: role of beta 1- and beta 2-adrenergic receptors, protein kinase A, and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *Anesthesiology* 2009;110:516-528.

Abbildung 1

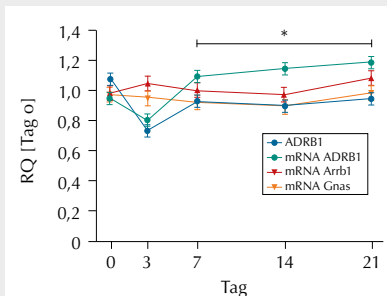


HF-Reduktion durch Langzeit-Applikation von Metoprolol.

*p<0,05 vs. NaCl

#p<0,0056 vs. Prä-Pumpen-Implantation

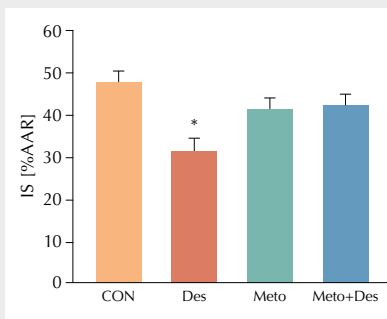
Abbildung 2



Anstieg der ADRB1-mRNA durch Langzeit-Applikation von Metoprolol.

*p<0,05 vs. Tag 0

Abbildung 3



Die Desfluran-induzierte Postkonditionierung wird durch Langzeit-Applikation von Metoprolol aufgehoben.

*p<0,05 vs. CON

Aktivierung des kardialen Delta-Opioidsystems der Ratte im progressiven Verlauf einer experimentellen Herzinsuffizienz

S. Treskatsch¹ · A. Feldheiser¹ · M. Siffringer¹ · M. Shaqura¹ · M. Shakibaei² · S. A. Mousa¹ · M. Schäfer¹ · C. Spies¹

1 Klinik für Anästhesiologie mit Schwerpunkt op. Intensivmedizin, CCM/CVK, Charité – Universitätsmedizin Berlin

2 Anatomisches Institut, Lehrstuhl I, Ludwig-Maximilians-Universität München

Korrespondenz:

E-Mail: sascha.treskatsch@charite.de

Fragestellung

Trotz zunehmenden wissenschaftlichen Interesses an der protektiven Funktion des kardialen Opioidsystems wurde die Rolle des kardialen Opioidsystems im Rahmen einer kongestiven Herzinsuffizienz bis heute nicht untersucht. In diesem Projekt sollten daher in einem experimentellen Herzinsuffizienzmodell der Ratte adaptive Veränderungen des kardialen Delta-Opioidrezeptors (DOR) und des korrespondierenden endogenen Liganden, des Opioidpeptids Proenkephalin (PENK), erstmalig untersucht werden.

Methodik

Nach Zustimmung der lokalen Ethikkommission wurde bei männlichen Wistar-Ratten eine Herzinsuffizienz mittels Anlage eines aortokavalen, infrarenalen Shunts durch Nadel-Punktionstechnik (16G) nach Garcia/Diebold induziert [1]. Kontrolltiere erhielten eine Sham-Operation, bei der keine Punktion der abdominalen Gefäße stattfand. Nach 28±2 Tagen erfolgte eine ausführliche Charakterisierung des Stadiums der Herzinsuffizienz eines jeden Tieres anhand a) morphologischer Parameter, b) funktioneller Parameter,

erfasst mittels eines intraventrikulären Druck-Volumen-Katheters, sowie c) einer BNP-Bestimmung im Plasma als Ausdruck einer neurohumoralen Aktivierung. Adaptive Veränderungen von DOR und PENK wurden mittels RT-PCR im linken Ventrikel (LV) und Vorhof (LA) bestimmt. Die anatomische Lokalisation der DOR sollte anhand einer konfokalen Immunfluoreszenz-Mikroskopie identifiziert werden. Die statistische Analyse erfolgte mittels Student's t-Test bei gegebener Normalverteilung (Mittelwert±Standardfehler), sonst mittels Mann-Whitney-U-Test (Median±Quartile) bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$.

Ergebnisse

Shunt-Tiere wiesen einen signifikant erhöhten Herz- ($3,84 \pm 0,07$ vs. $6,66 \pm 0,23$ mg/g KG) und Lungenindex ($3,75 \pm 0,14$ vs. $6,70 \pm 0,37$ mg/g KG), einhergehend mit signifikant erhöhten rechts- und linksventrikulären Füllungsdrücken (ZVD: $0,2 \pm 0,1$ vs. $5,7 \pm 0,7$ mmHg; LVEDP: $4,9 \pm 0,3$ vs. $12,6 \pm 0,9$ mmHg), auf. Aufgrund der Volumenbelastung kam es zu einer mehr als zweifachen Erhöhung des Schlagvolumens ($137,6 \pm 4,6$ vs. $286,1 \pm 24,4$ µl). Die linksventrikuläre Ejektionsfraktion ($73,3 \pm 1,4$ vs. $42,8 \pm 2,7$ %) war hierbei jedoch ebenso wie die maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit ($15444,6 \pm 793,7$ vs. $10669,0 \pm 796,5$ mmHg/s) signifikant erniedrigt. Des Weiteren zeigte sich eine Einschränkung der diastolischen Funktion gemessen anhand einer niedrigeren maximalen Druckabfallgeschwindigkeit in der Relaxationsphase ($-9826,4 \pm 683,1$ vs. $-6652,9 \pm 456,1$ mmHg/s) und einem verlängerten Tau-Wert ($8,22 \pm 0,31$ vs. $12,01 \pm 0,76$ ms). Schließlich kam es zu einer signifikanten BNP-Erhöhung 4 Wochen nach Shuntinduktion. Präliminäre Daten der Shunt-Tiere zeigten eine Hochregulation der DOR-mRNA im LA und LV. Analog hierzu wurde PENK-mRNA im LV signifi-

kant vermehrt exprimiert. In der konfokalen Immunfluoreszenz-Mikroskopie zeigte sich die anatomische Lokalisation der DOR-Immunreaktivität in den Kardiomyozyten des LV.

Interpretation

In dem experimentellen Modell eines aortokavalen, infrarenalen Shunts mit nachfolgend schwerer kongestiver Herzinsuffizienz zeigte sich eine signifikante Einschränkung der systolischen und diastolischen Funktion sowie eine Aktivierung des neurohumoralen Systems. Diese Funktionseinschränkung ging mit einer DOR-mRNA-Hochregulation im LV und LA einher. Zudem kam es zu einer vermehrten Expression des endogenen Delta-Opioidpeptids PENK im LV. Diese präliminären Daten legen eine Aktivierung des kardialen Opioidsystems im Rahmen einer kongestiven Herzinsuffizienz nahe. Über eine funktionelle Bedeutung lässt sich zum jetzigen Zeitpunkt nur spekulieren: a) in der Frühphase einer Herzinsuffizienz könnte über diese Aktivierung z.B. eine Dämpfung des Sympathikus erfolgen, b) in der Spätphase könnte zudem ein immunsuppressiver, antiapoptotischer Effekt vermittelt werden [2,3].

Literatur

1. Garcia R, Diebold S: Simple, rapid, and effective method of producing aortocaval shunts in the rat. *Cardiovasc Res* 1990 Mai;24(5):430-432
2. Brack A, Rittner HL, Stein C: Immunosuppressive Effects of Opioids - Clinical Relevance. *J Neuroimmune Pharmacol* 2011 Dez;6(4):490-502
3. Barrère-Lemaire S, Combes N, Sportouch-Dukhan C, Richard S, Nargeot J, Piot C: Morphine mimics the antiapoptotic effect of preconditioning via an Ins(1,4,5)P₃ signaling pathway in rat ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005 Jan;288(1):H83-88.

Micro-RNA-31-vermittelte Regulation der Th1-Antwort bei Patienten mit Sepsis und viralem ARDS

V. van der Heide · P. Möhnle · J. Briegel · S. Kreth
Klinik für Anaesthesiologie, Universität München

Korrespondenz:

E-Mail: verena.heide@med.uni-muenchen.de

Fragestellung

T-Lymphozyten spielen eine zentrale Rolle bei der Entstehung und Aufrechterhaltung inflammatorischer Prozesse, wie z.B. der Sepsis oder des ARDS. Ihre Effektor-Funktionen werden u.a. durch Oberflächenmoleküle vermittelt, zu denen auch die SLAM/CD2-Rezeptoren zählen. Diese wirken über eine Adapter-Protein-gekoppelte (SAP, codiert durch SH2D1A-Gen), intrazelluläre Signalkaskade und sind von wesentlicher Bedeutung für die T-Zell-spezifische Immunität, insbesondere für die Zytokinantwort [1]. In tierexperimentellen Studien konnte kürzlich gezeigt werden, dass micro-RNAs (miRs) sowohl direkt als auch indirekt die Expression von Zytokinen regulieren [2]. Der Einfluss von miR-31, einer im Rahmen immunologischer Prozesse wichtigen miR [3], auf die Th1-Antwort aktivierter T-Zellen ist Gegenstand des vorliegenden Forschungsprojektes.

Methodik

RNA wurde aus T-Zellen von Sepsis- bzw. ARDS-Patienten (virales ARDS durch H1N1) extrahiert (n=6; Ethikvotum und Einverständnis der Patienten bzw. Betreuer lagen vor) und die miR-31-Expression mittels spezifischen TaqMan-Assays bestimmt. Mit Hilfe computergestützter Algorithmen wurde SH2D1A als potentielles Zielgen der miR-31 identifiziert und im weiteren Verlauf experimentell validiert. T-Zellen gesunder Probanden (n=6) wurden mit einer synthetischen Vorläufer-miR-31 (pre-miR-31) transfiziert (Elektroporation) und Rezeptor-vermittelt aktiviert (CD3/CD28 Microbeads). RNA wurde extrahiert (24 h Inkubation), revers transkribiert und die SH2D1A-mRNA-Expressionsrate mit einem spezifischen real-time PCR-Assay gemessen. Der 3'-UTR des SH2D1A-Gens wurde durch PCR amplifiziert und in einen Luciferase-Reporter-Vektor kloniert. Mittels gerichteter Mutagenese wurden Kontrollkonstrukte mit deletierten miR-31-Bindungsstellen hergestellt.

Die Vektorkonstrukte wurden jeweils mit pre-miR-31 oder Kontroll-miR in HEK293-Zellen co-transfiziert; die Luciferase-Aktivität wurde luminometrisch quantifiziert. Die mRNA-Expression der Th1-Zytokine Interferon- γ und Interleukin-2 wurde nach Transfektion von in vitro expandierten T-Zellen mit pre-miR-31 (bzw. Kontroll-miR) oder siRNA gegen SH2D1A-mRNA (bzw. Kontroll-siRNA) durch quantitative real-time PCR erfasst (24 h Inkubation). Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test oder Mann-Whitney-U-Test.

Ergebnisse

In T-Zellen von Sepsis- bzw. ARDS-Patienten (vs. gesunde Kontrollen) konnte eine signifikant niedrigere miR-31-Expression nachgewiesen werden (Abb. 1; n=6; 0.006 ± 0.001 , $p < 0.001$ bzw. 0.008 ± 0.001 , $p < 0.001$). Primäre, aktivierte T-Zellen von Gesunden zeigten nach Transfektion von pre-miR-31 eine verminderte Expression von SH2D1A (n=6; Median 0.6, 25%: 0.52, 75%: 0.63, $p = 0.002$). Mittels Luciferase-Assay konnte die Regulation der SH2D1A-mRNA-Expression durch miR-31 bestätigt werden. Hierbei handelt es sich um einen additiven Effekt durch die beiden Bindungsstellen der miR-31 im SH2D1A-3'-UTR (n=3; Reduktion Luciferase vs. Kontrolle $80.2\% \pm 2.7\%$, $p < 0.001$). Die Quantifizierung der mRNA-Expression von Interferon- γ und Interleukin-2 nach Transfektion von in vitro expandierten T-Zellen mit pre-miR-31 bzw. siRNA gegen SH2D1A-mRNA demonstrierte signifikant niedrigere Werte gegenüber der Kontrolle (Abb. 2; n=5; IFN- γ : 0.622 ± 0.05 , $p < 0.001$ bzw. 0.684 ± 0.04 , $p < 0.001$; IL-2: 0.573 ± 0.05 , $p < 0.001$ bzw. 0.625 ± 0.05 , $p < 0.001$).

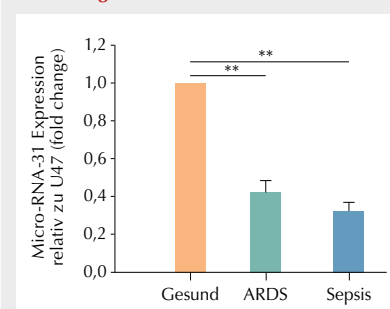
Interpretation

In unseren Experimenten konnten wir einen neuen, miR31-vermittelten Mechanismus der indirekten Regulation von Interferon- γ und Interleukin-2 über das SLAM-Rezeptor-assoziierte Protein SAP nachweisen: Transfektion einer Vorläufer-miR-31 oder siRNA gegen SH2D1A-mRNA führt in T-Zellen zu einer reduzierten IFN- γ sowie IL-2 mRNA-Expression. In T-Zellen von Sepsis- und ARDS-Patienten wird die miR-31 im Vergleich zu Gesunden signifikant vermindert exprimiert. Dies weist auf ein vermindertes antiinflammatorisches Potenzial aufgrund der hier gezeigten miR-31-vermittelten Effekte hin.

Literatur

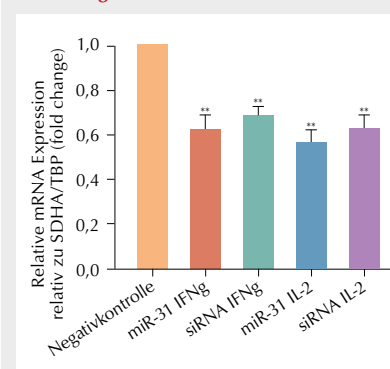
1. Sintès J, Engel P: SLAM (CD150) is a multi-tasking immunoreceptor: from cosignalling to bacterial recognition. *Immunol. Cell Biol* 2011; 89:161-163
2. Sun Y, Varambally S, Maher CA, Cao Q, Chockley P, Toubai T, Malter C, Nieves E, Tawara I, Wang Y, Ward PA, Chinnaiyan A, Reddy P: Targeting of microRNA-142-3p in dendritic cells regulates endotoxin-induced mortality. *Blood* 2011; 117:6172-6183
3. Valastyan S, Weinberg RA: miR-31: a crucial overseer of tumor metastasis and other emerging roles. *Cell Cycle* 2010; 9: 2124-2129.

Abbildung 1



miR-31-Expression in T-Zellen von Sepsis- und ARDS-Patienten vs. Kontrolle (mean \pm SEM).

Abbildung 2



mRNA-Expression von IFN- γ und IL-2 in mit pre-miR-31 bzw. siRNA transfizierten T-Zellen vs. Kontrolle (mean \pm SEM).

Der Toll-like Rezeptor 2 moduliert Endothelzellfunktionen und Gefäßneubildungsprozesse: Bedeutung der Interaktion von TLR2 mit dem SDF-1/CXCR4-System

N.-M. Wagner¹ · L. Bierhansl¹ · G. Nöldge-Schomburg¹ · B. Vollmar² · J. P. Roesner¹

1 Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie,

2 Institut für Experimentelle Chirurgie, Universität Rostock

Korrespondenz:

E-Mail: nana-maria.wagner@med.uni-rostock.de

Fragestellung

Toll-like Rezeptor 2 (TLR2)-Defizienz bzw. -Inhibition ist mit verminderter endothelialer Dysfunktion, verbesserter Revaskularisierung nach ischämischem Herzinfarkt und höheren Überlebensraten nach kardiopulmonaler Reanimation assoziiert [1,2]. Der Mechanismus dieses protektiven Effekts einer TLR2-Defizienz ist jedoch unklar. Der Stromal-derived factor-1 (SDF-1) und sein Rezeptor CXCR4 sind von zentraler Bedeutung für endotheliale Gefäßneubildungsprozesse (Angiogenese), und es bestehen Hinweise dafür, dass TLR2 mit dem SDF-1/CXCR4-Signalsystem spezifisch interagiert [3]. Wir untersuchten den Effekt einer TLR2-Modulation auf die Endothelzellfunktion in vitro und Gefäßneubildungsprozesse in vivo sowie deren Einfluss auf die pro-angiogenetische Wirkung des SDF-1/CXCR4-Systems in Endothelzellen.

Methodik

Humane Endothelzellen wurden mit TLR2-blockierenden Antikörpern bzw. TLR2-stimulierenden Liganden behandelt und auf endotheliale Kapillarbildung, Sprossung in Extra-zellulärmatrix und Migration (Matrigel-/Sphäroid-/Scratch-Modell) in vitro untersucht. Durch Zugabe von SDF-1 wurde die Wirkung einer TLR2-Modulation auf die pro-angiogenetischen Effekte des SDF-1/CXCR4-Signalsystem in Endothelzellen überprüft und der mögliche Mechanismus einer TLR2-Interaktion mit dem SDF-1/CXCR4-System durch durchflusszytometrische Analyse der endothelialen CXCR4-Rezeptorexpression untersucht. Im In-vivo-Hinterlaufischämie Modell in der Maus wurden die Effekte einer TLR2-Inhibition auf die Kapillarneubildung im M. gastrocnemius drei Wochen nach Ligatur der A. femoralis evaluiert. Hierzu wurden Wildtyp (WT)-Mäuse am ersten und vierten Tag nach Gefäßverschluss mit TLR2-blockierendem Antikörper (T2.5; 5 µg/g) bzw. Kontrollsubstanz durch linksventrikuläre Injektion behandelt. Mononukleäre Zellen (PBMNC) von WT- und TLR2^{-/-} Tieren wurden auf ihre Potenz, Kapillarbildung von ausdifferenzierten Endothelzellen zu stimulieren, in vitro verglichen. Mittelwerte±SD; one-way ANOVA/Bonferroni.

Ergebnisse

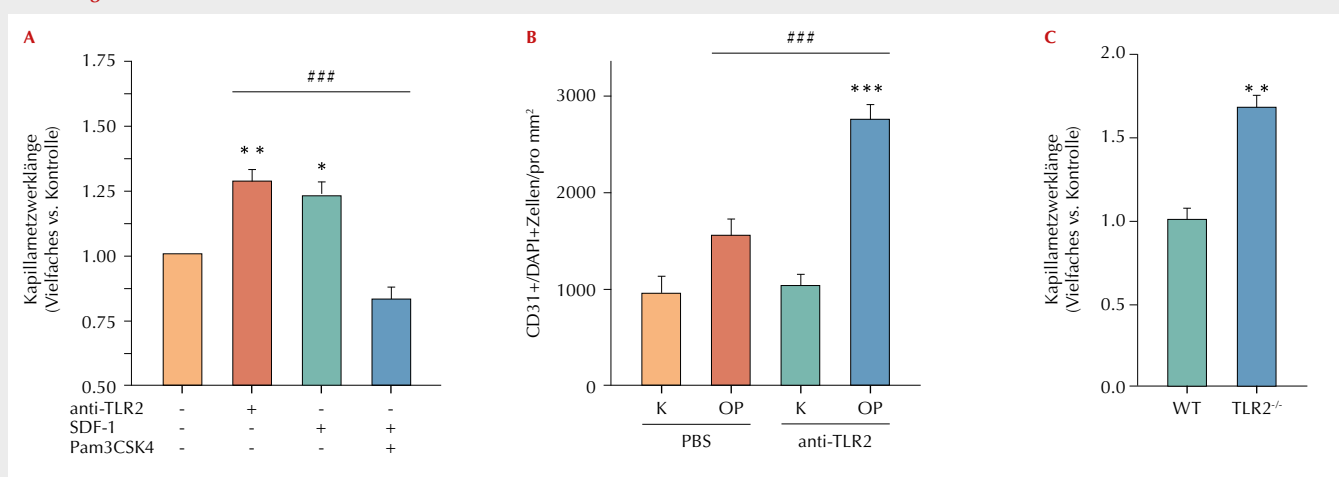
TLR2-Blockade zeigte eine Verbesserung der endothelialen Kapillarbildung, Endothelzellprossung und Migration (5 bzw. 10 µg/ml anti-TLR2-Antikörper; jeweils P<0,01 vs.

Kontrolle; n=5-8). Diese Effekte waren vergleichbar mit denen unter Stimulation mit 50 ng/ml SDF-1 (Abb. 1A). Eine TLR2-Stimulation durch 50, 100 oder 500ng/ml des spezifischen Liganden Pam3CSK4 zeigte keinen Effekt auf die In-vitro-Kapillarbildung (jeweils P>0,05 vs. Kontrolle; n=5), unterdrückte jedoch den SDF-1-Effekt vollständig (P<0,01 im Matrigel-, P<0,001 im Sphäroid- und P<0,05 im Migrations-Modell im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit SDF-1; n=5-8). Durchflusszytometrische Analysen der endothelialen CXCR4-Expression zeigten keine Unterschiede nach TLR2-Inhibition bzw. Stimulation. Im Hinterlaufischämie Modell in der Maus zeigte sich nach Behandlung mit TLR2-blockierenden Antikörpern eine signifikant höhere Kapillardichte im M. gastrocnemius im Vergleich zu kontrollbehandelten Tieren (Abb. 1B). Überdies stimulierten PBMNC aus Vollblut von TLR2^{-/-}-Mäusen die In-vitro-Kapillarbildung ausdifferenzierter Endothelzellen im Matrigel-Angiogenese-Modell besser als von WT-Mäusen isolierte PBMNC (Abb. 1C).

Interpretation

Unsere Ergebnisse bestätigen den günstigen Effekt einer TLR2-Inhibition bzw. Defizienz auf zellulärer Ebene für die endotheliale Funktion und Gefäßneubildung in vitro und in vivo, welcher sich vergleichbar zu dem Effekt des pro-angiogenetischen Faktors SDF-1 zeigt. Die unterdrückten SDF-1-Effekte in der Präsenz TLR2-stimulierender Substanzen deuten auf eine Interaktion des TLR2- mit

Abbildung 1



A Endothelzellen zeigen nach Behandlung mit anti-TLR2-Antikörper oder SDF-1 verbesserte Kapillarnetzwerkbildung im Matrigel-Modell im Vergleich zur Kontrolle. TLR2-Stimulation durch Pam3CSK4 unterdrückt den SDF-1-Effekt. *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001; n=8 Experimente.

B Injektion von anti-TLR2-Antikörper resultiert in höherer Anzahl CD31/DAPI-doppelt-positiver Kapillaren im Hinterlaufischämie Modell.

K, nicht-operierter Hinterlauf; OP, operierter Hinterlauf. ***P<0,001; ###P<0,001; n=4 Mäuse/Gruppe.

C PBMNC von TLR2^{-/-}-Mäusen stimulieren die endotheliale Kapillarnetzwerkbildung besser als PBMNC von WT-Mäusen. **P<0,05; n=3 Mäuse/Gruppe.

dem SDF-1/CXCR4-Signalweg möglicherweise auf der Signaltransduktionsebene unterhalb der Rezeptoren hin. Insgesamt könnten unsere Ergebnisse damit eine mechanistische Grundlage für eine Störung der vaskulären Homöostase unter inflammatorischen und ischämischen Bedingungen über eine Modulation des SDF-1/CXCR4-Systems durch den TLR2 darstellen und unterstreichen das therapeutische Potenzial einer Behandlung mit TLR2-inhibierenden Antikörpern.

Literatur

1. Favre J, Musette P, Richard V: Toll-like receptor 2-deficient mice are protected against postischemic coronary endothelial dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27(5): 1064-71
2. Bergt S, Grub A, Roesner J: TLR2-Defizienz verbessert die Überlebensrate und die funktionell-neurologische Regeneration von Mäusen nach einem Herz-Kreislaufstillstand und Reanimation; Abstract Wissenschaftliche Arbeitstage Würzburg 2011, *Anästh Intensivmed* 2011;7:483
3. Schmid MA, Takizawa H, Manz MG: Bone marrow dendritic cell progenitors in mice sense pathogens via Toll-like receptors and subsequently migrate to inflamed lymph nodes. *Blood* 2011;118(18):4829-40.

Der Lidocain-Metabolit N-Ethylglycin wirkt antinozizeptiv bei chronisch inflammatorischem Schmerz bei der Maus

R. Werdehausen^{1,2} · V. Eulenburg² · M. Minett³ · N. Eijkelkamp³ · I. Bauer¹ · J. N. Wood³ · H. Hermanns¹

1 Klinik für Anästhesiologie, Universitätsklinikum Düsseldorf

2 Institut für Biochemie, Universität Erlangen-Nürnberg

3 Wolfson Institute for Biomedical Research, University College London

Korrespondenz:

robert.werdehausen@uni-duesseldorf.de

Preisträger des DGAI-Forschungsstipendiums der Fresenius-Stiftung 2012

Fragestellung

Systemisch appliziertes Lidocain wirkt antinozizeptiv in Konzentrationen, die nicht ausreichen, um Natriumkanäle zu blockieren [1]. Der Mechanismus dieser Wirkung ist bisher unklar. Tierexperimentelle Untersuchungen liefern Hinweise auf eine Beteiligung glycinerner Neurotransmission [2]. Jüngste In-vitro-Untersuchungen zeigen, dass der Lidocain-Metabolit N-Ethylglycin (EG) ein Inhibitor des Glycin Transporters 1 (GlyT1) ist [3]. EG könnte demnach die antinozizeptive Wirkung von Lidocain vermitteln. Hypothese der vorliegenden Studie war, dass EG in vivo antinozizeptiv wirkt.

Methodik

Mit Genehmigung der zuständigen Tierschutzbehörde wurde bei adulten C57BL/6-Mäusen (n=8 pro Gruppe) inflammatorischer Schmerz mittels Injektion von komplettem Freund's Adjuvanz (CFA, 20 µl) in die linke Hinterpfote induziert. Der Effekt einer randomisierten, verblindeten, subkutanen Injektion von EG (200 mg/kg), Sarcosin (Positivkontrolle; GlyT1-Inhibitor; 200 mg/kg) und Vehikel (Kochsalzlösung 0,9%) auf Allodynie (von Frey Filament) und Hyperalgesie (Hargreaves Test) wurde im Zeitverlauf verglichen. Weiterhin wurden Motorkoordination (RotaRod Test), Gewebeschwellung (Pfotendurchmesser) und Körpergewicht dokumentiert. In einem separaten Experiment wurden unbehandelte Tiere hinsichtlich einer akut analgetischen Wirkung von EG im Hargreaves Test untersucht. Zur Untersuchung einer systemischen Toxizität wurde die Zeit bis zum Auftreten neurologischer Nebenwirkungen (Sedierung, unkoordinierte Abwehrbewegungen) nach subkutaner Injektion von Lidocain (40 mg/kg) und EG (400 mg/kg) bestimmt. Statistik: Mittelwert, Standardfehler, Varianzanalyse, Bonferroni post-hoc test, Signifikanzniveau $P < 0,05$.

Ergebnisse

Die CFA-induzierte mechanische Allodynie war 1, 2 und 4 h nach Injektion von EG verringert (Abb. 1, * $P < 0,01$). Wiederholung der Injektion in Intervallen von 12 h hatte keinen chronisch antinozizeptiven Effekt (12 h nach Injektion). Auch die CFA-induzierte Hyperalgesie war 1, 2, 4 und 6 h nach Injektion von EG signifikant erniedrigt im Vergleich zur Vehikelkontrolle (Abb. 2, * $P < 0,01$). Die Injektion von EG hatte keinen akuten, analgetischen Effekt bei naiven Tieren (ohne Vorbehandlung mit CFA; Abb. 3). Die Effekte von EG waren mit denen des GlyT1-Inhibitors Sarcosin in identischer Dosierung vergleichbar. Die Untersuchung von Motorkoordination, Pfotendurchmesser und Körpergewicht zeigte keinen Einfluss der Behandlung. Während die Injektion von Lidocain bei allen untersuchten Tieren zu ausgeprägten neurologischen Symptomen führte, wurden bei keinem der mit EG behandelten Tiere neurologische Nebenwirkungen innerhalb eines Zeitraums von 6 h beobachtet (Abb. 4, * $P < 0,01$).

Interpretation

Die subkutane Applikation von EG wirkt antinozizeptiv bei inflammatorisch vermitteltem Schmerz bei der Maus. Es finden sich keine Hinweise für einen Einfluss auf Motorkoordination, inflammationsbedingte Gewe-

beschwellung und Allgemeinzustand. EG zeichnet sich im Vergleich zu Lidocain durch eine wesentlich geringere systemische Neurotoxizität aus. Somit konnten wir mit EG eine neue, antinozizeptiv wirksame Substanz mit potenziell günstigem Nebenwirkungsprofil identifizieren. Ob die beobachteten Effekte von EG durch Inhibition von GlyT1 vermittelt werden und klinisch nutzbar gemacht werden könnten, ist Gegenstand weiterführender Untersuchungen.

Dieses Projekt wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft unterstützt (DFG We 4860/1-1).

Literatur

1. Challapalli V, Tremont-Lukats IW, McNicol ED, Lau J, Carr DB: Systemic administration of local anesthetic agents to relieve neuropathic pain. Cochrane Database Syst Rev 2005: CD003345
2. Muth-Selbach U, Hermanns H, Stegmann JU, Kollrosche K, Freynhagen R, Bauer I, et al: Antinociceptive effects of systemic lidocaine: involvement of the spinal glycinergic system. Eur J Pharmacol 2009;613:68-73
3. Werdehausen R, Kremer D, Brandenburger T, Schlösser L, Jadasz J, Küry P, et al: Lidocaine Metabolites Inhibit Glycine Transporter 1: A Novel Mechanism for the Analgesic Action of Systemic Lidocaine? Anesthesiology 2012; 116:147-58.

Abbildung

Abb. 1 Mechanische Allodynie nach CFA Behandlung (n=8)

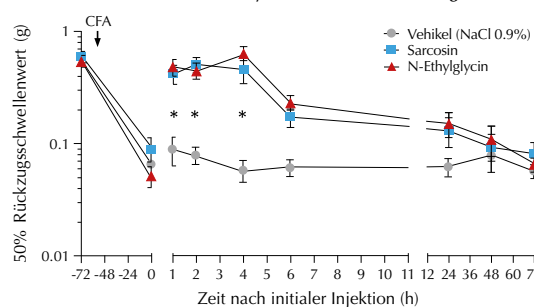


Abb. 3 Akute Analgesie (Hargreaves Test; n=8)

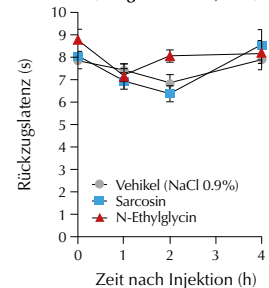


Abb. 2 Thermale Hyperalgesie nach CFA Behandlung (n=8)

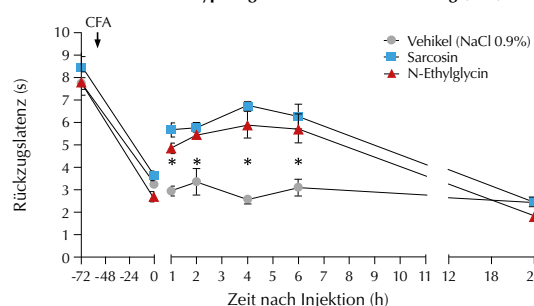
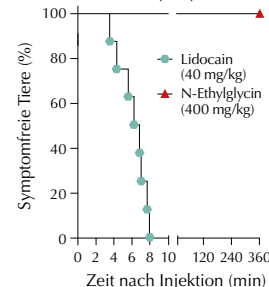


Abb. 4 Systemische Toxizität (n=8)



Regulation der purinergen T-Zell-Aktivierung durch miR-150 bei Patienten mit Sepsis

T. Wöhrle · J. Rink · S. Kreth

Klinik für Anaesthesiologie,
Ludwig-Maximilians-Universität München

Korrespondenz:

E-Mail: tobias.woehrle@med.uni-muenchen.de

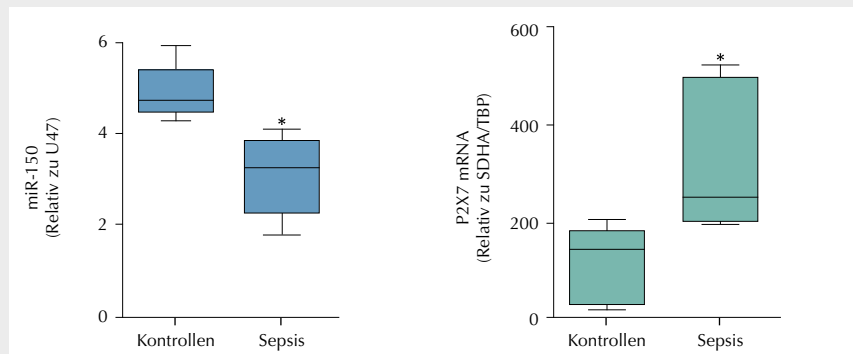
Fragestellung

T-Zellen spielen eine zentrale Rolle bei der Regulation der Immunantwort. Das Verständnis der grundlegenden Mechanismen einer T-Zell-Aktivierung birgt das Potenzial, durch pathologische Immunantworten entstehende Erkrankungen therapeutisch zu beeinflussen. Wir konnten zeigen, dass Stimulation des T-Zell-Rezeptors (TCR) zu einer kontrollierten ATP-Freisetzung führt, welche durch autokrine Aktivierung des purinergen P2X7-Rezeptors, eines ligandengesteuerten Kationenkanals, zu einem Einstrom von Kalzium führt. Hierdurch wird das TCR-Signal amplifiziert und eine funktionelle T-Zell-Antwort ermöglicht [1,2]. Wird P2X7 hohen extrazellulären ATP-Konzentrationen exponiert, wie zum Beispiel im Rahmen von gesteigertem Zelluntergang, wird nicht weiter die Zellaktivierung verstärkt, sondern durch Porenbildung und Caspaseaktivierung die Apoptose der T-Zelle eingeleitet. Die Regulation der P2X7-Expression ist somit für die Modulierung des Aktivitätszustands von T-Zellen von Relevanz. Das vorliegende Forschungsvorhaben befasst sich mit der Frage, ob die P2X7-Rezeptoren durch micro-RNA (mi-RNA) reguliert sind und ob dies eine Rolle im Krankheitsbild der Sepsis spielen könnte.

Methodik

Für sämtliche Blutentnahmen lagen Ethikvotum und Einverständnis des Patienten/Betreuers vor. Die Identifizierung der P2X7-regulierenden miR-150 erfolgte mit Hilfe von bioinformatischen Analysen (TargetScan). Der 3'-UTR des P2X7-Gens wurde mittels PCR amplifiziert und in einen Luciferase-Reporter-Vektor kloniert. HEK293-Zellen wurden mit dem Vektorkonstrukt und einer Vorläufer-miR-150 (pre-miR) bzw. einer Kontroll-miR transfiziert, und die Vektoraktivität

Abbildung



Expression von miR-150 und P2X7 mRNA bei Patienten mit Sepsis vs. Kontrolle.
n=5, *p<0.01

wurde nach 40 h gemessen (n=5). Primäre humane T-Zellen wurden aus Vollblut freiwilliger Spender mittels magnetischer Zellseparation isoliert (n=5), mit pre-miR-150 bzw. Kontroll-miR transfiziert (Elektroporation) und durch Zugabe von CD3/CD28-Microbeads über 4 h stimuliert. Die P2X7- und die IL-2-Expression wurde dann nach RNA-Präparation mittels quantitativer RT-PCR bestimmt. Aus den Zellüberständen wurde IL-2 mittels ELISA quantifiziert. Die Apoptoseinduktion transfizierter T-Zellen wurde 30 min nach Zugabe von 2 mM ATP mittels eines LIVE/DEAD-Kits durchflusszytometrisch analysiert. T-Zellen von Sepsispatienten (n=5) und gesunden Kontrollen (n=5) wurden mittels quantitativer RT-PCR auf den Gehalt an miR-150 und P2X7 mRNA hin untersucht. Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test oder Mann-Whitney-U-Test.

Ergebnisse

Durch Luciferase-Assays konnte die Regulation des P2X7-Rezeptors durch miR-150 bestätigt werden (Verminderung der Vektoraktivität um 40±6%, p<0.01). In vitro stimulierten T-Zellen von Gesunden senkt die Transfektion mit miR-150 die P2X7-mRNA-Expression und die IL-2-Produktion (mRNA-Expression um 41±6%, Protein um 30±10%, p<0.05). Im Vergleich zur Kontrolle ist die Apoptoserate von miR-150-transfizierten T-Zellen nach Zugabe von ATP vermindert (um 25±06%, p<0.05). T-Zellen von Sepsispatienten weisen

im Vergleich zu gesunden Spendern einen signifikant verminderten Gehalt an miR-150 und eine signifikant erhöhte P2X7-mRNA-Expression auf (Abb. 1).

Interpretation

Unsere Experimente identifizieren miR-150 als einen posttranskriptionellen Regulator der P2X7-Expression und somit als einen wichtigen Faktor in den Mechanismen der T-Zell-Aktivierung: Durch Erhöhung der zytosomatischen miR-150-Konzentration in ex vivo stimulierten T-Zellen kann die P2X7-Expression vermindert werden, wodurch sowohl die Zytokinfreisetzung als auch die ATP-induzierte Apoptoserate der T-Zellen gesenkt werden kann. Sepsispatienten weisen in ihren T-Zellen eine verminderte Expression von miR-150 und eine erhöhte P2X7-Expression auf; dies weist auf eine Veränderung des inflammatorischen Potenzials mit erhöhter Apoptosebereitschaft hin.

Literatur

1. Yip L, Woehrle T, Corriden R, et al: Autocrine regulation of T-cell activation by ATP release and P2X7 receptors. *FASEB J* 2009; 23:1685-93
2. Woehrle T, Yip L, Elkhail A, et al: Pannexin-1 hemichannel-mediated ATP release together with P2X1 and P2X4 receptors regulate T-cell activation at the immune synapse. *Blood* 2010; 116:3475-3484.