

Inhalt

C. S. Bruells · I. Bergs · R. Rossaint · J. Du · C. Bleilevens · A. Goetzenich · J. Weis · M. P. Wiggs · S. K. Powers · M. Hein Zeitlicher Verlauf der Proteasenaktivierung nach Induktion einer Ventilator-induzierten diaphragmalen Dysfunktion in einem klinisch relevanten Rattenmodell diaphragmaler Wiederbelastung	337
S. M. Coldewey · M. Collino · M. Rogazzo · N. SA Patel · C. Thiemerann Die Inhibition der IκB-Kinase verbessert die Sepsis-assoziierte myokardiale Dysfunktion bei der Maus	338
M. Derwall · R. Rossaint · G. Marx · M. Fries Der Einsatz einer minimal-invasiven perkutanen Katheterpumpe verdoppelt die Überlebensrate und verbessert das neurologische Ergebnis gegenüber konventioneller Herzdruckmassage in einem Reanimationsmodell beim Hausschwein	339
M. Eberhardt · M. Dux · B. Namer · N. Cordasic · J. Miljkovic · J. de la Roche · M. Fischer · A. Leffler · A. Lampert · J. Jacobi · K. Messlinger · I. Ivanovic-Burmazovic · P. Reeh · M. R Filipovic Die vasoaktive Wirkung von Nitroxyl beruht auf einer TRPA1-vermittelten Freisetzung des Neuropeptids CGRP	340
V.-S. Eckle · C. Grasshoff · M. Leuwer · B. Antkowiak 4-Bromo-Propofol hemmt die Aktivität spinaler Neurone durch eine selektive Modulation extrasynaptischer Glyzin-Rezeptoren	342
I.-C. Eichler · J. Jira · A. Heilek · L. Eichler · V. Spahn · C. Zöllner Hitze- und Kälte-Hyperalgesie beim Opioidentzug: Die Rolle der Transient Receptor Potential Channels TRPM8, TRPA1 und TRPV1	343
A. Grub · S. Bergt · N. Gros · B. Vollmar · G.F.E. Nöldge-Schomburg · J.P. Roesner In einem Mausmodell der kardiopulmonalen Reanimation zeigt der TLR-4 keinen Einfluss auf das Reanimationsergebnis	344
A. Güldner · T. Kiss · T. Bluth · N. Carvalho · T. Quast · S. Kerber · S. Zeidler · P. Pelosi · T. Koch · M. Gama de Abreu Einfluss von Spontanatmung auf pulmonale Inflammation und Lungenschädigung während ultraprotektiver Beatmung beim experimentellen Lungenversagen	345
J. M. Herter · J. Rossaint · H. Block · A. Stadtmann · H. Van Aken · A. Zarbock Die Rolle verschiedener Adhäsionsmoleküle für die Rekrutierung von Leukozyten in die Niere bei zwei Modellen des akuten Nierenversagens	346
J. Heyn · S. Schütz · M. Schmidt · S. Kreth Die Cannabinoid-Rezeptoren 1 und 2 wirken kardioprotektiv und werden durch micro-RNA-494 und micro-RNA-665 reguliert	347
M. Kieffmann · A. Cuvenhaus · V. Balfanz · T. Streichert · A. E. Goetz · R. Kieffmann ADP bewirkt eine Mitochondrien-gesteuerte nukleäre Ca ²⁺ -Signalkaskade in Alveolar-epithelzellen Typ II in vitro	348
K. König · T. Granja · V. Mirakaj · K. Zacharowski · A. Zarbock · P. Rosenberger Der Plexin-C1-Rezeptor verstärkt eine akute Entzündungsreaktion und beeinflusst die Adhäsions- und Migrationseigenschaften von Leukozyten	350
M. Köppen · T. Eckle · S. Kreth · H. K. Eltzschig Protektive Rolle von PMN-exprimiertem HIF1α bei myokardialem Ischämie-Reperfusions-Schaden	351
J. Lermann · M. Schmitz · J. Chun · J. Styppmann · K. C. Wollert · G. Theilmeier Der S1P-Rezeptor-Agonist FTY720 induziert nach Myokardischämie bei der Maus S1P3-abhängig eine myokardiale Hypertrophie und Herzinsuffizienz	352
C. Lotz · T. Tischer-Zeitz · A. Frank · J. Stumpner · N. Roewer · T. M. Smul Die kontinuierliche Gabe von Sevofluran im Vergleich zu Propofol schützt das Herz gegenüber einem Ischämie/Reperfusions-Schaden durch günstige Effekte auf die mitochondriale Respiration	353
V. Mirakaj Die Entzündungresolution wird entscheidend durch Netrin-1 beeinflusst	354
P. Möhnle · S. Schütz · J. Briegel · S. Kreth Beeinflussung der Inhibition der Th1-Differenzierung durch micro-RNA-146a-vermittelte Regulation von PRKCε bei Patienten mit Sepsis	356

Abstracts der 27. Wissenschaftlichen Arbeitstage der DGAI

22. - 23.02.2013, 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 22. - 23.02.2013 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 2014 der Fresenius-Stiftung und das DGAI-Forschungsstipendium der Fresenius-Stiftung finden Sie auf der Seite 334.

Ausschreibung des DGAI-Forschungsstipendiums der Fresenius-Stiftung

Die 28. Wissenschaftlichen Arbeitstage der Deutschen Gesellschaft für Anästhesiologie und Intensivmedizin (DGAI) werden vom **14. - 15.02.2014** 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.

2014 wird das DGAI-Forschungsstipendium der Fresenius-Stiftung für eine hervorragende Forschungsarbeit mit 15.000 € dotiert. Grundlagenforschung und klinische Forschung sollen gleichermaßen gefördert werden.

Einsendeschluss:
06.01.2014

Nähere Informationen:

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

Anschrift:

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

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

27. Wissenschaftliche Arbeitstage der DGAI

22. - 23.02.2013 · Würzburg

B. Oehler · D. Pflücke · K. Hill · M. Schaefer · N. Roewer · A. Brack · H. Rittner	357
Oxidierte Phospholipide als Target bei Entzündung und Schmerz bei Ratten	
P. Paulus · B. Scheller · K. Zacharowski	358
VEGF-A-Blockade reduziert das Reperfusionsödem, aber nicht die Ischämie-bedingte Inflammation nach orthotoper Lungentransplantation bei der Ratte	
D. M. Pöpping · N. Elia · H. Van Aken · M. R. Tramèr · E. Marret · St. S. Schug · M. Wenk · P. Kranke	360
Mögliche Auswirkungen der Epiduralanalgesie auf Morbidität und Letalität nach großen chirurgischen Eingriffen. Eine systematische Übersichtsarbeit mit Meta-Analyse	
J. Rossaint · H. Van Aken · A. Zarbock	361
Die reduzierte Formation von Neutrophil Extracellular Traps (NETs) durch Inhibition der CXCL4/CCL5-Heteromerbildung mildert das akute Lungenversagen	
S. Sauer · D. Hackel · B. Niedermirtl · C. Staat · I. Blasig · N. Roewer · H. L. Rittner · A. Brack	362
Verträglichkeit und Wirkmechanismen von Claudin-1-Interferenzpeptiden (C1C2) zur Öffnung des Perineuriums für eine Regionalanalgesie bei Ratten	
S. T. Schäfer · M. Adamzik · S. Frede · J. Walden · N. Schönborn · J. Fandrey · A. Limmer · J. Peters	364
Toll-like-Rezeptor-Liganden supprimieren die Immunantwort bei Sepsis: In-vitro-Versuche, Experimente an TLR-9-knockout-Mäusen und klinische Daten	
M. A. Schick · S. Flemming · J. Wollborn · W. Baar · C. T. Germer · N. Roewer · N. Schlegel · C. Wunder	365
Phospodiesterase-4-Inhibition verbessert die mesenterale Mikrozirkulation durch die Reduktion der endothelialen Schrankenstörung in der polymikrobiellen Sepsis bei Ratten	
R. Schier · V. Schick · H. Marcus · B. Riedel	366
Anstieg von proangiogenen Zellen nach präoperativer Spiroergometrie assoziiert mit postoperativen Komplikationen	
C. I. Schwer · T. Loop · M. Humar	368
Thiopental hemmt in vitro die globale Proteinbiosynthese durch Inhibition des eukaryotischen Elongationsfaktors eEF2 und schützt vor Hypoxie-induziertem neuronalem Zelltod	
A. Sebastiani · M. K. Schäfer · A. Ditter · E.-V. Schaible · C. Luh · C. Werner · K. Engelhard · S. C. Thal	369
Eine posttraumatische Propofolgabe vergrößert den sekundären Hirnschaden nach experimentellem Schädel-Hirn-Trauma im Mausmodell	
P. M. Spieth · T. Bluth · H. Krause · M. Lippmann · N. Oppermann · R. Huhle · I. Rentzsch · T. Koch · M. Gama de Abreu	370
Effekte von variablen Tidalvolumina auf Gasaustausch, Lungenmechanik und Inflammation bei lungengesunden sowie akut und chronisch lungengeschädigten Ratten	
C. Stoetzer · T. Doll · S. Reuter · N. Foadi · J. de la Roche · J. Ahrens · A. Leffler	372
Ist eine selektive Inhibition einzelner Natriumkanäle ein molekulares Korrelat für die geringe Kardiotoxizität und die präferentiell sensorische Blockade durch Ropivacain?	
S. C. Thal · D. Yang · A. Sebastiani · C. Reiß · K. Jurk · M. Schäfer · C. Werner · K. Engelhard	373
Eine über Blockade der thrombozytären P_2Y_{12} -Rezeptoren vermittelte Verringerung der posttraumatischen Hyperkoagulation reduziert den sekundären Hirnschaden nach Schädel-Hirn-Trauma	
T. Tischer-Zeitz · J. Stumpner · C. Lotz · A. Frank · M. Lange · N. Roewer · T. Smul	374
Die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II β ist essentiell für die Kardioprotektion durch Desfluran-induzierte Präkonditionierung: Ergebnisse einer Knockout-Studie	
J. Tschoß · D. Siegl · N. Huber · A. Martignoni · P. Conzen · T. Annecke	375
Adipositas-bedingte Leptinämie verbessert Entzündungsantwort Immunabwehr und Sepsisverlauf bei der Maus	
M. Velten · R. D. Britt Jr. · T. E. Tipple · G. Baumgarten · A. Hoeft · S. J. Allen · L. K. Rogers	376
Docosahexaensäure (DHA)-Supplementierung während Schwangerschaft und Stillzeit vermindert eine durch perinatale Inflammation verursachte pulmonale Fibrose	
N.-M. Wagner · L. Bierhansl · G. E. F. Nöldge-Schomburg · B. Vollmar · J. P. Roesner	378
Die pro-angiogene Wirkung einer TLR2-Inhibition geht mit einer verbesserten regenerativen Funktion knochenmarkstämmer Stammzellen einher	
B. Wissowa · T. Hoshi · S. Stehr · S. H. Heinemann · M. Bauer	379
Bedeutung des Slo1-Kanals für die Blutdruckregulation unter intensivmedizinisch relevanten Bedingungen bei der Maus	

Zeitlicher Verlauf der Proteasenaktivierung nach Induktion einer Ventilator-induzierten diaphragmalen Dysfunktion in einem klinisch relevanten Rattenmodell diaphragmaler Wiederbelastung

C. S. Brueells^{1,2} · I. Bergs¹ · R. Rossaint¹ · J. Du¹ · C. Bleilevens¹ · A. Goetzenich⁴ · J. Weis² · M. P. Wiggs³ · S. K. Powers³ · M. Hein¹

1 Klinik für Anästhesiologie,

2 Institut für Neuropathologie und JARA – Translational Brain Medicine,
Universitätsklinikum Aachen

3 Department of Applied Physiology and Kinesiology, University of Florida, Gainesville (USA)

4 Klinik für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie, Universitätsklinikum Aachen

Korrespondenz: cbrueells@ukaachen.de

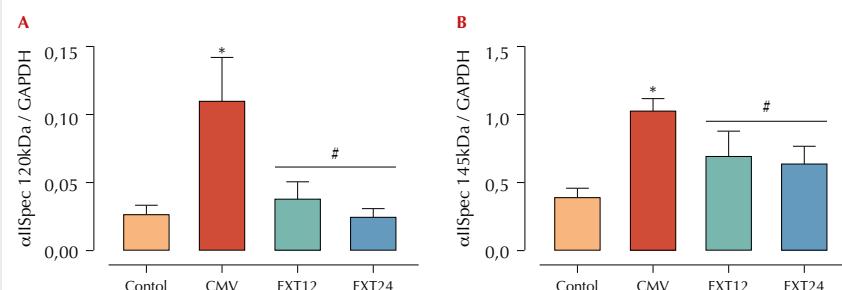
Fragestellung

Mechanische Beatmung (MV) ist eine lebensrettende Maßnahme für Patienten mit respiratorischer Insuffizienz. Sowohl tierexperimentelle als auch klinische Studien zeigen einen von der Beatmungsdauer abhängigen Verlust der Kontraktionskraft und Faseratrophie (Ventilator induzierte Diaphragmale Dysfunktion, VIDD) [1]. VIDD ist bereits nach 12 h Beatmung nachweisbar, und die resultierende Schwäche des Diaphragmas kann profunden Einfluss auf die Beatmungsentwöhnung haben. Die zu Grunde liegende Pathophysiologie basiert auf einer erhöhten Produktion von Sauerstoffradikalen (reactive oxygen species, ROS) [2]. Durch den erhöhten oxidativen Stress werden Proteine oxidiert und nachfolgend leichter von Proteasen abgebaut. Es ist nicht bekannt, wie schnell sich das Diaphragma nach Beendigung der Beatmung erholt. Die vorliegenden Experimente untersuchen den Zeitverlauf diaphragmaler Erholung. Als Hypothese wurde angenommen, dass die diaphragmale Funktion nach 24 h wieder auf Kontrollniveau zurückkehrt.

Methodik

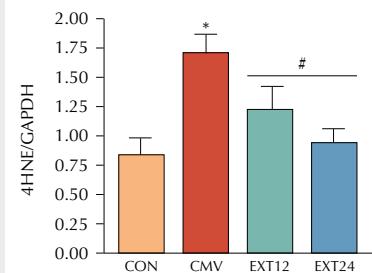
Weibliche Sprague-Dawley-Ratten (300g, je 8 pro Gruppe) wurden intubiert und 12 h kontrolliert beatmet. Nach Erwachen wurden die Tiere extubiert und erholten sich für 12 h (EXT12) oder 24 h (EXT24). Im Anschluss erfolgte unmittelbar die Euthanasie. Nicht beatmete Tiere (CON) und für 12 h beatmete Tiere (CMV) dienten als Kontrollen. Nach Euthanasie wurde ein Diaphragma Streifen vertikal in ein Organbad eingehängt und die tetanische Kraft bei 160 Hz gemessen, das

Abbildung 1



Zeitlicher Verlauf der Akkumulation spezifischer Spaltprodukte (α -II-Spectrin) von Caspase 3 (A) und Calpain 1 (B) * p<0.05 CMV vs. Control, # p<0.05 EXT12/24 vs. CMV.

Abbildung 2



Akkumulation oxiderter Proteine während MV und Zeitverlauf des Abbaus nach Extubation.

* p<0.05 CMV vs. Control,

p<0.05 EXT12/24 vs. CMV

aktivität reduziert sich nach 12 h und 24 h Erholung. Unsere Daten demonstrieren, dass die Oxidation von Proteinen nicht die vorherrschende Ursache des Kontraktionsdefizits der VIDD ist.

Literatur

- Hudson MB, Smuder AJ, Nelson WB, Brueells CS, Levine S, Powers SK: Both high level pressure support ventilation and controlled mechanical ventilation induce diaphragm dysfunction and atrophy. Crit Care Med 2012;40(4):1254-1260
- Powers SK, Hudson MB, Nelson WB, Talbert EE, Min K, Szeto HH, et al: Mitochondria-targeted antioxidants protect against mechanical ventilation-induced diaphragm weakness. Crit Care Med 2011;39(7):1749-1759
- Nelson WB, Smuder AJ, Hudson MB, Talbert EE, Powers SK: Cross-talk between the calpain and caspase-3 proteolytic systems in the diaphragm during prolonged mechanical ventilation. Crit Care Med 2012;40(6):1857-1863.

Die Inhibition der I κ B-Kinase verbessert die Sepsis-assoziierte myokardiale Dysfunktion bei der Maus

S. M. Coldewey^{1,2} · M. Collino³ · M. Rogazzo³ · N. SA Patel¹ · C. Thiemerann¹

1 Queen Mary University of London, The William Harvey Research Institute, Barts and The London School of Medicine & Dentistry, 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
coldewey.sina@mh-hannover.de

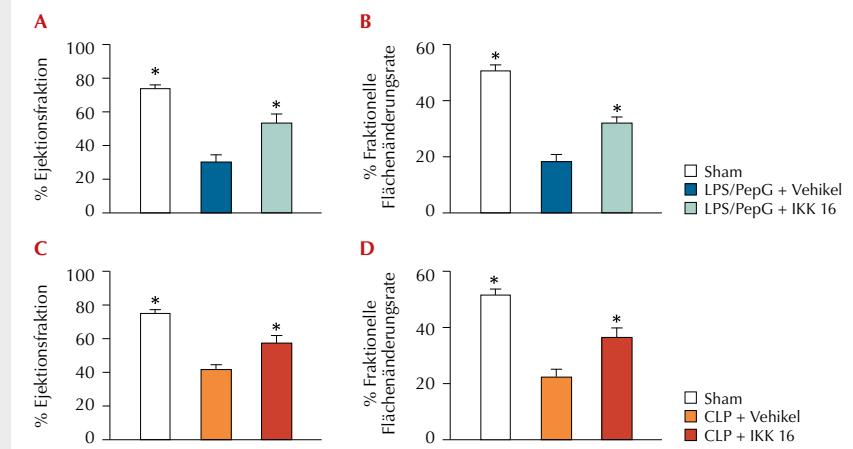
Fragestellung

Die myokardiale Dysfunktion tritt bei ca. 40% der Patienten mit schwerer Sepsis oder septischem Schock auf und ist klinisch durch eine verminderte Ejektionsfraktion, eine verminderte Kontraktilität sowie eine Dilatation des Ventrikels charakterisiert [1,2]. Wir konnten kürzlich zeigen, dass Erythropoietin die Sepsis-assoziierte myokardiale Dysfunktion bei der Maus signifikant verbessert und dieser positive Effekt unter anderem mit einer Inhibition der Aktivierung des Nuklear Faktor (NF)- κ B einhergeht. Es ist bekannt, dass der NF- κ B-Proteinkomplex als Transkriptionsfaktor unter anderem von großer Bedeutung für die Regulation von Entzündungsprozessen ist. Er kann durch die I κ B-Kinase (IKK) aktiviert werden. In dieser Studie untersuchen wir im Mausmodell erstmals den Effekt des selektiven IKK-Inhibitors IKK 16 auf die Sepsis-assoziierte myokardiale Dysfunktion sowie zugrunde liegende zelluläre Signaltransduktionswege.

Material/Methodik

Die Untersuchungen zur Sepsis-assoziierten myokardialen Dysfunktion wurden in zwei unterschiedlichen murinen Modellsystemen durchgeführt, bei denen entweder junge Mäuse (C57BL/6; 2 Monate alt; n=29) die bakteriellen Zellwandkomponenten Lipopolysaccharid (LPS) und Peptidoglycan (PepG) erhielten oder ältere Mäuse (C57BL/6; 8 Monate alt; n=36) einer zäkalen Ligatur und Punktion (CLP) zur Auslösung einer polymikrobiellen Sepsis unterzogen wurden. Eine Stunde nach Intervention erhielten die Mäuse entweder 1 mg/kg IKK 16 (Tocris Bioscience) oder Vehikel (5 ml/kg KG 10% DMSO) intravenös. Nach 24 h wurden echokardiographisch die prozentuale Ejektionsfraktion (EF), die Verkürzungsfaktion (FS) und die fraktionelle Flächenänderungsrate (FAC) bestimmt und die Expression ausgewählter Signalmoleküle im Herzen mittels semi-quantitativer Western-Blot-Analysen

Abbildung 1



Einfluss des IKK-Inhibitors IKK 16 auf die sepsis-assoziierte myokardiale Dysfunktion in der Maus.

Die Mäuse entwickelten 24 h nach Verabreichung von LPS/PepG (**A, B**) oder nach CLP-Chirurgie (**C, D**) echokardiographisch im Vergleich zu scheinbehandelten Tieren (Sham) eine signifikante Reduktion der prozentualen Ejektionsfraktion (**A, C**) und der fraktionellen Flächenänderungsrate (**B, D**). Durch die Verabreichung von IKK 16 verbessern sich diese Parameter in beiden Modellsystemen signifikant (**A-D**). Werte sind als Mittelwert +/- Standardfehler des Mittelwerts angegeben. Es erfolgte eine univariate Varianzanalyse, gefolgt vom Dunnet's Post Hoc Test. P < 0,05 wurde als signifikant erachtet. Es wurden n Tiere untersucht.

A und B LPS/PepG Modell: Sham (n=10); LPS/PepG + Vehikel (n=9); LPS/PepG + IKK 16 (n=10).

B und C CLP Modell: Sham (n=12); CLP + Vehikel (n=12); CLP + IKK 16 (n=12).

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

Ergebnisse

Die Mäuse entwickelten 24 h nach Injektion von LPS/PepG oder CLP im Vergleich zu scheinbehandelten Tieren eine signifikante Reduktion der echokardiographisch bestimmten Parameter EF, FS und FAC und damit eine kardiale Dysfunktion (Abb. 1). Durch die Behandlung mit IKK 16 verbesserten sich EF, FS und FAC in beiden Modellsystemen signifikant (Abb. 1). Semi-quantitative Western-Blot-Analysen der Herzen der LPS/PepG- und der CLP-Gruppe zeigten im Vergleich zu scheinbehandelten Tieren eine signifikante Zunahme des Phosphorylierungsgrads des NF- κ B-Inhibitors alpha (I κ B α) sowie eine Zunahme der nukleären Translokation der p65-Untereinheit von NF- κ B (Aktivierung von NF- κ B). Die Behandlung mit IKK 16 wiederum führte zu einer signifikanten Reduktion des Phosphorylierungsgrads von I κ B α als auch der nukleären Translokation von p65 (Inaktivierung von NF- κ B).

Interpretation

Die einmalige Verabreichung des spezifischen IKK-Inhibitors IKK 16 verbesserte in unserer Studie signifikant die Sepsis-assoziierte kardi-

ale Dysfunktion sowohl bei jungen als auch bei älteren Mäusen. Dies ging einher mit einer Abnahme des Phosphorylierungsgrads von I κ B α und einer reduzierten nukleären Translokation der NF- κ B-Untereinheit p65. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Hemmung der NF- κ B-Aktivierung (zumindest teilweise) für die beobachteten positiven Effekte von IKK-16 ursächlich verantwortlich ist.

SMC wurde durch ein Forschungsstipendium der DFG (CO 912/1-1 und CO 912/1-2) gefördert.

Literatur

- Flynn A, Chokkalingam Mani B, Mather PJ: Sepsis-induced cardiomyopathy: a review of pathophysiological mechanisms. Heart failure rev 2010;15:605-611
- Romero-Bermejo FJ, Ruiz-Bailén M, Gil-Cebrián J, Huertos-Ranchal MJ: Sepsis-induced cardiomyopathy. Curr cardiol rev 2011;7:163-183
- Coldewey SM, Khan AI, Kapoor A, Collino M, Rogazzo M, Brines M, et al: Erythropoietin attenuates acute kidney dysfunction in murine experimental sepsis by activation of the β -common receptor. Kidney Int 2013 Apr 17. doi: 10.1038/ki.2013.118. [Epub ahead of print].

Der Einsatz einer minimal-invasiven, perkutanen Katheterpumpe verdoppelt die Überlebensrate und verbessert das neurologische Ergebnis gegenüber konventioneller Herzdruckmassage in einem Reanimationsmodell beim Hausschwein

M. Derwall^{1, 2} · R. Rossaint^{1, 2} · G. Marx^{1, 2} · M. Fries¹

1 Klinik für Anästhesiologie,

2 Klinik für Operative Intensivmedizin und Intermediate Care,
Universitätsklinikum Aachen

Korrespondenz: mderwall@ukaachen.de

Fragestellung

Manuelle Thoraxkompressionen können selbst unter idealen Bedingungen maximal 25% der normalen Organperfusion von Herz und Gehirn bereitstellen. [1] Experimentelle Daten aus Open-Chest-Modellen zeigen, dass ein für den Einsatz in der Herzinsuffizienz entwickeltes minimal-invasives LVAD (linksventrikuläres Herzunterstützungssystem) nicht nur bei Herzinsuffizienz, sondern auch im Herz-Kreislaufstillstand eine zerebrale Perfusion von 65% und eine myokardiale Perfusion von 74% des Ausgangsniveaus erzielen kann. [2] Ungeklärt ist jedoch weiterhin: 1. Kann eine Reanimation mittels LVAD die Überlebensrate (Return of spontaneous circulation – ROSC) gegenüber der konventionellen Reanimation mittels Herzdruckmassage verbessern? 2. Führt die verbesserte Organperfusion während der Reanimation zu einem geringeren neurokognitiven Schaden nach überlebter Reanimation?

Methodik

Nach Genehmigung durch die zuständige Tierschutzbehörde (AZ.: 84-02.04.2011.A095) wurden die beschriebenen Versuche entsprechend der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Nach Narkoseeinleitung und endotrachealer Intubation wurden 20 Hausschweine (Deutsche Landrasse, 35-40kg, männlich) mit einer femoralarteriellen Blutdruckmessung,

einem pulmonalarteriellen Katheter sowie einem Schrittmacher-Katheter zur Induktion des Kammerflimmerns im rechten Ventrikel versehen. Die 10 Tiere der Interventionsgruppe wurden zusätzlich mit einem LVAD (Impella 2.5, Abiomed, Aachen) bestückt. Nach 10 Minuten un behandelten Kammerflimmerns wurde mittels eines mechanischen Hilfsgerätes (Michigan Thumper 1007, Michigan Instruments, Grand Rapids, USA) eine standardisierte externe Herzdruckmassage mit einer Frequenz von 100/min begonnen (CPR, n=10), oder das LVAD mit der maximal möglichen Flussrate aktiviert (LVAD, n=10). Eine zusätzliche Herzdruckmassage fand hier nicht statt. Nach insgesamt 6 Minuten Reanimation wurden mittels eines Defibrillators bis zu drei Schocks eines biphasischen Stroms von 150J appliziert. Das Tier wurde dann als erfolgreich reanimiert klassifiziert, wenn ein organisierter Herzrhythmus mit einem mittleren arteriellen Blutdruck von 60 mmHg für 5 Minutenpersistierte. Waren die Reanimationsbemühungen erfolglos, wurde erneut mit den Reanimationsbemühungen begonnen und diese für maximal 3 weitere Zyklen fortgesetzt. Wies das Tier auch zu diesem Zeitpunkt keinen spontanen Kreislauf auf, wurde das Tier als nicht reanimiert klassifiziert. Tiere mit spontanem Kreislauf wurden für 2 Stunden überwacht, bevor sie vom Beatmungsgerät entwöhnt und in ihre Käfige zurückgebracht wurden. Das neurokognitive Ergebnis wurde mittels eines für Schweine modifizierten neurokognitiven Defizit-Scores (NDS, nach [3]) während einer bis zu vier Tage dauernden Nachbeobachtungsperiode ermittelt, bei dem ein Wert von 0 keine Einschränkung bedeutet und 100 den Hirntod anzeigt. Eine vorab durch geführte Fallzahlabschätzung ergab, dass die gewählte Gruppengröße ausreicht, um eine Verbesserung des funktionellen Ergebnisses um 20% zu detektieren (power: 80%; alpha 0,05). Für metrische Variablen wurde ein t-Test für verbundene oder unverbundene Stichproben nach Bonferroni-Adjustierung, für nominal-skalierte der exakte Test nach Fisher durchgeführt. Alle Ergebnisse werden als Anzahl oder Mittelwert ± Standardabweichung präsentiert. Ein p-Wert≤0,05 wurde als statistisch signifikant erachtet.

Ergebnisse

Im Mittel konnte das LVAD einen Blutfluss von $1,4 \pm 0,0$ L/min während der Reanimation generieren (32% des Ausgangs-Herzminutenvolumens von $4,3 \pm 0,4$ L/min), was einen Anstieg des arteriellen Mitteldrucks von 16 ± 9 mmHg nach 10 Minuten Herz-Kreislaufstillstand auf 32 ± 11 mmHg kurz vor der Defibrillation bewirkte ($p < 0,05$ für MAP 10 vs. 16 min). Während sämtliche Tiere (n=10) in der LVAD-Gruppe einen ROSC zeigten, konnte dies nur bei der Hälfte der Kontrolltiere (n=5) beobachtet werden ($p = 0,033$). In überlebenden Tieren beider Gruppen unterschieden sich die hämodynamischen Parameter weder vor, während, noch nach der Reanimation. Am ersten und zweiten postoperativen Tag zeigten die Tiere in der LVAD-Gruppe jedoch ein signifikant besseres Ergebnis im NDS (50 ± 28 vs. 93 ± 14 an Tag 1, $p < 0,01$; 57 ± 31 vs. 93 ± 21 an Tag 2, $p < 0,01$).

Interpretation

Eine intravaskuläre Reanimation mittels einer axialen Mikropumpe verdoppelte das Überleben und verbesserte das neurokognitive Ergebnis im Vergleich zur konventionellen Herzdruckmassage in einem Modell des prolongierten Herz-Kreislauf-Stillstandes und der Reanimation. Bei weiterhin positiven Resultaten in weiterführenden Untersuchungen könnte dieses Verfahren in Zukunft eine alternative Option für die kardiopulmonale Reanimation auch bei nicht kardiochirurgischen Patienten darstellen.

Literatur

- Andreka P, Frenneaux MP: Haemodynamics of cardiac arrest and resuscitation. Curr Opin Crit Care 2006;12:198-203
- Tuseth V, Salem M, Pettersen R, Grong K, et al: Percutaneous left ventricular assist in ischemic cardiac arrest. Crit Care Med 2009;37:1365-72
- Bircher N, Safar P: Cerebral preservation during cardiopulmonary resuscitation. Crit Care Med 1985;3:185-90.

Die vasoaktive Wirkung von Nitroxyl beruht auf einer TRPA1-vermittelten Freisetzung des Neuropeptids CGRP

M. Eberhardt^{1,2} · M. Dux^{2,5} · B. Namer² · N. Cordasic⁴ · J. Miljkovic³ · J. de la Roche¹ · M. Fischer² · A. Leffler¹ · A. Lampert² · J. Jacobi⁴ · K. Messlinger² · I. Ivanovic-Burmazovic³ · P. Reeh² · M. R Filipovic³

1 Abteilung für Anästhesiologie und Intensivmedizin, Medizinische Hochschule Hannover
2 Institut für Physiologie und Pathophysiologie,
3 Lehrstuhl für Bioanorganische Chemie,
4 Medizinische Klinik IV,
Universitätsklinikum Erlangen
5 Institut für Physiologie,
Universität Szeged (Ungarn)

Korrespondenz:
eberhardt.mirjam@mh-hannover.de

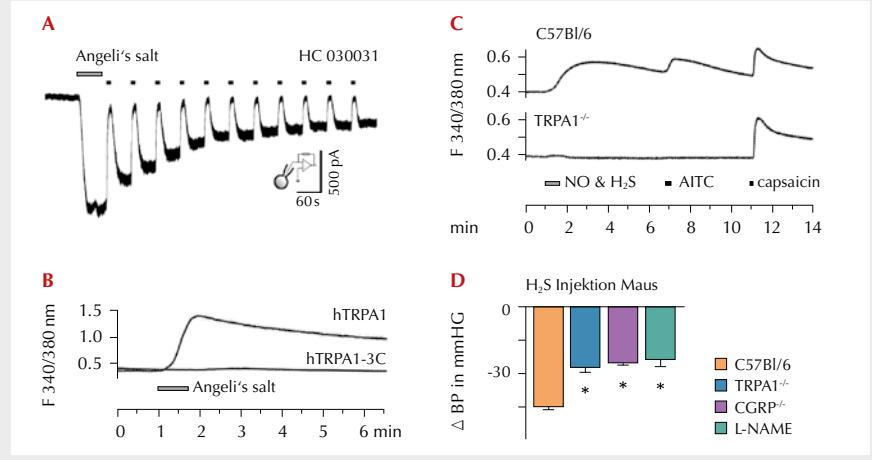
Fragestellung

Nitroxyl (HNO), ein Derivat von Stickstoffmonoxid (NO), induziert über bislang unbekannte Mechanismen eine starke Vasodilatation und zugleich positiv inotrope Effekte [1]. Diese potentiell protektiven kardiovaskulären Effekte werden über NO-unabhängige Mechanismen vermittelt, die u.a. zu einer Freisetzung des vasoaktiven Neuropeptids calcitonin gene-related peptide (CGRP) führen [2]. Die Reduktion von NO durch den Gasotransmitter H₂S könnte Teil endogener HNO-Entstehung und damit auch der Kreislaufregulation sein. In der vorliegenden Arbeit wurde der Membran-Rezeptor TRPA1 als mögliches Effektormolekül für HNO untersucht, da bekannt ist, dass HNO mit Cysteinen reagiert. TRPA1 wird durch eine Modifikation von intrazellulären Cysteinen aktiviert [3] und vermittelt eine starke Freisetzung von CGRP.

Methodik

Mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen wurde untersucht, ob die Interaktion zwischen NO und H₂S in einer relevanten HNO-Produktion in sensorischen Neuronen resultiert. Mittels Calcium Imaging und Patch Clamp Technik wurde auf zellulärer Ebene untersucht, ob TRPA1 durch HNO oder Koapplikation von NO und H₂S aktiviert wird. Mittels ELISA wurde CGRP-Freisetzung aus präparierten Nerven von Ratten und Mäusen gemessen. Die systemische Wirkung von HNO bzw. von NO und H₂S wurde an narkotisierten Mäusen untersucht (Haltung und Tötung der Tiere gemäß TierSchutzG, Tierschutzanträge für RR-Messungen an narkotisierten Mäusen vorliegend).

Abbildung 1



Ergebnisse

Die intrazelluläre HNO-Konzentration in Spinalganglionzellen (DRGs) ist von der Bildung der Gasotransmitter NO und H₂S abhängig und ist im Vergleich zur Kontrolle durch Blockade der verantwortlichen Enzyme um $45.5 \pm 3\%$ reduziert. Patch Clamp (Abb. A) und Calcium Imaging (Abb. B) Experimente zeigten, dass HNO als direkter Agonist an heterolog exprimierten TRPA1 Rezeptoren wirkt. Dieser Effekt ist nicht an der Mutante hTRPA1-C621S/C641S/C665S (hTRPA1-3C) nachweisbar (Abb. B), bei der N-terminale Cysteine, die zur Aktivierung durch reaktive Substanzen notwendig sind [3], ausgetauscht wurden. DRGs von Wildtyp-Mäusen reagieren auf die Applikation von HNO oder der Kombination NO und H₂S mit einem starken Calciumeinstrom, nicht aber Neurone von TRPA1-knockout-Mäusen (Abb. C). Behandlung exzidiert Ischiadicusnerven von Mäusen mit HNO setzt CGRP frei (188.5 ± 47 pg/ml), nicht aber aus Nerven von TRPA1-knockout-Mäusen (10.2 ± 4 pg/ml; $p=0.003$; U-test). Injektion von HNO-Donatoren (Angeli's salt) führt bei Isofluran-narkotisierten Mäusen zum Blutdruckabfall (18.8 ± 1 mmHg), weniger jedoch bei TRPA1-knockout-Mäusen (8.8 ± 1 mmHg; $p=0.001$; U-test). Während Injektion von H₂S bei Isofluran-narkotisierten Mäusen ebenfalls den Blutdruck senkt, ist dies abhängig von endogener NO-Produktion und wird durch die Vorbehandlung der Tiere mit NO-Synthaseinhibitoren verhindert. Ebenfalls ist der H₂S-induzierte Blutdruckabfall bei TRPA1- und CGRP-knockout-Mäusen reduziert (Abb. D).

Interpretation

Unsere Daten legen eine Reaktion von NO und H₂S auf zellulärer Ebene und die endogene Produktion von HNO nahe. Durch Aktivierung von TRPA1 und den nachfolgenden Calciumeinstrom wird das Neuropeptid CGRP freigesetzt. Dieses führt zur Vasodilatation und somit zum Blutdruckabfall bei narkotisierten Mäusen. Die Aufklärung dieses HNO/TRPA1/CGRP-Signalweges könnte bei kardiovaskulären Erkrankungen von pathophysiologischer und therapeutischer Relevanz sein.

Literatur

- Irvine JC, Ritchie RH, Favaloro JL, Andrews KL, Widdop RE, et al: Nitroxyl (HNO): The Cinderella of the nitric oxide story. Trends Pharmacol Sci 2008;29:601-608
- Paolocci N, Saavedra WF, Miranda KM, Martignani C, Isoda T, Hare JM, Espey MG, Fukuto JM, Feelisch M, Wink DA, Kass DA: Nitroxyl anion exerts redox-sensitive positive cardiac inotropy in vivo by calcitonin gene-related peptide signaling. Proc Natl Acad Sci U S A 2001;98(18):10463-8
- Hinman A, Chuang HH, Bautista DM, Julius D: TRP channel activation by reversible covalent modification. Proc Natl Acad Sci U S A 2006;103(51):19564-8.

4-Bromo-Propofol hemmt die Aktivität spinaler Neurone durch eine selektive Modulation extrasynaptischer Glyzin-Rezeptoren

V.-S. Eckle¹ · C. Grasshoff¹ · M. Leuwer² · B. Antkowiak¹

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

2 Universität Liverpool (Großbritannien)

Korrespondenz:

Veit-Simon.Eckle@uni-tuebingen.de

Fragestellung

Glyzin-sensitive Glyzin-Rezeptoren des Rückenmarks sind an der sensorischen Verarbeitung von Schmerzreizen und an der Kontrolle motorischer Signale beteiligt [1]. Bisher sind keine selektiven Glyzin-Rezeptor-Modulatoren bekannt. Derartige Substanzen könnten zur Therapie von Rückenschmerzen oder zur Muskelrelaxierung eingesetzt werden [1]. In einer Pilotstudie konnten wir zeigen, dass die Substanz 4-Bromo-Propofol selektiv über Glyzin-Rezeptoren die spontane Netzwerk-Aktivität im spinalen Vorderhorn *in vitro* hemmt [2]. Ziel der vorliegenden Studie ist es, die Qualität der Modulation glyzinergen Ströme im Rückenmark durch 4-Bromo-Propofol zu definieren.

Methodik

Dem Regierungspräsidium Tübingen wurden die Organentnahmen angezeigt. Schwangere Mäuse wurden in tiefer Narkose dekapitiert. Den präparierten Embryonen wurde spinale Gewebe entnommen und für 12-14 Tage kultiviert. Mithilfe von elektrophysiologischen Ganzzell-Ableitungen wurden die Effekte von 4-Bromo-Propofol auf synaptische und extrasynaptische Glyzin-Rezeptoren des spinalen Vorderhorns *in vitro* im Vergleich mit Propofol gemessen. Pharmakologisch wurden glyzinerge Ströme mit Bicucullin (100 µM) und GABAergic Ströme mit Strychnin (1 µM) isoliert. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte±S.E.M. dargestellt. Zur statistischen Auswertung verwendeten wir ANOVA

mit einer Newman-Keuls Post-hoc-Testung. Ein signifikanter Unterschied wurde bei einem p<0,05 definiert.

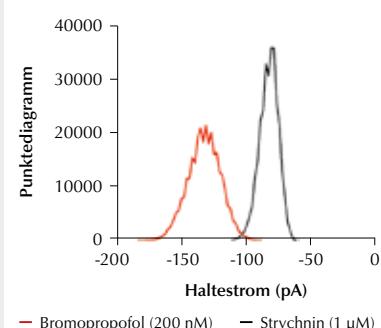
Ergebnisse

4-Bromo-Propofol (200 nM) induzierte über extrasynaptische Glyzin-Rezeptoren einen tonischen Strom, der durch den Glyzin-Rezeptor-Antagonisten Strychnin (1 µM) aufgehoben werden konnte (Abb.1; 4-Bromo-Propofol 65,1±9,9 pA (n=7), Schein-Applikation 22,2±5,1 pA (n=6), Propofol 20,1±10,4 (n=8), p<0,01 mit ANOVA). Im Gegensatz dazu konnte kein signifikanter Effekt von 4-Bromo-Propofol (50, 200 nM) und Propofol (200 nM) auf die synaptische Übertragung des glyzinergen Rezeptorsystems festgestellt werden. Die Abklingzeiten und die Amplituden der inhibitorischen synaptischen Ströme unterschieden sich unter Anwendung von 4-Bromo-Propofol und Propofol nicht von der Schein-Applikation (n=26, p>0,05 mit ANOVA). Da Propofol ein typischer GABA(A)-Rezeptor-Modulator ist [3], wurde auch die Wirkung von Propofol (200 nM) und 4-Bromo-Propofol (50, 200 nM) in niedrig nanomolaren Konzentrationen auf die GABAergic synaptische Übertragung untersucht. Auch hier konnte kein signifikanter Effekt unter der Anwendung von Propofol oder 4-Bromo-Propofol im Vergleich zur Schein-Applikation auf die Abklingzeiten und Amplituden der GABAergic inhibitorischen synaptischen Ströme festgestellt werden (n=23, p>0,05 mit ANOVA).

Interpretation

Diese Studie zeigt, dass 4-Bromo-Propofol (200 nM) einen tonischen Strom induziert, der wahrscheinlich durch einen extrasynaptisch lokalisierten Subtypen des Glyzin-Rezeptors vermittelt wird. Dieser Subtyp wird im Juvenilstadium in hohen Dichten exprimiert, ist aber auch im adulten Organismus wesentlich an der glyzinergen Inhibition im Rückenmark beteiligt. Vergleichbare Effekte könnten für die Ausgangssubstanz Propofol in dieser niedrig nanomolaren Konzentration nicht festgestellt werden. Diese selektive Wirkung von 4-Bromo-Propofol kann die Hemmung der spontanen Netzwerk-Aktivität im Vorderhorn erklären, die in den Messungen des

Abbildung 1



Der mittlere Haltestrom liegt beim gezeigten repräsentativen Experiment bei -133 pA unter Bromopropofol-Anwendung und verschiebt sich nach Strychnin-Gabe zu -86 pA.

Pilotprojektes festgestellt wurde [2]. Mit der vorliegenden Studie wird erstmals ein selektiver Glyzin-Rezeptor-Modulator beschrieben und der zugrunde liegende Mechanismus definiert. Substanzen, die wie 4-Bromo-Propofol halogenierte Propofole sind, könnten zukünftig Bedeutung in der Entwicklung neuer Schmerztherapeutika und Muskelrelaxanzien gewinnen, die selektiv die Informationsverarbeitung auf Rückenmarksebene beeinflussen.

Literatur

- Laube B, Maksay G, Schemm R, Betz H: Modulation of glycine receptor function: a novel approach for therapeutic intervention at inhibitory synapses? *Trends Pharmacol Sci* 2002;23:519-27
- Eckle VS, Antkowiak B, Grasshoff C, O'Neill PM, Berry NG, Leuwer M: Bromo-Propofol hemmt die spinale Aktivität im Vorderhorn selektiv über Glyzin- und nicht GABA(A)-Rezeptoren. *Anästh Intensivmed* 2012;53:S416 [DAC Abstract]
- Jurd R, Arras M, Lambert S, Drexler B, Siegwart R, Crestani F, Zaug M, Vogt KE, Ledermann B, Antkowiak B, Rudolph U: General anesthetic actions *in vivo* strongly attenuated by a point mutation in the GABA(A) receptor beta3 subunit. *FASEB J* 2003;17:250-2.

Hitze- und Kälte-Hyperalgesie beim Opioidentzug: Die Rolle der Transient Receptor Potential Channels TRPM8, TRPA1 und TRPV1

I.-C. Eichler¹ · J. Jira¹ · A. Heilek¹ · L. Eichler¹ · V. Spahn² · C. Zöllner¹

1 Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

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

Korrespondenz: i.eichler@uke.de

Einleitung

Der Opioidentzug führt in zahlreichen experimentellen und klinischen Studien zur Beobachtung einer gesteigerten Schmerzempfindlichkeit. Der auf sensorischen Neuronen exprimierte Ionenkanal TRPV1 [1] ist an der Sensitivierung peripherer Neurone und der Entstehung einer Hitze-Hyperalgesie [2,3] beim Opioidentzug entscheidend beteiligt. Die vorliegende Arbeit untersucht die molekularen Mechanismen der Sensitivierung des TRPV1 (Hitze-) und TRPM8/ TRPA1 (Kälte)-Ionenkanals. In Probandenstudien wurde die beim Opioidentzug vermittelte Hyperalgesie durch quantitativer sensorische Testverfahren (QST) weiter charakterisiert.

Material und Methoden

cAMP-Konzentrationsmessungen an μ -Opioid-Rezeptor-transfezierten HEK-293-Zellen mit 30-minütiger Remifentanil-Vorinkubation, beginnend mit 0,1nM und nachfolgendem Wash-out, wurden mittels ELISA vorgenommen. Quantitativ fluorimetrische Bestimmung von Calcium: an μ -Opioid-; TRPV1-; TRPM8-, TRPA1-Rezeptor-transfezierten HEK-293-Zellen wurde nach 30-minütiger Remifentanil-Vorinkubation (1 μ M) Ionenkanal-spezifische Liganden (TRPV1 : 500nM Capsaicin, TRPM8/TRPA1 : Menthol (100 μ M)/ Icillin (500nM)) appliziert. Die intrazelluläre Calcium-Konzentration wurde mittels Fura-2 AM gemessen. Patch-Clamp-Experimente an μ -Opiod-; TRPV1-; TRPM8-; TRPA1-Rezeptor-transfezierten HEK-293-Zellen nach Inkubation mit Remifentanil (1 μ M). Die Veränderung des transmembranösen Stromes wurde nach Applikation Ionenkanal-spezifischer Liganden gemessen. Durch quantitativer sensorische Testverfahren (QST) wurden in einem Capsaicin-induzierten Schmerzmodell an gesunden Probanden nach 30-minütiger Remifentanil-Applikation die thermischen Schmerzschwellen und das Schmerzempfinden der Probanden mittel einer TSA-Thermode der Firma Medoc untersucht. (Die Studie wurde von der Ethikkommission der Ärztekammer Hamburg genehmigt).

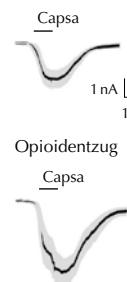
Ergebnisse

Mittels ELISA konnten wir zeigen, dass beim Remifentanilentzug die cAMP-Konzentration

Abbildung 1 und 2

Abb. 1

Kontrolle



nach Capsaicin Stimulation

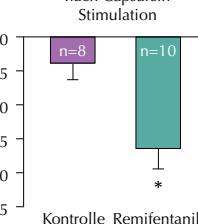


Abb. 2

TRPM8-Aktivierung durch Icillin

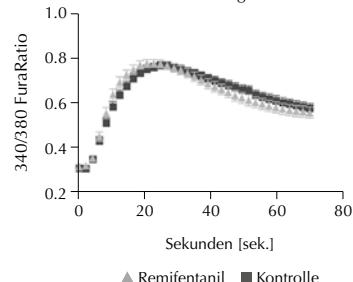


Abb. 1: Patch-Clamp-Experimente: transfeizierte HEK-Zellen (μ - und TRPV1-Rezeptor) wurden mit Remifentanil vorbehandelt. Die opioid-vorbehandelten Zellen zeigen einen statistisch signifikant erhöhten transmembranösen Strom im Vergleich zur Kontrollgruppe (ungepaarter t-test, $p < 0.05$).

Abb. 2: Kalzium-Imaging: Stimulation von transfeizierten HEK-Zellen (μ - und TRPM8-Rezeptor) mit Icillin (500 nM). Opioid-vorbehandelte Zellen zeigen keinen höheren Kalzium-Einstrom.

dosisabhängig zunimmt. In Ca^{2+} -Imaging-Experimenten ließ sich ein erhöhter Kalzium-Einstrom an TRPV1-transfeizierten Zellen (ungepaarter t-test, $p < 0.05$), nicht jedoch an TRPM8- und TRPA1-transfeizierten Zellen nachweisen. In elektrophysiologischen Zellkultureruntersuchungen konnte gezeigt werden, dass die TRPV1-Aktivität nach Remifentanilgabe signifikant zunimmt. Im Capsaicin-Schmerzmodell an Probanden sehen wir eine Hyperalgesie beim Remifentanil-Entzug sowohl für Kälteschmerz als auch für Hitzeschmerz (ANOVA, $p < 0.05$). Das subjektive Schmerzempfinden veränderte sich nicht.

Schlussfolgerungen

Opioidgabe führt zu neuroplastischen Veränderungen im peripheren und zentralen Nervensystem. Wir konnten dosisabhängig nachweisen, dass der Remifentanilentzug zu einer

kompensatorischen Hochregulation des intrazellulären Botenstoffes cAMP und nachfolgend zu einer Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) führt. Die PKA-Aktivierung führt zur Sensitivierung des TRPV1, nicht jedoch des TRPM8 und TRPA1. Die Probandenstudien haben gezeigt, dass beim Remifentanilentzug eine Hitze- und eine Kälte-Hyperalgesie auftritt. Nach unseren Untersuchungen ist der TRPV1 an einer vermehrten Schmerzempfindlichkeit für Hitze-Reize entscheidend beteiligt. Eine Zunahme der Kälte-Empfindlichkeit beim Opioidentzug wird jedoch vermutlich nicht durch die Kälte-Sensoren TRPM8 und TRPA1 vermittelt.

Literatur

1. Caterina, et al: Nature 1997
2. Endres-Becker, et al: Mol Pharm 2007
3. McKemy: Mol Pain 2005.

Abbildung 3 und 4

Abb. 3

Hitzeschmerzwellen

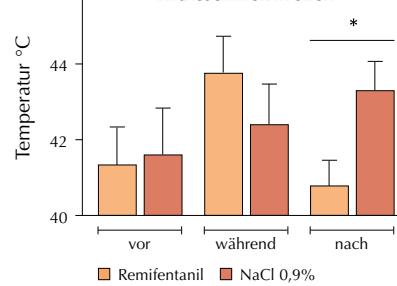
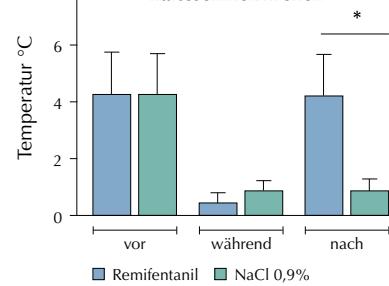


Abb. 4

Kälteschmerzwellen



Thermische Schmerzschwellen Bestimmung: Statistisch signifikante Erniedrigung der Hitzeschmerzschwellen (ANOVA, * $p < 0.05$) (Abb. 3) sowie statistisch signifikante Erhöhung der Kälteschmerzschwellen (ANOVA, * $p < 0.05$) (Abb. 4) nach Remifentanil-Applikation im Vergleich zur Kontrollgruppe ($n=30$).

In einem Mausmodell der kardiopulmonalen Reanimation zeigt der TLR-4 keinen Einfluss auf das Reanimationsergebnis

A. Grub¹ · S. Bergt¹ · N. Gros¹ · B. Vollmar² · G.F.E. Nöldge Schomburg¹ · J.P. Roesner¹

1 Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie,

2 Institut für Experimentelle Chirurgie, Universitätsmedizin Rostock

Korrespondenz: andreagrub@gmx.de

Fragestellung

Die Behandlungsergebnisse von Patienten nach Herz-Kreislaufstillstand und Reanimation (CA/CPR) sind trotz intensiver Forschungsarbeit in Bezug auf Überleben, funktionelle Regeneration und neurologisches Defizit weiterhin unbefriedigend schlecht [1]. Durch die Möglichkeit der Detektion von „damage associated molecular patterns“ (DAMP) kommt den Toll-like-Rezeptoren (TLR) eine große Bedeutung in der Aktivierung der Inflammationsreaktion nach Ischämie und Reperfusion zu. In verschiedenen Experimenten an solitären Organen konnte gezeigt werden, dass eine genetische Defizienz bzw. die funktionelle Blockade von TLR den Ischämie-/Reperfusionsschaden reduzieren kann [2]. Diese Arbeit untersucht den Einfluss des TLR4 auf das Überleben und die funktionell-neurologische Regeneration von Versuchstieren nach 10 minütigem Herz-Kreislaufstillstand.

Methodik

Das Kleintier-Reanimationsmodell beinhaltet die maschinelle Beatmung (F_1O_2 0,21) der intubierten Maus, die Induktion eines 10-minütigen Herz-Kreislaufstillstands durch KCl (80 µg/g KG) und die maschinelle Reanimation ($f = 450/\text{min}$) mit Injektion von Adrenalin (10 µg). Nach behördlicher Genehmigung schlossen wir insgesamt 64 weibliche C57BL/6-Mäuse (WT) und 45 weibliche B6.B10ScN-Tlr4^{lps-del}-Mäuse (TLR4^{-/-}) in die Versuche ein. Das Experiment wurde in 2 Abschnitte geteilt. Die Tiere zur Langzeitbeobachtung (Beobachtungszeitraum: 28 Tage) wurden in 3 Gruppen randomisiert: (1) CPR TLR4^{-/-}, n=33; (2) CPR WT, n=32; (3) CPR WT+mAB, n=15. 5 weitere Versuchsgruppen dienten der Bestimmung der Inflammationsparameter 8 h nach Reanimation (Kurzzeitbeobachtung): (a) sham OP WT, n=5; (b) sham OP TLR4^{-/-}, n=5; (c) CPR WT, n=7; (d) CPR TLR4^{-/-}, n=7; (e) CPR WT+mAB, n=5. Alle Tiere erhielten zu den Zeitpunkten 0 min und 60 min nach Beginn der Reanimation eine intravenöse Injektion von 0,1 ml NaCl 0,9%. Den Tieren der Gruppe CPR-WT+mAB wurde zum Zeitpunkt 0 min der monoklonale Anti-TLR4-Antikörper (mAB) MTS 510 (100 µg/0,1 ml NaCl 0,9%) injiziert. Zur Beurteilung des funktionell-neurologischen Status der Tiere in der

Tabelle 1

Übersicht der funktionell-neurologischen Regeneration.

Parameter	Gruppe			
	WT (n=32)	WT + mAB (n=15)	TLR 4 ^{-/-} (n=33)	
Körpergewicht (relativ)				
Tag 2	n.s.	81,0 [$\pm 5,1$]	81,6 [$\pm 2,6$]	80,6 [$\pm 3,9$]
Tag 3	n.s.	80,0 [$\pm 6,1$]	81,4 [$\pm 4,8$]	79,9 [$\pm 5,4$]
Tag 28	n.s.	101,3 [$\pm 5,6$]	95,81 [$\pm 3,4$]	97,81 [$\pm 7,8$]
RotaRod				
Tag 3	n.s.	459 [141-741]	292 [44-650]	164 [24-499]
Tag 4	n.s.	668 [212-900]	375 [220-876]	374 [89-681]
Tag 5	n.s.	752 [465-900]	826 [608-900]	581 [292-900]
Morris Water Maze				
Zeit zur Plattform [s] – Median [25 - 75 Percentile]				
Position Tag -7 (1)	Tag -1	18 [9-35] 4 [2-18]	13 [7-36] 6 [3-17]*	
Position Tag 10 (2)	Tag 15	12 [6-28] 8 [1-12]	9 [6-23] 3 [3-4]	
10 [3-22] 9 [3-22] n.s.				

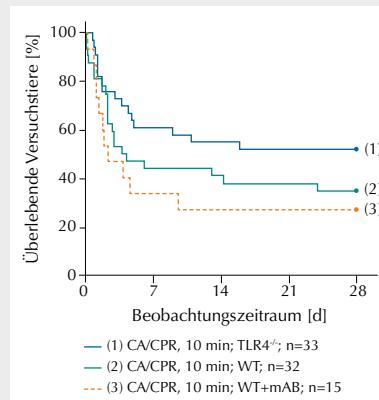
* p<0,05

Langzeitbeobachtung wurden die Parameter Überleben, Körpergewicht (relativ), RotaRod Test und Water Maze Test genutzt. In der Kurzzeitbeobachtungsstudie wurden 8 h nach Abschluss der Präparation (sham-OP) bzw. nach Reanimation die Plasmakonzentrationen von IL-6 und IL-10 mittels ELISA bestimmt. Die Ergebnisse sind als Mittelwert (MW) \pm SD bzw. als Median [25 75 Percentile] dargestellt. Statistik: Kolmogorov-Smirnov Test; Student's t-Test; χ^2 -Test; Mann Whitney-Rangsummentest; statistische Signifikanz bei $p < 0,05$.

Ergebnisse

Im Vergleich zu den Tieren der Kontrollgruppen (sham-OP) zeigen die erfolgreich reanimierten Tiere einen signifikanten Konzentrationsanstieg der Inflammationsmarker im Plasma: IL-6: sham-OP-WT: 13[10-20] pg/ml vs. CPR-WT: 587[468-947] pg/ml; IL-10: sham-OP-WT: 10[4,5-16,5] pg/ml vs. CPR-WT: 53[38-68] pg/ml. Es ließ sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Reanimationsgruppen nachweisen (IL 6: CPR-WT: 587[468-947] pg/ml; CPR-TLR4^{-/-}: 810[391-942] pg/ml; CPR WT+mAB: 694 [519-2824] pg/ml; IL-10: CPR-WT: 53[38-68] pg/ml; CPR-TLR4^{-/-}: 63[41-177] pg/ml; CPR WT+mAB: 73[40-117] pg/ml). Ebenso konnten keine Unterschiede mit statistischer Signifikanz in den funktionell-neurologischen Parametern und im Überleben nachgewiesen werden (Tab. 1 und Abb. 1). Im Water Maze Test konnten sowohl die WT-Tiere als auch die TLR4-defizienten Tiere vor der Reanimation die 1. Position der Plattform erlernen. Nach Reanimation konnte die 2. Position der Plattform (räumliches Neu Lernen) von sämtlichen WT-Tieren erlernt werden, unabhängig von der Applikation des Antikörpers. Die überlebenden TLR4^{-/-}-Tiere erlernten die neue Position nicht (Tab. 1).

Abbildung 1



Interpretation

Die dargestellten Ergebnisse sind gegensätzlich zu den Befunden einer TLR2-Defizienz [3]. Damit scheint in einem Mausmodell der kardiopulmonalen Reanimation dem TLR 4, anders als dem TLR2, nur eine untergeordnete Bedeutung in der Pathophysiologie des globalen Reperfusionschadens zuzukommen.

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. Arslan F: TLR2 and TLR4 in Ischemia Reperfusion Injury. *Mediators of Inflammation* 2010; 2010:704202
3. Bergt S: TLR2-Defizienz verbessert die Überlebensrate und die funktionell-neurologische Regeneration von Mäusen nach einem Herz-Kreislaufstillstand und Reanimation. *Anästh Intensivmed* 2011;7:463 (aktuell im Reviewprozess bei „Resuscitation“)

Einfluss von Spontanatmung auf pulmonale Inflammation und Lungenschädigung während ultraprotektiver Beatmung beim experimentellen Lungenversagen

A. Gündner¹ · T. Kiss¹ · T. Bluth¹ · N. Carvalho¹ · T. Quast¹ · S. Kerber¹ · S. Zeidler¹ · P. Pelosi² · T. Koch¹ · M. Gama de Abreu¹

1 Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie, Universitätsklinikum Dresden

2 Dipartimento di Scienze Chirurgiche e Diagnostiche, Università di Genova (Italien)

Korrespondenz:

Andreas.Guedner@uniklinikum-dresden.de

Fragestellung

Zur Gewährleistung der Lungenprotektion während maschineller Beatmung (MB) im schweren akuten Lungenversagen (ARDS) können Tidalvolumina (V_t) <4 ml/kg notwendig sein (ultraprotektives V_t) [1]. Infolgedessen kann es zur Ausbildung von Atelektasen mit konsekutiver Beeinträchtigung des Gas austauschs kommen [2]. Wir untersuchten die Effekte von Spontanatmung während ultraprotektiver Beatmung auf pulmonale Inflammation und Lungenschädigung in einem Modell des ARDS. Unsere Hypothese war, dass Spontanatmung die negativen Effekte ultraprotektiver MB auf die Lungenfunktion ausgleicht und sich protektiv auf pulmonale Inflammation und Lungenschädigung auswirkt.

Methodik

28 Hausschweine (32,8-52,5 kg) wurden analgosediert, intubiert und im volumenkontrollierten Modus beatmet: $\text{FiO}_2=1,0$, positiver end-exspiratorischer Druck (PEEP)=5 cmH₂O, $V_t=10$ ml/kg, Atemfrequenz (AF) adjustiert an Normokapnie, Inspiration/Exspirations-Verhältnis (I:E)=1:1. Die Induktion des ARDS erfolgte mit repetitiven Lavagen mit isotonischer Kochsalzlösung bis zum Erreichen eines $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 200$ mmHg für >30 min und anschließend 5 min druckkontrollierter Beatmung (PCV) mit Atemwegspitzendruck (P_{peak}) = 60 cmH₂O, PEEP = 0 cmH₂O, AF=10 und I:E=1:1. Die Tiere wurden einer der folgenden Gruppen randomisiert zugeordnet (n=7/Gruppe): 1) kontrollierte protektive MB (Pcon); 2) kontrollierte ultraprotektive MB (UPcon); 3) ultraprotektive MB kombiniert mit nichtassistierter Spontanatmung (UPhyb); und 4) kontinuierlich positiver Atemwegsdruck (CPAP) kombiniert mit assistierter Spontanatmung (UPassist). Bei den Tieren unter ultraprotektiver MB wurde eine extrakorporale

Abbildung

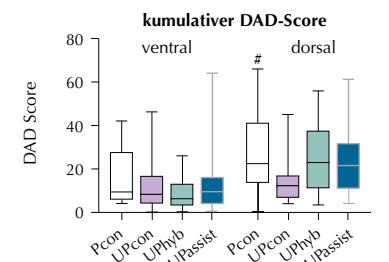
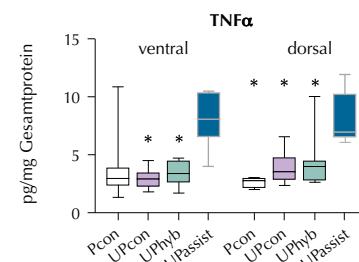


Abb. 1, links: Tumornekrosefaktor in pg/mg Gesamtprotein; **Abb. 2, rechts:** kumulierter DAD-Score, jeweils in ventralen und dorsalen Lungenregionen; Signifikanz: * p<0,05 UPassist, # p<0,05 vs. UPcon.

Lungenunterstützung (iLA®) zwischen linker Femoralarterie und rechter Femoralvene zur extrakorporalen CO₂-Elimination platziert. Der Frischgasfluss der iLA® wurde so adjustiert, um einen arteriellen PaCO₂ zwischen 50-70 mmHg zu erreichen; der O₂-Gehalt im sweep gas wurde so adjustiert, dass der PaO₂ beim Durchfluss durch das Gerät unverändert blieb. In den Gruppen UPhyb und UPassist wurde die Spontanatmung zugelassen. Tiere der Gruppe Pcon wurden im PCV-Modus beatmet ($V_t=6$ ml/kg, PEEP=16 cmH₂O, I:E=1:1 und AF adjustiert für pH>7,30). In den Gruppen UPcon und UPhyb wurden die Tiere im APRV-Modus beatmet, ($P_{\text{peak}}(P_{\text{high}})$ adjustiert für $V_t \approx 3$ ml/kg, PEEP(P_{low})=16 cmH₂O, AF=15/min, I:E für einen mittleren Atemwegsdruck (P_{mean}) vergleichbar mit Pcon. In der Gruppe UPassist wurde der Unterstützungsdruck für $V_t \approx 3$ ml/kg adjustiert und das CPAP-Level so eingestellt, dass der P_{mean} vergleichbar mit Pcon war. War unter diesem CPAP Level keine Triggeraktivität nachweisbar, wurde dieses reduziert, bis regelmäßig Trigger messbar waren. Während 6 Stunden erfolgten Messungen der Lungenfunktion. Post mortem wurden Gewebsproben der Lunge zur Bestimmung der proinflammatorischen Antwort und der histologischen Lungenschädigung (DAD-Score) entnommen. Funktionelle Parameter wurden mit einem allgemeinen linearen Modell, Inflammationsparameter mit Kruskal-Wallis-Test sowie Mann-Withney-Test adjustiert nach Bonferroni-Holm und der DAD-Score mit einem gemischt linearen Modell adjustiert nach Tukey Kramer getestet.

Ergebnisse

Die extrakorporale CO₂-Elimination reduzierte den PaCO₂ im Vergleich zu Pcon (p<0,01). UPhyb und UPassist zeigten gegenüber UP-

con (p<0,01) sowie UPhyb gegenüber Pcon (p<0,05) eine bessere Oxygenierung. Ultraprotektive MB führte zu einer Reduktion von P_{peak} gegenüber Pcon (p<0,01) sowie UPhyb gegenüber UPassist (p<0,05). UPhyb und UPassist waren gegenüber Pcon (p<0,01) sowie UPhyb gegenüber UPcon (p<0,05) mit einer Reduktion von P_{mean} assoziiert. UPhyb und UPassist führten zu einer Umverteilung der Ventilation in dorsale Lungenareale (p<0,05). Im Vergleich zu anderen Gruppen resultierte UPassist in einer erhöhten Konzentration von IL-8 in dorsalen Lungenarealen (p<0,05) sowie von TNF- α in ventralen und dorsalen Arealen (Abb. 1). UPcon zeigte einen reduzierten kumulativen DAD-Score in dorsalen Lungenregionen gegenüber Pcon (Abb. 2).

Interpretation

Bei diesem Modell des ARDS führte Spontanatmung während ultraprotektiver MB gegenüber kontrollierter protektiver und ultraprotektiver MB zu einer Verbesserung der Lungenfunktion, aber UPassist war mit einer verstärkten Lungenschädigung assoziiert. UPcon stellte die effektivste Lungenprotektion sicher.

Literatur

- Terragni P. P, Del S. L, Mascia L, Urbino R, Martin E. L, Biocco A, Faggiano C, Quintel M, Gattinoni L, Ranieri V. M: Tidal volume lower than 6 ml/kg enhances lung protection: role of extracorporeal carbon dioxide removal. *Anesthesiology* 2009;111:826-835
- Dembinski R., Hochhausen N, Terbeck S, Uhlig S, Dassow C, Schneider M, Schachtrupp A, Henzler D, Rossaint R, Kuhlen R: Pumpless extracorporeal lung assist for protective mechanical ventilation in experimental lung injury. *Crit Care Med* 2007;35:2359-2366.

Die Rolle verschiedener Adhäsionsmoleküle für die Rekrutierung von Leukozyten in die Niere bei zwei Modellen des akuten Nierenversagens

J. M. Herter¹ · J. Rossaint¹ · H. Block¹ · A. Stadtmann¹ · H. Van Aken¹ · A. Zarbock¹

¹ Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin, Universität Münster

Korrespondenz: jherter@partners.org

Fragestellung

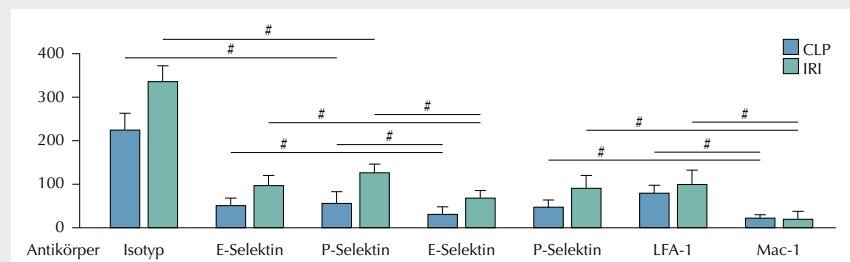
Das akute Nierenversagen (ANV) bei kritisch kranken Patienten hat eine hohe Morbidität und Letalität [1]. Zu den häufigsten Ursachen des ANV gehören die Sepsis und der Ischämie-Reperfusionsschaden (IRI) [1]. Die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten (PMN) in die Niere ist an der Pathogenese des ANV beteiligt [2]. Die Interaktion der endothelialen Adhäsionsmoleküle E- und P-Selektin sowie der leukozytären β_2 -Integrine mit ihren Rezeptoren ist die molekulare Grundlage für die Rekrutierung von PMNs in die Niere nach IRI. Da die molekularen Mechanismen der Leukozytenrekrutierung stimulusspezifische Unterschiede aufweisen [3], ist bis zum heutigen Zeitpunkt nicht bekannt, ob die gleichen molekularen Mechanismen an der Leukozytenrekrutierung im Rahmen des Sepsis-induzierten ANV beteiligt sind.

Vor diesem Hintergrund haben wir ein Modell des Sepsis-induzierten ANV adaptiert und mit dem etablierten IRI Modell verglichen. Um die Bedeutung der Rekrutierung von PMNs bei der Ausbildung des ANV nach Induktion der Sepsis zu untersuchen, wurde das Modell bei Mäusen nach Depletion von PMNs untersucht. Des Weiteren wurde die Rolle der Adhäsionsmoleküle in beiden Modellen mittels Intravitalmikroskopie des Nierenkortex nach Injektion blockierender Antikörper (Ak) untersucht und die Zahl der PMNs in der Niere sowie das Serumkreatinin als Surrogatparameter für die Nierenfunktion bestimmt.

Methodik

Die Tierschutzzkommission genehmigte alle beschriebenen Tierversuche. 24 Stunden nach Ischämie-Reperfusion und 48h nach Ligation und Punktions des Caecums (CLP) wurde mittels Durchflusszytometrie die Anzahl der PMNs in der Niere und die Konzentration des Serumkreatinins mittels ELISA bestimmt. Zur Untersuchung der Rolle von PMNs bei

Abbildung 1



Die Reduktion der adhärenen Zellen nach Blockierung verschiedener Adhäsionsmoleküle ist nach Ischämie-Reperfusion und Caecum Ligation und Punktions vergleichbar.

8h nach CLP und 4h nach IRI wurde die Zahl der adhärenen Zellen mittels Epifluoreszenzmikroskopie in den postkapillären Gefäßen des Nierenkortex bestimmt. Die blockierenden Antikörper oder Isotyp-Kontrollantikörper wurden postoperativ i.p. verabreicht ($n=4-5$, $# p<0.05$).

der Ausbildung des Sepsis-induzierten ANV wurde vor dem Experiment 50 μ g anti-Gr1 Ak i.v. injiziert. Um die Bedeutung einzelner Adhäsionsmoleküle zu untersuchen, wurden je 100 μ g eines anti-E-Selektin Ak, eines anti-P-Selektin Ak, eines anti-LFA-1 Ak, eines anti-Mac-1 Ak oder einer Kombination von mehreren Ak nach IRI oder CLP i.p. gegeben. Zur Darstellung der Leukozytenrekrutierung *in vivo* wurden bei LysM-GFP-Mäusen 4h nach Reperfusion bzw. 8h nach CLP mit und ohne Antikörperblockade die Zahl der adhärenen PMNs und die Rollgeschwindigkeit der PMNs im Nierenkortex mittels Intravitalmikroskopie bestimmt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ANOVA und anschließenden Student-Newmann-Keul-Tests (Daten als Mittelwert \pm SEM, $n=4-6$).

Ergebnisse

Die CLP operierten Mäuse entwickelten nach 48h ein ANV (Serumkreatinin 0.77 ± 0.03 mg/dl im Vergleich zu Sham 0.21 ± 0.07 mg/dl) mit ausgeprägter Rekrutierung von PMNs in die Niere ($4.77 \pm 0.8 \times 10^5$ /Niere, Sham $0.61 \pm 0.02 \times 10^5$ /Niere). Die Depletion von PMNs mittels anti-Gr1 Ak schützte die Mäuse vor der Ausbildung des ANV (Kreatinin 0.24 ± 0.10 mg/dl). Die postoperative Injektion blockierender Ak (anti-E-Selektin, anti-P-Selektin, anti-P-Selektin+anti-E-Selektin, anti-LFA-1, anti-Mac-1, anti-Mac-1+anti-LFA-1) reduzierte sowohl die Zahl der rekrutierten PMNs als auch die Konzentration des Serumkreatinins nach 24h im Ischämie-Reperfusionsmodell und nach 48h im Sepsismodell. In der Intravitalmikroskopie zeigte sich in beiden Modellen eine entsprechende Reduktion

der adhärenen Zellen und bei gleichzeitiger Blockade von E-Selektin und P-Selektin bzw. LFA-1 und Mac-1 eine additive Reduktion der im Gefäß haftenden Zellen (Abb. 1). Die Blockade von P-Selektin senkte die Rollgeschwindigkeit, wohingegen die Blockade von E-Selektin oder LFA-1 zu einer Erhöhung der Rollgeschwindigkeit bei beiden Modellen führte. Die Blockade von Mac-1 hatte weder im IRI- noch im Sepsis-Modell einen Einfluss auf die Rollgeschwindigkeit.

Interpretation

Diese Daten zeigen, dass die Ausbildung des akuten Nierenversagens auch in einem Modell des Sepsis-induzierten ANV abhängig von der PMN-Rekrutierung in die Niere ist. Trotz unterschiedlicher Ätiologie konnte gezeigt werden, dass die endothelialen Adhäsionsmoleküle E-Selektin und P-Selektin sowie die leukozytären β_2 -Integrine LFA-1 und Mac-1 für die Leukozytenrekrutierung in die Niere von Bedeutung sind.

Literatur

- Clec'h C, Gonzalez F, Lautrette A, Nguile-Makao M, Garrouste-Orgeas M, Jamali S, et al: Multiple-center evaluation of mortality associated with acute kidney injury in critically ill patients: a competing risks analysis. Crit Care 2011;15:R128
- Singbartl K, Green SA, Ley K: Blocking P-selectin protects from ischemia/reperfusion-induced acute renal failure. FASEB J 2000;14:48-54
- Rossaint J, Zarbock A: Tissue-Specific Neutrophil Recruitment into the Lung, Liver, and Kidney. J Innate Immun 2012 Dec 21.

Die Cannabinoid-Rezeptoren 1 und 2 wirken kardioprotektiv und werden durch micro-RNA-494 und micro-RNA-665 reguliert

J. Heyn · S. Schütz · M. Schmidt · S. Kreth

Klinik für Anaesthesiologie,
Universität München

Korrespondenz: jens.heyn@med.uni-muenchen.de

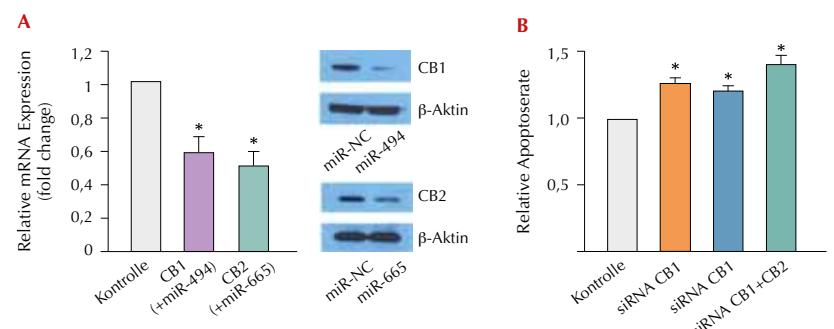
Fragestellung

Die Rolle des Endocannabinoid-Systems in der Pathophysiologie des Chronischen Herzversagens (CHF) ist weitgehend unverstanden. Wir fanden im Myokard von CHF-Patienten ein gegenläufiges Expressionsmuster der Cannabinoid-Rezeptoren (CB1 und CB2): während CB1 etwa um 25% herabreguliert war, zeigte sich eine deutlich gesteigerte CB2-Expression; unklar blieb jedoch die pathophysiologische Bedeutung dieser Befunde [1]. Da kardiale micro-RNAs (miRs) einen erheblichen Einfluss auf die Pathogenese eines CHF haben [2], wurde im vorliegenden Forschungsprojekt untersucht, i) ob die gegenläufige Expression von CB1 und CB2 durch den Einfluss spezifischer miRs erklärt werden kann und ii) welche pathophysiologischen Folgen das gefundene Expressionsmuster haben könnte.

Methodik

Mittels bioinformatischer Methoden (Target-Prediction Programme, Datenbankanalysen) wurden die myokardial exprimierten miR-494 und miR-665 als potenzielle Regulatoren der CB-Rezeptoren 1 bzw. 2 identifiziert. Zur experimentellen Validierung wurden humane Cardiomyozyten-Zellkulturen mit synthetischer Vorläufer-miR (pre-miR-494, -665) bzw. Kontroll-miR transzisiert (Elektroporation); nach 24 h wurde jeweils RNA präpariert und revers transkribiert. Die CB1- und CB2-mRNA-Expressionsraten wurden mittels real-time PCR bestimmt, die Expression beider Rezeptorproteine wurde durch Westernblot ermittelt. Zum Nachweis der direkten miR-Zielgen-Interaktion wurden die 3'-untranslatierten Bereiche der Gene beider Rezeptoren jeweils mittels PCR amplifiziert und in Luciferase-Reporter-Vektoren kloniert. Die Vektorkonstrukte wurden zusammen mit den jeweiligen pre-miRs (bzw. Kontroll-miR)

Abbildung 1



A) Einfluss von miR-494 und miR-665 auf die CB-Rezeptor Expression.

B) Apoptoseraten bei Hypoxie/Serumentzug nach CB-Rezeptor Silencing.

(n=5; *p<0,01)

in HEK293-Zellen transzisiert; Reporter-Aktivitäten wurden luminometrisch quantifiziert. Für Untersuchungen zur Funktion der CB-Rezeptoren wurden humane Cardiomyozyten mit spezifisch gegen CB1 bzw. CB2 gerichteten siRNAs (bzw. Kontroll-siRNA) oder mit pre-miR-494, -665 bzw. Kontroll-miR transzisiert und für 48 h unter Serumentzug und Hypoxie (5% O₂) inkubiert. Die Apoptoseraten wurden mittels FACS-Analyse bestimmt. RNA wurde aus terminal herzinsuffizientem (Explantatgewebe n=10) bzw. gesundem Myokard (gewonnen bei Vorhofkanülierung bzw. Ventrikelentlüftung, Patienten ohne Herzinsuffizienz, n=10) extrahiert (Ethikvotum und Einverständnis lagen vor); miR-Expression wurde mittels real-time PCR bestimmt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test bzw. Mann-Whitney-U-Test.

Ergebnisse

Humane Cardiomyozyten zeigten nach Transfektion von pre-miR-494 bzw. pre-miR-665 eine verminderte mRNA- und Protein-Expression von CB1 und CB2 (Abb. 1a). Die Regulation der Expression beider Rezeptoren durch die jeweilige miR konnte mittels Luciferase-Assay bestätigt werden (n=6; Reduktion Luciferase vs. Kontrolle 1. CB1/miR-494 62±2,5%; 2. CB2/miR-665 58±3%; p<0,001). Silencing der CB-Rezeptoren durch spezifische siRNAs erhöhte die Vulnerabilität von Cardiomyozyten gegenüber zellulärem Stress (Abb. 1b); vergleichbare Effekte konnten durch Transfektion der beiden miRs

erzeugt werden (Erhöhung Apoptoserate: miR-494 +19%, miR-665 +16%, beide miRs +35%; n=5; p<0,01). In CHF-Myokard fand sich im Vergleich zu gesundem Myokard eine erhöhte miR-494- und eine erniedrigte miR-665-Expression (+40±9% vs. -15±3%; p<0,01). Die Expression des CB1 war um 30% reduziert, wohingegen sich die des CB2 5-fach erhöht zeigte (p<0,01).

Interpretation

Die CB-Rezeptoren 1 und 2 wirken kardioprotektiv. Ihre Expression wird über miR-494 bzw. miR-665 reguliert. Bei CHF verhindert die pathologisch veränderte miR-Expression eine optimale Protektion: Das Ausbleiben eines kompensatorischen Anstiegs der CB1-Rezeptor-Expression (über gesteigerte miR-494-Expression) kontrastiert mit der physiologisch sinnvollen Heraufregulation des CB2-Rezeptors (durch miR-665 Abfall). MiR-494 könnte ein mögliches therapeutisches Target zur Steigerung der CB1-Expression bei CHF sein.

Literatur

- Weis, et al: Substantially altered expression pattern of cannabinoid receptor 2 and activated endocannabinoid system in patients with severe heart failure. J Mol Cell Cardiol 2010;48:1187-1193
- Thum, et al: MicroRNAs in the human heart: a clue to fetal gene reprogramming in heart failure. Circulation 2007;116:258-267.

ADP bewirkt eine Mitochondriengesteuerte nukleäre Ca²⁺-Signal-kaskade in Alveolarepithelzellen Typ II in vitro

M. Kieffmann¹ · A. Cuvenhaus¹ · V. Balfanz¹ · T. Streichert² · A.E. Goetz¹ · R. Kieffmann¹

1 Zentrum für Anästhesiologie und Intensivmedizin, Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie

2 Institut für Klinische Chemie

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Korrespondenz: mkieffman@uke.de

Fragestellung

Das Nukleotid ATP wird z.B. bei einer forcierteren Lungenbeatmung von Alveolarepithelzellen (AEZ) freigesetzt [1]. Als parakriner Mediator induziert es mittels Aktivierung von P2Y-Rezeptoren die Freisetzung des second messenger Ca²⁺ aus dem Endoplasmatischen Retikulum in die AEZ-Kompartimente Zytosol, Mitochondrien und Nukleus. Im letzteren werden u.a. über nukleäre Ca²⁺-Signale Transkriptionsabläufe als Teil eines inflammatorischen Prozesses initiiert [2]. Hierbei ist unklar,

ob und wie ATP selbst und/oder dessen durch Ektonukleasen entstehenden Abbauprodukte ADP und AMP sich an der Ca²⁺-Regulation in den jeweiligen Zellkompartimenten beteiligen. Ferner bleibt zu klären, welche Rolle dabei die durch die mitochondriale Ca²⁺-Aufnahme potentiell gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) spielen, die wie das Ca²⁺ auch Stoffwechselvorgänge regulieren und Ca²⁺-Signale modulieren können. Primäres Ziel der Studie war es daher, Ca²⁺-Signale in den AEZ-Kompartimenten Zytosol, Nukleus sowie Mitochondrien auch in Hinblick auf die mitochondriale ROS-Produktion nach Aktivierung mit ATP, ADP und AMP zu charakterisieren und auf die Regulation von Genen hin zu untersuchen.

Methoden

AEZ Typ II (A549) wurden unter Standardbedingungen kultiviert und mit dem Ca²⁺-sensitiven Fluoreszenzfarbstoff Fura-2-AM angefärbt. Die zytosolische Ca²⁺-Konzentrationen [Ca²⁺]_{zyt} sowie nukleäre Ca²⁺-Konzentrationen [Ca²⁺]_{nuk} wurden mittels Real-Time-Imaging unter Verwendung eines Epifluores-

zenzmikroskops quantifiziert. Zur Bestimmung der mitochondrialen Ca²⁺-Konzentrationen [Ca²⁺]_{mito} wurden die Zellen mit der 4mit-D-3CPV-Plasmid-DNA transfiziert und mit Hilfe der fluorescence resonance energy transfer-Technik die emittierten CFP- und YFP-Fluoreszenzintensitäten simultan und im Verhältnis zueinander gemessen. Die Rolle des P2Y2-Rezeptors wurde mit Hilfe eines Gen-knockdown unter Verwendung von spezifischer siRNA untersucht und mittels rtPCR verifiziert. Zur Untersuchung der Auswirkung von ATP oder ADP auf die Genregulation in AEZ wurde ein Microarray unter Verwendung des Affymetrix human genome gene chip HG U133 Plus 2.0 durchgeführt. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert ± SEM angegeben. Zur statistischen Analyse wurde der Mann-Whitney-Rank-Sum-Test angewandt.

Ergebnisse

In unstimulierten AEZ Typ II wurden vergleichbare konstante [Ca²⁺]_{zyt} von 165±21,4 nM und [Ca²⁺]_{nuk} von 142±12,6 nM (je n=10) gemessen. Die Stimulation mit ATP (10 μM) führte im Zytosol und Kern zu ver-

Anästhesie-Ausweis der DGAI

Der **Anästhesie-Ausweis der DGAI** ist zum Preis von € 0,41 zzgl. MwSt. für DGAI-Mitglieder (€ 0,52 zzgl. MwSt. für Nicht-Mitglieder) mit nachstehendem Bestellschein erhältlich über

Aktiv Druck & Verlag GmbH · An der Lohwiese 36 · D-97500 Ebelsbach · Fax: 09522 943567



Europäische Vereinigung der Fachärzte (UEMS)

Deutsche Gesellschaft für Anästhesiologie und Intensivmedizin (DGAI)

Anästhesie-Ausweis

DGAI

Union Européenne des Médecins Spécialistes (UEMS)

German Society of Anaesthesiology and Intensive Care Medicine (DGAI)

Anaesthesia Problem Card

DGAI Geschäftsstelle:

Roritzerstraße 27, D-90419 Nürnberg

Tel.: +49 (0)911 933780

Fax: +49 (0)911 3938195

E-Mail: dgai@dgai-ev.de

Bestellschein

Hiermit bestelle ich _____ Stück des Anästhesieausweises der DGAI.

DGAI-Mitglied ja nein

Name: _____

Anschrift: _____

Datum, Unterschrift _____

Preisliste - Konditionen

Stückpreis: € 0,41 zzgl. MwSt. (€ 0,52 für Nicht-Mitglieder)

Mindestauftragswert: 40 Exemplare

Ab einer Abnahme von 100 Stück wird ein Preisnachlass von 10 % gewährt.

Die Preise verstehen sich zzgl. Versandkosten.

Abstracts

22. - 23.02.2013 · Würzburg

gleichbaren Ca^{2+} -Oszillationsamplituden von $1083 \pm 170,8 \text{ nM}$ bzw. $1662 \pm 326,4 \text{ nM}$ (je $n=6$, $p=0,093$). In diesen beiden Kompartimenten betrug die mittlere Dauer der Ca^{2+} -Oszillationen $2,9 \pm 0,4 \text{ min}$. Deren mittlere Frequenz lag bei $2,9 \pm 0,2 \text{ min}^{-1}$. Im Gegensatz dazu induzierte ADP ($50 \mu\text{M}$) Ca^{2+} -Oszillationen, deren maximale zytosolische Amplitude von $384 \pm 11,6 \text{ nM}$ signifikant geringer war als die maximale Amplitude von $707 \pm 88,7 \text{ nM}$ ($p=0,008$) im Kern. Die mittlere Dauer dieser Ca^{2+} -Oszillationen betrug $16 \pm 4,4 \text{ min}$. Deren Frequenz lag bei $1,6 \pm 0,2 \text{ min}^{-1}$. Beide Parameter unterschieden sich deutlich im Vergleich zu ATP ($p<0,05$). AMP veränderte weder $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ noch $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{nuk}}$. Der siRNA-knock-down des P2Y2-Rezeptors führte zum Ausbleiben sowohl der ATP- als auch der ADP-induzierten Ca^{2+} -Signale. Des Weiteren riefen ATP und ADP Veränderungen von $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$ hervor, die in Form und zeitlichem Verlauf vergleichbar zu den zytosolischen und nukleären Ca^{2+} -Oszillationen waren. Die Inhibition der mitochondrialen Produktion von ROS durch den Komplex-I-Inhibitor Rotenone ($50 \mu\text{M}$) oder den proximalen Komplex-III-Inhibitor Myxothiazol ($20 \mu\text{g/ml}$) änderte das Ca^{2+} -Signal nach ATP weder im Zytosol noch im Kern. Im Gegensatz dazu verkürzte oder inhibierte Rotenone oder Myxothiazol die nukleären Ca^{2+} -Oszillationen welche durch ADP hervorgerufen wurde. Darüber hinaus konnte nach Anhäufung der mitochondrialen ROS mittels des distalen Komplex-III-Inhibitors Antimycin A ($2 \mu\text{g/ml}$) die nukleären ADP- nicht jedoch die ATP-vermittelten Ca^{2+} -Oszillationen in ihrer Amplitude sowie in der Frequenz gesteigert werden. Der ROS-scavenger Acetylcystein (1 mM) hingegen inhibierte die nukleären Ca^{2+} -Signale nach ADP. Die Analyse der Microarray-Daten ergab, dass nach ADP, nicht aber nach ATP die Gene für transmembrane 4 L six family member 1, Dual specificity phosphatase 1 und Connective tissue growth factor hochreguliert wurden (Signal Log Ratio >1).

Interpretation

ATP sowie ADP, nicht aber AMP aktivieren den P2Y2-Rezeptor in AEZ Typ II. Im Gegensatz zu ATP initiiert ADP primär ein nukleäres Ca^{2+} -Signal, welches durch mitochondriale ROS angeregt wird. Ferner reguliert ADP Gene für Zellwachstum, -teilung und -differenzierung, wie z.B. das Gen für den Connective tissue growth factor, welches interessanterweise auch bei der Idiopathischen Lungendiffibrose hochreguliert ist [3]. Die Rolle des ADP beim fibrotischen Umbau im Rahmen des beatmungsinduzierten Lungenschadens ist daher Gegenstand gegenwärtiger Untersuchungen.

Literatur

1. Rich P.B, et al: J Trauma 2003;55:290-297
2. Bootman M.D, et al: J Cell Sci 2009;122:2337-2350
3. Scotton C.J, et al: Chest 2007;132:1311-1321.

Der-Plexin-C1-Rezeptor verstärkt eine akute Entzündungsreaktion und beeinflusst die Adhäsions- und Migrationseigenschaften von Leukozyten

K. König¹ · T. Granja¹ · V. Mirakaj¹ · K. Zacharowski² · A. Zarbock³ · P. Rosenberger¹

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

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

3 Klinik für Anästhesiologie, operative Intensivmedizin und Schmerztherapie, Universitätsklinikum Münster

Korrespondenz: klemens.koenig@uni-tuebingen.de

Fragestellung

Der Plexin-C1-(PLXNC1)-Rezeptor und dessen endogener Ligand Semaphorin 7a (Sema7a) spielen eine zentrale Rolle bei der Entwicklung des Nervensystems [1]. In vitro konnte bereits gezeigt werden, dass PLXNC1 auch Einfluss auf die Migration, Adhäsion [2] und Zytokinantwort [3] von immunkompetenten Zellen hat. Unklar ist jedoch der Einfluss von PLXNC1 auf eine akute Entzündungsreaktion *in vivo*. Daher untersuchten wir die Bedeutung von PLXNC1 bei einer experimentell induzierten, akuten Peritonitis.

Methodik

Die Tierversuchsgenehmigung des zuständigen Regierungspräsidiums lag vor. Es wurden Wildtyp (WT)- und PLXNC1^{-/-}-Mäuse sowie durch Knochenmarktransplantation (KMTX)

generierte chimäre Mäuse in einem Modell der Zymosan A (Zy A)-induzierten Peritonitis verwendet. WT-Tiere erhielten entweder einen funktionsblockierenden anti-PLXNC1-Antikörper oder ein Sema7a-Peptid mit spezifischer Bindung an PLXNC1. Die Peritonitis wurde bei WT-Mäusen, PLXNC1^{-/-}- und chimären Mäusen durch Zy A (1mg/ml, 1ml/Maus i.p.) induziert. Nach 4 Stunden wurde eine Peritoneallavage durchgeführt (5ml NaCl 0,9%, 4°C) und daraus Zellzahl, Proteingehalt, Myeloperoxidase (MPO)-Aktivität, TNF-α sowie Interleukin-6 bestimmt und Ausstrichpräparate angefertigt. Des Weiteren erfolgte eine histologische Untersuchung des peritonealen Fettgewebes und des parietalen Peritoneums. Alle Werte sind als Mittelwert ± SEM angegeben, die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test, oder ANOVA mit Adjustierung nach Bonferroni.

Ergebnisse

4 Stunden nach Zy A-Applikation zeigten PLXNC1^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu WT-Tieren (Abb. 1 a-e) eine signifikant reduzierte Zellzahl, Proteingehalt, MPO-Aktivität sowie IL-6- und TNF-α-Spiegel in der Peritoneallavage und eine verminderte leukozytäre Gewebeinfiltration im geschädigten mesenterialen Fettgewebe und dem parietalen Peritoneum (Abb. 1 f). Versuche mit KMTX-Tieren zeigten, dass Tiere mit myeloischem PLXNC1^{-/-}-Phänotyp, eine reduzierte Entzündungsreaktion zeigten. Auch die Vorbehandlung mit einem funktionsblockierenden anti-PLXNC1-Antikörper reduzierte Zellzahl, Proteingehalt, MPO-Aktivität sowie IL-6-Spiegel in der Lavage signifi-

kant. Die Applikation des Sema7a-Peptids reduzierte ebenfalls die Zellzahl, Proteingehalt, MPO-Aktivität sowie IL-6- und TNF-α-Spiegel in der Lavage signifikant.

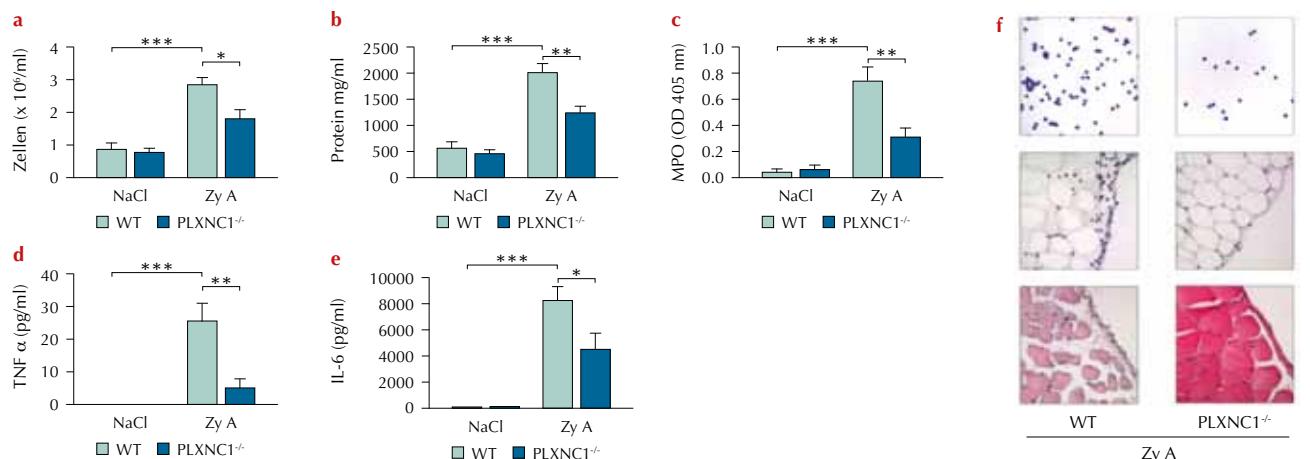
Interpretation

Zusammenfassend zeigen diese Untersuchungen, dass sich der Knock-out und die funktionelle Blockade von PLXNC1 bei der akuten Zy A-induzierten Peritonitis im murinen Modell protektiv auswirken und die hämatopoetische PLXNC1-Expression entscheidend für die Ausprägung der Entzündungsreaktion ist. PLXNC1 könnte somit als potentielles „drug target“ zur Beeinflussung einer akuten Entzündungsreaktion fungieren.

Literatur

- Tessier-Lavigne M, Goodman CS: The molecular biology of axon guidance. *Science* 1996;274(5290):1123-1133
- Walzer T, Galibert L, Comeau MR, De Smedt T: Plexin C1 engagement on mouse dendritic cells by viral semaphorin A39R induces actin cytoskeleton rearrangement and inhibits integrin-mediated adhesion and chemokine-induced migration. *J Immunol* 2005;174(1):51-59
- Comeau MR, Johnson R, DuBose RF, Petersen M, Gearing P, VandenBos T, et al: A poxvirus-encoded semaphorin induces cytokine production from monocytes and binds to a novel cellular semaphorin receptor, VESPR. *Immunity* 1998;8(4):473-482.

Abbildung 1



Nach Induktion einer Zy A-induzierten Peritonitis in WT- und PLXNC1^{-/-}-Mäusen wurde Gewebe sowie eine Peritoneallavage entnommen und **a)** Zellzahl ($\times 10^6/\text{ml}$), **b)** Proteingehalt (mg/ml), **c)** MPO-Aktivität (OD 405 nm) und Konzentration von **d)** TNF- α und **e)** IL-6 (pg/ml) bestimmt (n=6 / Gruppe, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001). **f)** Repräsentative Ausstrichpräparate sowie HE gefärbte Schnitte mesenterialen Fettgewebes und Peritoneum parietale (von oben nach unten) von WT- und PLXNC1^{-/-}-Mäusen 4h nach Zy A-Injektion i.p. (n=4 / Gruppe).

Protektive Rolle von PMN-exprimiertem HIF1 α bei myokardialem Ischämie-Reperfusions-Schaden

M. Köppen^{1,2} · T. Eckle² · S. Kreth¹ · H. K. Eltzschig²

1 Klinik für Anaesthesiologie,
Ludwig-Maximilians-Universität München
2 Department of Anesthesiology, Mucosal Inflammation Program, University of Colorado, Anschutz Medical Campus, Aurora (USA)

Korrespondenz:

michael.koeppen@med.uni-muenchen.de

Fragestellung

Perioperative Myokardischämie ist mit hoher Morbidität und Letalität vergesellschaftet. In der Regel sind therapeutische Ansätze darauf ausgerichtet, eine frühzeitige Reperfusion zu erzielen. Die Reperfusion kann jedoch zu einer zusätzlichen Aktivierung inflammatorischer Reaktionen und damit zu weiterem Myokardschaden führen [1]. Der Transkriptionsfaktor hypoxie-induzierbarer Faktor 1 α (HIF1 α) koordiniert zelluläre Prozesse, die ischämiebedingten Organschäden entgegenwirken. In der vorliegenden Studie untersuchten wir die gewebespezifische Funktion von HIF1 α bei myokardialem Ischämie-Reperfusions-schaden.

Methodik

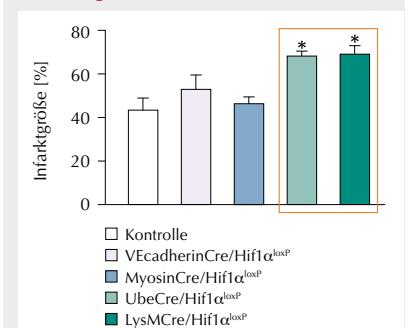
Alle Tierversuche wurden durch die zuständigen Behörden genehmigt. Für die vorliegende Untersuchung stellten wir ganzkörper-HIF1 α -defiziente Mäuse mittels eines tamoxifen-induzierbaren Cre-LoxP-Systems (UbcCre/Hif1 α^{loxP}) her. Auf diese Weise konnten wir die bekannte embryonale Letalität einer kompletten HIF1 α -Defizienz umgehen. Zusätzlich generierten wir gewebespezifische-HIF1 α -defiziente Mäuse: wir verpaarten Mäuse, die einen mit LoxP versehenen HIF1 α -Locus enthielten, mit solchen, die zelltypspezifisch eine konstante oder induzierbare Cre-Recombinase exprimierten. So erhielten wir gewebespezifische-HIF1 α -defiziente Mäuse mit Deletion von HIF1 α in Kardiomyozyten (MyosinCre/Hif1 α^{loxP}), Endothelzellen (VEcadherinCre/Hif1 α^{loxP}) und Zellen der myeloischen Zellreihe (LysMCre/Hif1 α^{loxP}). Die Tiere wurden einem In-vivo-Modell für akute myokardiale Ischämie-Reperfusion [2] unterzogen, bei dem wir die linke Koro-

nararterie für 60 min okkludierten, gefolgt von 120 min Reperfusion. Die Versuchs- und die Kontrollgruppen waren hinsichtlich Alter, Geschlecht und Gewicht angeglichen. In einer Versuchsreihe isolierten wir PMN mittels negativer Selektion durch magnetische Partikel aus Knochenmark von Mäusen und transferierten diese in neutrophileplitierte Tiere (adoptiver Transfer). In vitro bestimmten wir den Sauerstoffverbrauch aktivierter PMN mittels Zellkulturplatten mit integriertem Sauerstoffsensor (OxoDish®). Daten wurden auf Normalverteilung hin getestet und als Mittelwert±Standardfehler angegeben. Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mittels t-Test ermittelt; ein p-Wert unter 0,05 wurde als statistisch signifikant angenommen.

Ergebnisse

Mäuse mit globaler Deletion von HIF1 α zeigten zwar eine normale Herzfunktion in der Echokardiographie, wiesen aber um 24±4% größere Infarktareale auf (Abb. 1), als die Kontrolltiere ($p<0,05$, $n=5$). Als Nächstes untersuchten wir, durch welche Zellarten dieser kardioprotektive HIF1 α -Effekt vermittelt wird. Hierzu unterzogen wir systematisch die oben beschriebenen Mauslinien mit gewebespezifischer HIF1 α -Deletion einer akuten myokardialen Ischämie-Reperfusion. Wir verglichen den myokardialen Schaden in MyosinCre/Hif1 α^{loxP} , VECadherinCre/Hif1 α^{loxP} und LysMCre/Hif1 α^{loxP} . Nur die LysMCre/Hif1 α^{loxP} zeigten mit einem 24±3% größeren Infarktareal einen Phänotyp, der mit dem ganzkörper-HIF1 α -defizienter Tiere vergleichbar ist (Abb. 1; $n=5$). Da polymorphe Granulozyten (PMN) den größten Anteil inflammatorischer Zellen im post-ischämischen Myokard ausmachen [2], charakterisierten wir nachfolgend den Beitrag von PMN für den beschriebenen Phänotyp der LysMCre/Hif1 α^{loxP} und führten einen adoptiven Transfer [3] von HIF1 α -exprimierenden und HIF1 α -defizienten PMN in Kontrolltieren durch. Der Transfer HIF1 α -defizienter PMN in Kontrolltiere vergrößerte das Infarktareal um 21±4% im Vergleich zum Transfer von HIF1 α -exprimierenden PMN ($p<0,05$, $n=6$). Zusätzliche In-vitro-Untersuchungen zeigten, dass HIF1 α zu einer Verringerung von inflammatorischen PMN-Funktionen führt (Reduktion des oxidativen Burst um 17±2%, $p<0,05$, $n=6$).

Abbildung 1



Infarktgrößen der verwendeten HIF1 α -defizienten Genotypen (* $p<0,05$ vs Kontrolle; Mittelwert±Standardfehler, $n=5$ pro Gruppe).

Interpretation

Die vorliegenden Untersuchungen weisen erstmals auf eine kardioprotektive Rolle von PMN-exprimiertem HIF1 α bei myokardialer Ischämie-Reperfusion hin. HIF1 α entfaltet seinen protektiven Effekt über die Verminderung des durch PMN vermittelten Reperfusions-schadens.

Literatur

- Eltzschig HK, Eckle T: Ischemia and reperfusion from mechanism to translation. *Nat Med* 2011;17:1391-401
- Koeppen M, Harter PN, Bonney S, Bonney M, Reithel S, Zachskorn C, Mittelbronn M, Eckle T: Adora2b Signaling on Bone Marrow-Derived Cells Dampens Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury. *Anesthesiology* 2012.
- Koeppen M, McNamee EN, Brodsky KS, Aherne CM, Faigle M, Downey GP, Colgan SP, Evans CM, Schwartz DA, Eltzschig HK: Detrimental role of the airway mucin Muc5ac during ventilator-induced lung injury. *Mucosal Immunol* 2012.

Der S1P-Rezeptor-Agonist FTY720 induziert nach Myokardischämie in der Maus S1P₃-abhängig eine myokardiale Hypertrophie und Herzinsuffizienz

J. Larmann¹ · M. Schmitz² · J. Chun³ · J. Stypmann⁴ · K. C. Wollert⁵ · G. Theilmeier¹

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

Korrespondenz: lermann.jan@mh-hannover.de

Fragestellung

Kardiovaskuläre Risikopatienten weisen perioperativ ein erhöhtes Risiko für Myokardinfarkte auf [1]. Therapeutische Strategien zur Limitierung des nachfolgenden Reperfusions syndroms sind rar und klinisch bisher nicht etabliert [1]. Wir konnten im Mausmodell zeigen, dass der unselektive Sphingosin-1-Phosphat (S1P)-Rezeptoragonist FTY720 den Reperfusionsschaden in Abhängigkeit vom S1P-Rezeptor 3 (S1P₃) begrenzt. Im Verlauf induzierte FTY720 jedoch ungünstige myokardiale Umbauvorgänge (maladaptives Remodeling). Die behandelten Mäuse zeigten kleinere Infarkte, eine reduzierte Granulozyteninfiltration und eine geringere myozytäre Apoptose, entwickelten jedoch eine ventrikuläre Dilatation und myokardiale Insuffizienz [2]. Wir haben die Hypothese getestet, dass diese maladaptiven Effekte selektiv über einen der S1P-Rezeptoren 1-3 (S1P₁₋₃) vermittelt werden und sich therapeutisch von den S1P₃-abhängigen kardioprotektiven Effekten trennen lassen.

Methodik

Mit Genehmigung der zuständigen Tierschutzkommission wurden aus Herzen 2-3 Tage alter Ratten gewonnene neonatale Rattenkardiomyozyten in Ruhe und in Gegenwart von 10µM Phenylephrin (PE) (Sigma) mit 1µmol/l S1P (Sigma) oder 100ng/ml seines funktionellen Analogons FTY720 (Cayman) 2 Tage inkubiert. Zur Charakterisierung der

myozytären Hypertrophie wurde die Zellgröße auf phasenkontrastmikroskopischen Bildern halbautomatisch (CellF Imaging Software, Olympus) vermessen. Die Expression des Hypertrophiemarkers brain natriuretic peptide (BNP) und von alpha-myosin heavy chain (αMHC), dessen Abnahme eine verminderte myozytäre Kontraktilität und myokardiales Versagen kennzeichnet [3], wurde mittels real-time revers transkribierter Polymerase Ketten Reaktion (rtPCR) bestimmt. Zur Identifikation relevanter Rezeptoren wurde mittels Ribonukleinsäure (RNA)-Interferenz die Expression der S1P₁- und S1P₂-Rezeptoren reduziert. Da für S1P₃ keine suffiziente Reduktion der Expression erreicht werden konnte, wurde alternativ der pharmakologische S1P₃ spezifische Antagonist CAY10444 (Cayman) eingesetzt. Zur Überprüfung der Befunde *in vivo* wurden 12 Wochen alte FTY720 behandelte Wildtyp (WT)- und S1P₃-defizierte (S1P₃^{-/-}) C57Bl6/J Mäuse (10mg FTY720/ l Trinkwasser, 7 Tage prä- bis 7 Tage postoperativ) einer permanenten Ligatur der linken anterioren Koronararterie unterzogen. Die Tiere wurden präoperativ und an Tag 7 zur Einschätzung der myokardialen Funktion und Geometrie echokardiographiert (HP Sonos5500, Hewlett Packard). Die normalverteilten Daten wurden mittels zweiseitigem t-Test auf Signifikanz ($p<0,05$) geprüft. Für Mehrgruppenvergleiche kam eine Varianzanalyse (ANOVA), für verbundene Daten eine zweifaktorielle ANOVA jeweils mit Bonferroni-Korrektur zur Anwendung. Daten sind als Mittelwert±Standardabweichung angegeben.

Ergebnisse

Neonatale Rattenkardiomyozyten zeigen in Gegenwart des endogen S1P sowie unter unspezifischer S1P-Rezeptorstimulation mit FTY720 eine deutliche Größenzunahme (+31±6,2%, FTY720 vs. Vehikel, $n=12$, $p<0,01$) vergleichbar mit dem Effekt einer PE Stimulation. Während PE die BNP-Expression erwartungsgemäß steigert, hat FTY720 keinen Effekt auf BNP. Die Expression von αMHC wird durch FTY720 in Ruhe und unter PE-Stimulation (-43,9±18% vs. Vehikel, $n=6$, $p<0,05$) im Sinne einer eingeschränkten Kontraktilität reduziert. RNA-Interferenz senkt die S1P₁- und S1P₂-Expression jeweils um über 75%. Auch unter diesen Bedingungen induziert FTY720 weiter eine Größenzunahme

(+36±10% vs. Vehikel, $n=5/6$, $p<0,01$) und senkt die αMHC-Expression (-46±25% vs. Vehikel, $n=5/6$, $p<0,01$). Eine Inkubation mit dem selektiven S1P₃-Antagonisten CAY10444 verhindert beide FTY720 vermittelten Effekte (Hypertrophie: +6,0±11%, vs. Vehikel; αMHC Expression: -12±11% vs. Vehikel, $n=5/6$, $p=n.s.$). Echokardiographisch zeigt sich an Tag 7 nach Myokardinfarkt, dass S1P₃^{-/-}-Mäuse anders als WT-Tiere vor der FTY720-induzierten linksventrikulären Dilatation geschützt sind (enddiastolisches Volumen: 86,9±65,2 vs. 34±25µl, WT vs. S1P₃^{-/-}, $n=11/7$, $p<0,05$) und eine bessere linksventrikuläre Ejektionsfraktion aufweisen (45,4±20 vs. 67,6±19%, WT vs. S1P₃^{-/-}, $n=11/7$, $p<0,05$). Während WT-Mäuse unter FTY720-Therapie an Tag 7 nach Myokardinfarkt eine Zunahme der Myokardmasse zeigen (+31,2%±20,1 vs. präoperativ, $n=11$, $p<0,001$), lässt sich dieser Effekt in S1P₃^{-/-}-Tieren nicht nachweisen (-4,3±14% vs. präoperativ, $n=7$, $p=n.s.$).

Schlussfolgerung

Der unter FTY720 beobachtete maladaptive Remodelingeffekt nach Myokardinfarkt ist ebenso wie der bekannte Schutz vor dem Reperfusions schaden S1P₃-vermittelt. Ziel einer spezifischen therapeutischen Intervention ohne maladaptive myokardiale Remodeling müssen demnach dem S1P₃-Rezeptor nachgeschaltete intrazelluläre Signalwege sein.

Literatur

1. Priebe: Br J Anaesth 2011;107:83-96;
2. Larmann, et al: Anästh Intensivmed 2010;7:389
3. Nakao, et al: J Clin Invest 1997;100(9):2362.

Die kontinuierliche Gabe von Sevofluran im Vergleich zu Propofol schützt das Herz gegenüber einem Ischämie/Reperfusionsschaden durch günstige Effekte auf die mitochondriale Respiration

C. Lotz · T. Tischer-Zeitz · A. Frank · J. Stumpner · N. Roewer · T.M. Smul

Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie, Universitätsklinikum Würzburg

Korrespondenz: Lotz_C@klinik.uni-wuerzburg.de

Fragestellung

Präkonditionierung durch volatile Anästhetika ist ein bekanntes Phänomen zum Schutz des Herzens gegenüber einem myokardialen Ischämie/Reperfusionsschaden. Die beteiligten molekularen Mechanismen fokussieren hierbei auf den Erhalt der mitochondrialen Funktion sowie der Integrität der mitochondrialen Membranen [1]. Durch die gleichzeitige Applikation von Propofol kann diese Präkonditionierung aufgehoben werden [2], ebenso ist die kontinuierliche Applikation volatiler Anästhetika dem Injektionsanästhetikum bei koronarer Bypass-Operation überlegen [3]. Wir testeten daher die Hypothese, dass die kontinuierliche Gabe von Sevofluran unter der Beteiligung definierter mitochondrialer Mechanismen günstige Effekte auf einen kardialen Ischämie/Reperfusionsschaden ausübt.

Methodik

Die Tierversuchsgenehmigung lag vor. 32 weiße Neuseeland-Kaninchen (9-12 Wochen, 2,0-2,5 kg) wurden randomisiert 4 Gruppen zugeordnet. Nach Narkoseeinleitung mittels Pentobarbital wurden die Tiere zur Messung der Herzfrequenz (HF) und des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAP) instrumentiert. Nach Thorakotomie wurde ein prominenter Ast der linken Koronararterie (LAD) umschlungen. 25 Tiere erhielten durch Okklusion (CAO) der LAD eine Ischämie für die Dauer von 30 Minuten, gefolgt von einer 3-stündigen Reperfusion. Die Infarktgröße (IS/AAR) wurde nach Bestimmung des Ischämieareals (AAR)

mit Patentblau und des Infarktareals (IS) mit Triphenyl-Tetrazolium-Chlorid (TTC) gravimetrisch ermittelt. Bei 28 Tieren erfolgte die Entnahme von je 10% des nicht-ischämischen linken Ventrikels sowie des AAR zur Isolation von Mitochondrien. Nach Isolation der Mitochondrien erfolgte die Analyse der mitochondrialen Respiration als auch der Aktivität der Atmungskettenkomplexe. Die Untersuchungsgruppen erhielten: Schein-Operation: keine CAO, Narkoseaufrechterhaltung mittels Pentobarbital; I/R: CAO, Narkoseaufrechterhaltung mittels Pentobarbital; Propofol: CAO, Narkoseaufrechterhaltung mittels 10mg/kg/h Propofol; Sevofluran: CAO, Narkoseaufrechterhaltung mittels 1,0 MAC Sevofluran.

Statistik: ANOVA mit Post-hoc-Bonferroni-Test, Mittelwert \pm SD, * p <0,05.

Ergebnisse

Es bestanden keine signifikanten Unterschiede nach der Instrumentierung bezüglich der häodynamischen Messparameter zwischen den Gruppen. Die AAR war in allen Gruppen gleich groß. Die Infarktgröße (IS/AAR) betrug $2,0 \pm 1,7\%$ in der Schein-operierten-Gruppe. Eine 30 minütige CAO und 3 stündige Reperfusion bewirkte eine Infarktgröße von $59,7 \pm 10,9\%$, welche durch die kontinuierliche Applikation von Sevofluran signifikant auf $47,7 \pm 8,9\%^*$ reduziert wurde. Unter der kontinuierlichen Infusion von Propofol kam es zu keiner Veränderung der Herzinfarktgröße ($59,3 \pm 6,4\%$) ($n=7$ in allen Gruppen, * p <0,05 vs. I/R). Der kardioprotektive Effekt des volatilen Anästhetikums war durch den Erhalt des mitochondrialen Respirationsindex ($4,7 \pm 0,8^*$ vs. $3,1 \pm 0,9$ I/R) und des mitochondrialen O_2 -Verbrauchs ($30,22 \pm 5,3$ nmol min $^{-1}$ mg $^{-1}$ * vs. $21,6 \pm 6,7$ nmol min $^{-1}$ mg $^{-1}$ I/R) begleitet. Ebenso bewirkte es eine verbesserte Aktivität der NADH-Dehydrogenase (Komplex I) ($109 \pm 11\%$ vs. $80 \pm 11\%^*$ I/R vs. $100 \pm 3\%$ Schein-Operation). Günstige Effekte von Propofol sowohl im Bezug auf den mitochondrialen Respirationsindex ($3,5 \pm 0,9$) als auch der Komplex I-Aktivität ($74 \pm 13\%^*$) zeigten sich nicht ($n=7$ in allen Gruppen, * p <0,05 vs. Schein-Operation).

Interpretation

Die kontinuierliche Applikation von Sevofluran während koronarer Ischämie und Reperfusions reduziert den resultierenden Schaden im Vergleich zu Propofol signifikant. Das volatile Anästhetikum bewirkt hierbei den Erhalt der mitochondrialen Respiration durch protektive Effekte auf die NADH-Dehydrogenase. Daraus kann geschlossen werden, dass volatile Anästhetika die Funktion der mitochondrialen Atmungskette unter Ischämie/Reperfusion günstig beeinflussen und so das Herz auch im Falle einer kontinuierlichen Applikation schützen.

Literatur

- Murphy E, Steenbergen C: Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury. Physiol Rev 2008; 88:581-609
- Smul TM, Stumpner J, Blomeyer C, Lotz C, Redel A, Lange M, Roewer N, Kehl F: Propofol inhibits desflurane-induced preconditioning in rabbits. J Cardiothorac Vasc Anesth 2011; 25:276-81
- De Hert SG, Van der Linden PJ, Cromheeke S, Meeus R, Nelis A, Van Reeth V, ten Broecke PW, De Blier IG, Stockman BA, Rodrigus IE: Cardioprotective properties of sevoflurane in patients undergoing coronary surgery with cardiopulmonary bypass are related to the modalities of its administration. Anesthesiology 2004;101:299-310.

Die Entzündungsresolution wird entscheidend durch Netrin-1 beeinflusst

V. Mirakaj

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

Korrespondenz: valbona.mirakaj@uni-tuebingen.de

Preisträgerin des DGAI-Forschungsstipendiums
der Fresenius-Stiftung 2013

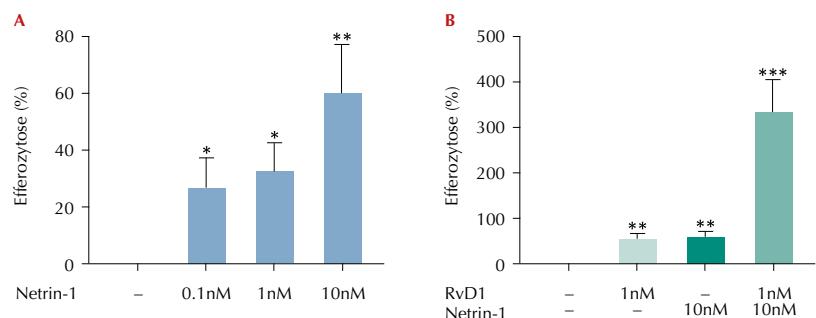
Fragestellung

Eine akute Entzündungsreaktion kann durch ein Gewebetrauma oder durch eine mikrobielle Invasion bedingt sein. Nach Beendigung der Frühphase dieser Entzündungsreaktion müssen die rekrutierten Entzündungszellen aus dem betroffenen Gewebe geklärt werden, um so eine Rückkehr zur Gewebshomöostase zu gewährleisten. Diese Resolutionsphase ist ein aktiver Prozess, der durch eine Reihe spezifischer Lipidmediatoren koordiniert wird. Kennzeichen dieser Entzündungsresolution ist eine Reduktion der pro-inflammatorischen Genexpression, eine reduzierte Leukozytenaktivierung und das Abräumen der inflammatorischen Zellen durch Efferozytose [1,2]. Neuere Arbeiten konnten eine wichtige Rolle des Neuronalen Guidance Proteins Netrin-1 während der Frühphase der akuten Entzündungsreaktion aufzeigen [3]. Die Rolle von Netrin-1 im Rahmen der Entzündungsresolution ist bisher aber nicht bekannt.

Methodik

Die Tierversuchsgenehmigung des zuständigen Regierungspräsidiums lag vor. In vitro wurde die Expression von Netrin-1 in immunkompetenten Zellen mittels FACS-Analysen und Immunhistochemie untersucht sowie die Phagozytose apoptotischer PMN nach Stimulation mit Netrin-1 und/oder Resolvin D1 (RvD1). Die Expression der Resolvin-Rezeptoren ALX und GPR-32 in den Makrophagen wurde nach Stimulation mit Netrin-1 mittels RT-PCR und FACS-Analysen untersucht. In vivo wurde in einem durch Zymosan-A-induzierten Peritonitis-Modell in Wildtyp-Mäusen (ZyA +/- Netrin-1 Injektion) eine Zeitkinetik (0-4h-12h-24h-48h-72h) durchgeführt und die Rekrutierung und Differenzierung immunmodulatorischer und pro-resolutionärer Zellen in der Peritoneallavage mittels FACS-Analysen evaluiert. Zusätzlich wurde die Proteinkonzentration sowie die Konzentration von TNF- α , Interleukin-1 β , Interleukin-6, keratinocyte-derived chemokine (KC), IL-10 und TGF- β mittels ELISA ermittelt. Des Weiteren wurde die Expression der Resolvine, die Apoptose der PMN sowie die Phagozytose apoptotischer PMN bestimmt. Quantitativ wurde der Einfluss von Netrin-1 auf die Entzündungsresolution im Peritonitismodell mit-

Abbildung 1



In-vitro-Efferozytose-Assay: **A)** Netrin-1 erhöht dosisabhängig die Phagozytose apoptotischer PMN
B) Synergistischer Effekt nach Stimulation mit Netrin-1 und RvD1
(n=5 / Gruppe, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

tels des Resolutionsindex erfasst. Die Daten wurden mittels Student's t-test und ANOVA evaluiert.

Ergebnisse

In vitro konnte mittels FACS-Analyse und Immunhistochemie die Expression von Netrin-1 in PMN, Monozyten, Makrophagen und T/B-Lymphozyten nachgewiesen werden. In einem Phagozytose-Assay führte die Stimulation mit Netrin-1 zu einem signifikanten Anstieg der Phagozytose apoptotischer PMN durch Makrophagen. Ein synergistischer Effekt zeigte sich nach Stimulation mit Netrin-1 und RvD1 (Abb. 1A und 1B). Die Stimulation mit Netrin-1 führte zu einem signifikanten Anstieg der Resolvin-Rezeptoren ALX und GPR-32 in den Makrophagen. In vivo führte die Induktion einer akuten Peritonitis unter der Netrin-1 Injektion zu einer signifikanten Reduktion der Leukozytenzahl in das Peritoneum (Zellzahl x10⁶: ZyA: 0h 0,3±0,01; 4h 6,9±0,8; 12h 5,2±0,4; 24h 4,5±0,5; 48h 4,5±0,5; 72h 2,0±0,3 vs. Netrin-1: 0h 0,3±0,002; 4h 3,5±0,5; 12h 2,1±0,5; 24h 1,9±0,4; 48h 2,3±0,6; 72h 1,9±0,3; p<0,01; n=8). Des Weiteren führte die Netrin-1 Injektion im Vergleich zu den nur mit ZyA-injizierten Tieren zu einem signifikanten Anstieg der CX3CR1⁺-Zellen sowie zu einer signifikanten Reduktion der CCR2⁺- und Ly6C⁺-Zellen nach 12h, 24h und 48h. Auch die Konzentration der pro-inflammatorischen Zytokine in der Peritoneallavage war nach Netrin-1 Injektion signifikant reduziert, während IL-10 und TGF- β signifikant erhöht waren. (KC pg/ml; ZyA 7758±1404 vs. Netrin-1: 3376±982; TGF- β pg/ml; ZyA 45±9,6 vs. Netrin-1: 95,55±34,47; p<0,05; n=8). Die Expression der pro-inflammatorischen Lipidmediatoren Leukotrien B₄, Prostaglandin D₂ und Prostaglandin E₂ war signifikant reduziert durch Netrin-1 Injektion im Vergleich zu den mit

ZyA-behandelten Tieren, während die pro-resolutionären Lipidmediatoren RvD1 und Protektin D1 signifikant erhöht waren. Des Weiteren zeigte sich nach 12h, 24h und 48h ein signifikanter Anstieg der PMN-Apoptose sowie eine signifikante Zunahme der Efferozytose durch Netrin-1. Der Resolutionsindex zeigte eine Verkürzung der Resolutionsphase um 4h durch Netrin-1.

Interpretation

Netrin-1 reduziert die Zellzahl sowie die Expression der pro-inflammatorischen Lipidmediatoren und Zytokine. Netrin-1 erhöht die Efferozytose und beschleunigt die Resolutionsphase um 4h. Demzufolge besitzt Netrin-1 anti-inflammatorische, aber auch pro-resolutionäre Funktion während einer experimentell induzierten Peritonitis.

Literatur

1. Serhan CN, Savill J: Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol* 2005;6:1191-1197
2. Serhan CN & Petasis NA: Resolvens and Protectins in Inflammation Resolution. *Chem Rev* 2011;111(10):5922-43
3. Mirakaj V, Laucher S, Mielke C, Morote-Garcia JC, Uerlert KE, Rosenberger P: Netrin-1 dampens Pulmonary Inflammation during Acute Lung Injury. *Am J of Resp Crit Care* 2010;181(8):815-24.

Beeinflussung der Inhibition der Th1-Differenzierung durch micro-RNA-146a-vermittelte Regulation von PRKCe bei Patienten mit Sepsis

P. Möhnle · S. Schütz · J. Briegel · S. Kreth

Klinik für Anaesthesiologie,
Universität München

Korrespondenz:
patrick.moehnle@med.uni-muenchen.de

Fragestellung

Es besteht zunehmende Evidenz, dass microRNAs (miRNAs) eine große Bedeutung bei der Steuerung von T-Zellfunktionen haben. Für miR-146a konnte beispielsweise in Mausexperimenten eine wichtige Funktion bei der Limitierung inflammatorischer Prozesse nachgewiesen werden [1]. Da die adaptive Immunantwort eine zentrale Rolle in der Pathogenese der Sepsis spielt [2], fokussiert das vorliegende Forschungsprojekt auf die Frage, ob miR-146a die T-Zell-Antwort in der Sepsis beeinflusst und, wenn ja, welche Signalwege dabei verändert sein könnten.

Methodik

Aus primären T-Zellen von Patienten mit Sepsis sowie von gesunden Probanden ($n=10$ / $n=6$; Ethikvotum und Einverständnis lagen vor) wurde RNA extrahiert, revers transkribiert, und die Expression spezifischer miRNAs und mRNAs mittels real-time PCR bestimmt. Für Untersuchungen zur Funktion von miR-146a wurden primäre T-Zellen sowie Th1-Zellen (Differenzierung mit IL-12 und anti-IL4 über 4 Tage) gesunder Probanden rezeptorvermittelt aktiviert (anti-CD3/CD28), mit pre-miR-146a oder mit spezifischer siRNA (bzw. mit Kontroll-Oligos) transfiziert und mittels real-time PCR und Western-Blot untersucht. Zum Nachweis der miR-146a-Target-Interaktion wurde ein den 3'-untranslatierten Bereich (3'-UTR) des Zielgens enthaltender Reportervektor kloniert und mit pre-miR-146a (bzw. Kontroll-miR) in HEK293-Zellen co-transfiziert; als Kontrolle dienten Konstrukte mit deletierten miR-146a-Bindungsstellen. Die Aktivität des Transkriptionsfaktors STAT4 wurde durch Transfektion eines STAT4-Reportervektors bestimmt. Alle Reporteraktivitäten wurden luminometrisch

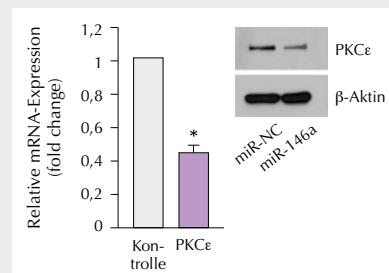
gemessen. Th1- und Th2-T-Zell-Differenzierung wurde durchflußzytometrisch bestimmt. Die statistische Auswertung erfolgte mit t-Test bzw. Mann-Whitney-U-Test.

Ergebnisse

Mittels bioinformatischer Methoden wurde ein zentrales Enzym der intrazellulären Signaltransduktion, die Proteinkinase C epsilon (PRKCe) [3], als potentielles, bislang nicht bekanntes Zielgen der miR-146a ermittelt und im Folgenden experimentell weiter untersucht. T-Zellen von Sepsispatienten wiesen im Vergleich zu gesunden Probanden eine deutlich erniedrigte Expression von miR-146a ($-53\pm5\%$; $p=0,01$) und eine deutlich erhöhte Expression der mRNA von PRKCe ($+45\pm4\%$; $p<0,05$) auf. Mittels Luciferase-Assay konnte die Regulation der PRKCe-Expression durch miR-146a bestätigt werden. Hierbei handelt es sich um einen additiven Effekt der miR-146a-Bindungsstellen im PRKCe-3'-UTR ($n=6$; Reduktion Luciferase vs. Kontrolle $60\pm2\%$; $p<0,001$). Durch Transfektion von pre-miR-146a in primäre T-Zellen konnte die Expression von PRKCe signifikant reduziert werden (Abb. 1); zudem war die Expression der Th1-typischen Zytokine IFN- γ , TNF- α und IL-2 erniedrigt (Reduktion auf $46\pm1,5\%$; $64\pm4\%$; $59\pm3\%$; $p<0,01$; $n=4$). Silencing der PRKCe in primären T-Zellen durch spezifische siRNAs erzielte einen vergleichbaren Effekt auf die Zytokinproduktion, die Transkripte von IFN- γ , IL-2 und TNF- α waren signifikant vermindert (Abb. 2).

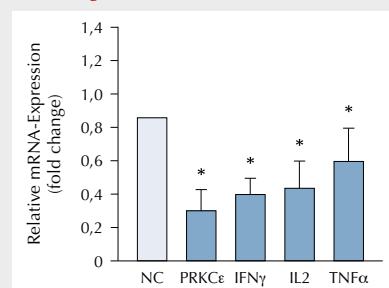
Bei Transfektion von siRNA gegen PRKCe in ausdifferenzierte Th1-Zellen hingegen zeigte sich dieser Effekt nicht, die Zytokinexpression blieb unverändert. Der hieraus zu vermutende Einfluss von PRKCe auf die T-Zelldifferenzierung konnte durch PRKCe-Gensilencing in CD4 $^+$ -T-Zellen und nachfolgende Th1-Ausdifferenzierung nachgewiesen werden: es fand sich ein signifikant erniedrigter Anteil an Th1-T-Zellen ($-26\pm2\%$; $p<0,05$; $n=3$), bei unverändertem Th2-Anteil. Dieser Effekt wird durch eine Verringerung der Aktivität des für die Th1-Differenzierung unabdingbaren Transkriptionsfaktor STAT4 hervorgerufen: Silencing der PRKCe führte zu einer um $38\% (\pm 5\%)$; $n=4$, $p<0,005$) erniedrigten Luciferaseproduktion eines STAT4-Reportervektors.

Abbildung 1



Einfluß von miR-146a auf PKCε-Expression ($n=5$; * $p=0,01$).

Abbildung 2



Expression von Zytokin-mRNA nach Transfektion von siRNA gegen PRKCe in T-Zellen, NC: Kontrolle ($n=5$, * $p<0,05$).

Interpretation

Im Krankheitsbild der Sepsis weisen T-Zellen eine verminderte Expression der miR-146a auf. Dies führt zu einer gesteigerten Expression von PRKCe, was dann über Erhöhung der STAT4-Aktivität zu einer vermehrten Th1-Zell-Differenzierung führt. Dies trägt zur Ausprägung eines pro-inflammatorischen Phänotyps bei.

Literatur

- Yang L, Boldin M.P, Yu Y, et al: Mir-146a controls the resolution of T cell responses in mice. *J Exp Med* 2012;209:1655-1670
- Hotchkiss R.S, Karl I.E: The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 2003;348:138-150
- Basu A, Sivaprasad U: Protein kinase C ϵ makes the life and death decision. *Cell Signal* 2007;19:1633-1642.

Oxidierte Phospholipide als Target bei Entzündung und Schmerz bei Ratten

B. Oehler¹ · D. Pflücke¹ · K. Hill² · M. Schaefer² · N. Roewer¹ · A. Brack¹ · H. Rittner¹

1 Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie, Universitätsklinikum Würzburg
2 Rudolf-Boehm-Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Leipzig

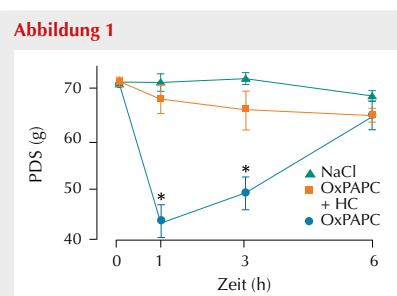
Korrespondenz:
Oehler_B@klinik.uni-wuerzburg.de

Fragestellung

Bei einer Entzündung werden insbesondere von Phagozyten reaktive Sauerstoffradikale gebildet, die mit Proteinen und Lipiden im Gewebe unter Oxidation reagieren. Oxidationsprodukte aktivieren Nozizeptoren (Schmerzfasern) direkt über Transient Receptor Potential (TRP)-Kanäle vom Ankyrin- (TRPA1) und Vanilloid-Typ (TRPV1) [1,2]. Im entzündeten Gewebe entstehen auch oxidierte Phospholipide (OxPL). Oxidiertes 1-Palmitoyl-2-Arachidonoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin (OxPAPC) hat sowohl pro- als auch antiinflammatorische Effekte in der Arteriosklerose sowie bei Lungenentzündung [3]. Die Rolle von OxPAPC in der Pathogenese von Schmerzen ist bisher nicht untersucht. Proinflammatorische Reaktionen von OxPL in der Arteriosklerose können durch ApoA-I-Peptide verhindert werden. ApoA-I-Peptide sind Strukturproteine von HDL-Partikeln, die OxPL neutralisieren. Diese finden bereits in Phase-I-Studien bei stabiler Angina pectoris Anwendung. In dieser Studie untersuchen wir die Hypothese, dass OxPAPC direkt im Gewebe über TRP-Kanäle Nozizeptoren erregt sowie potentielle Behandlungsmöglichkeiten.

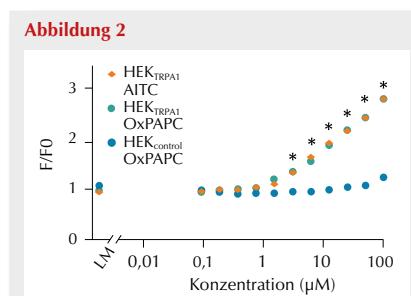
Methodik

Nach Injektion von OxPAPC in verschiedenen Dosierungen in die Hinterpfote von Wistar-Ratten wurden mechanische Pfotendruckschwellen (PDS; Randall-Selitto-Test) sowie thermische Pfotenlatenzzeit (PLT; Hargreaves-Test) nach 10 min - 12 h gemessen. Im nächsten Schritt wurden Schmerzverhaltenstests nach simultaner Applikation des TRPA1-spezifischen Blockers HC-030031 sowie BCTC, einem TRPV1-Kanal-Blocker oder ApoA-I-Peptid durchgeführt. Tierversuche wurden von der Regierung von Unterfranken genehmigt.



OxPAPC induziert mechanische Hyperalgesie. HC-030031 verhindert den Effekt. Nach intraplantarer Applikation von OxPAPC (200 µg; blauer Kreis) in Wistar-Ratten nimmt nach 1 h die Pfotendruckschwelle (PPT) ab und geht nach 6 h zurück auf Ausgangsniveau. Applikation von OxPAPC + HC-030031 (HC, 30 mg/kg KG i.p.; orangener Kasten) blockiert dies.

(Kontrolle: 0,9% NaCl)
(n = 6, Two-Way RM ANOVA, *p < 0,05).



OxPAPC aktiviert TRPA1. OxPAPC führt dosisabhängig zum Kalziumeinstrom in HEK_{TRPA1}-Zellen (grüner Kreis) wie die Positivkontrolle AITC (orange Raute) im Gegensatz zu nicht-transfizierten HEK-Zellen (blauer Kreis). (LM = Lösungsmittel) (n=6, Two-Way ANOVA, *p < 0,05).

Zur Erhebung von Effekt-Dosis-Kurven wurden stabil mit hTRPA1 und rTRPV1-4 transfizierte HEK-293-Zellen sowie nicht-transfizierte HEK-293-Kontrollzellen mit Fluo-4 gefärbt. Mittels FLIPR (Fluorescence Imaging Plate Reader) wurden Kalzium-induzierte Signalanstiege gemessen. Zur Verifikation der intrazellulären Kalziumanstiege wurde in Fura-2/AM-basierten Kalzium-Einzelzellmessungen die Modulation von TRPA1 durch OxPAPC und HC-030031 untersucht.

Ergebnisse

OxPAPC intraprantal in Ratten injiziert führt zu dosisabhängiger, transiente mechanischer und thermischer Hyperalgesie. Durch die simultane Injektion von OxPAPC und HC-030031 oder ApoA-I-Peptid wird die mechanische Hyperalgesie inhibiert (Abb. 1). Thermische Hyperalgesie wird durch die gleichzeitige Applikation von BCTC oder ApoA-I-Peptiden blockiert.

In FLIPR-Experimenten führt OxPAPC zu einem signifikanten, dosisabhängigen Kalziumanstieg in HEK_{TRPA1}-Zellen, nicht aber in HEK_{TRPV1}-Zellen sowie in nicht-transfizierten HEK-293-Kontrollzellen (Abb. 2). Fura-2/AM-basierte Einzelzellmessungen bestätigen das Kalziumsignal in TRPA1-transfizierten HEK-Zellen und in DRG-Neuronen. Durch HC-030031 wird der Kalziumanstieg blockiert.

Interpretation

OxPAPC löst mechanische Hyperalgesie über direkte Aktivierung von TRPA1⁺-Zellen aus. OxPAPC-induzierte thermische Hyperalgesie wirkt in vivo über TRPV1. Die In-vitro-Messungen schließen jedoch eine direkte Aktivierung TRPV1 aus, so dass indirekte Mechanismen weiter untersucht werden müssen. ApoA-I-Peptide lindern OxPAPC-induzierte Hyperalgesie im Tiermodell vermutlich über eine Scavengerfunktion. Sowohl die Wirkung von OxPAPC an TRPA1 als auch der ApoA-I-Peptide bilden Grundlagen neuer Behandlungsoptionen von Entzündungsschmerzen.

Gefördert durch das IZKF Würzburg.

Literatur

- Trevisani M, et al: 4-Hydroxyneonenal, an endogenous aldehyde, causes pain and neurogenic inflammation through activation of the irritant receptor TRPA1. Proc Natl Acad Sci U S A 2007;104(33):13519-13524
- Patwardhan AM, et al: Heat generates oxidized linoleic acid metabolites that activate TRPV1 and produce pain in rodents. J Clin Invest 2010;120(5):1617-1626
- Bochkov VN, et al: Generation and biological activities of oxidized phospholipids. Antioxid Redox Signal 2010;12(8):1009-1059.

VEGF-A-Blockade reduziert das Reperfusionsödem, aber nicht die Ischämie-bedingte Inflammation nach orthotoper Lungentransplantation bei der Ratte

P. Paulus · B. Scheller · K. Zacharowski

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

Korrespondenz: Paulus@med.uni-frankfurt.de

Fragestellung

Das Ischämie-Reperfusionsödem ist die häufigste frühe Komplikation nach Lungentransplantation. Die Ödementstehung wird hauptsächlich durch die Störung der endothelialen Kohärenz hervorgerufen. Der durch die Hypoxie induzierte Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-A nimmt hierbei eine zentrale Stellung ein. Wir konnten bereits nachweisen, dass die VEGF-A-Expression eng mit dem Transplantatversagen und dem Überleben korreliert [1-3]. Wir untersuchten daher in der vorliegenden Arbeit den Effekt einer alleinigen VEGF-A-Blockade mittels Antikörper in einem orthotopen Modell der Lungentransplantation in der Ratte.

Methodik

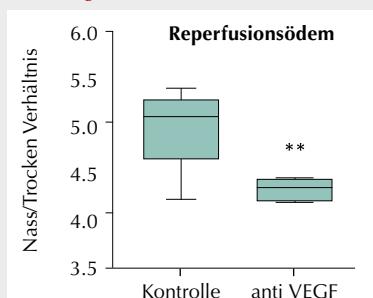
Für die durch die zuständige Behörde genehmigten Tierversuche ergab die Poweranalyse eine Gruppengröße von n=6. Eine statistische Evaluierung wurde mittels ANOVA und Bonferroni's post-Test durchgeführt. Für die Versuche wurden 225-250 g schwere männliche Sprague-Dawley-Ratten verwendet. Um zu zeigen, dass die VEGF-A-Blockade das Reperfusionsödem minimiert, wurde das Modell der orthotopen unilateralen Lungentransplantation in der Ratte verwendet. Hierbei wurde die intubierte und druckkontrolliert-beatmete (Isoflurane 1,5Vol%, Pmax=25mbar, AF=80/min) Ratte links-anterolateral thorakotomiert und die Lunge freigelegt. Nach selektiver Ligatur von Arterie, Bronchus und Vene wurden diese lungennah inzidiert. Die vorbereitete und entsprechend vorbehandelte Spenderlunge wurde dann mittels „cuff-sleeve“-Technik

anastomosiert. Danach wurden sukzessive Venen-, Arterien- und Bronchusligatur eröffnet und bei korrekten Perfusions- und Ventilationsverhältnissen die Empfängerlunge entfernt und der Thorax schichtweise verschlossen. Der anti-VEGF-A-Antikörper wurde dem Spenderorgan (50µg) über die Perfusionslösung zugeführt und dem Empfänger (50µg) zentral 10 Minuten vor Freigabe der retrograden Perfusion injiziert. Die Nachbeobachtung ging über 48 h nach Transplantation. Die VEGF-A-Gruppe wurde mit einer unbehandelten Kontrolle, sowie einer Sham-Gruppe verglichen. Am Ende des Beobachtungszeitraumes wurden die Tiere human getötet und die Lungen zu weiteren Analysen mittels RT-PCR, Western-Blotting und zur Bestimmung des Nass-zu-Trocken-Verhältnisses aufbereitet.

Ergebnisse

Durch die VEGF-A-Blockade wird die VEGF-A Genexpression gegenüber der Kontrolle von 104 ± 10 auf 1609 ± 14 reflektorisch signifikant hochreguliert ($p < 0.01$). Im Gewebe kommt es durch die Antikörperblockade zum signifikanten Absinken des VEGF-A-Protein-Spiegels gegenüber den Kontrollen (33 ± 2 vs. 100 ± 21 ; $p < 0.05$). Gleichzeitig wird das Reperfusionsödem durch die VEGF-A-Blockade signifikant gegenüber den Kontrollen erniedrigt ($4,34 \pm 0,004$ vs. $4,98 \pm 0,169$; $p < 0.01$, Abb.1). Beim mittleren Überleben in Stunden zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den anti-VEGF-A behandelten Tieren und den Kontrollen (27 ± 10 h vs. 17 ± 10 h, n.s.). Pro-inflammatorische Gene wie CXCR-4 (254 ± 54 vs. 91 ± 17 , $p < 0.01$) und ICAM-1 (335 ± 45 vs. 100 ± 39 , $p < 0.001$) sind in der VEGF-A-Antikörper-Gruppe gegenüber den Kontrollen signifikant erhöht, gleichzeitig sind anti-inflammatorische Gene wie IL-13 (8 ± 2 vs. 100 ± 34 , $p < 0.05$) und MRC-1 (27 ± 6 vs. 100 ± 25 , $p < 0.05$) bei den VEGF-A behandelten Tieren signifikant gegenüber den Kontrollen erniedrigt. Im Einklang mit der erhöhten Inflammation ist die Induktion der Apoptose, gemessen mittels Caspase-3-Proteinexpression, in den anti-VEGF-A behandelten Tieren gegenüber den Kontrollen signifikant erhöht (604 ± 62 vs. 100 ± 27 , $p < 0.001$).

Abbildung 1



Nach erfolgter Transplantation war das Reperfusionsödem signifikant niedriger in VEGF-A blockierten Tieren. (n=6/ Gruppe; $p < 0.05$).

Interpretation

VEGF-A trägt zu der direkten Entstehung des Reperfusionsödems durch Erhöhung der Gefäßpermeabilität bei. Durch eine VEGF-A-Blockade wird dieses Ödem signifikant verringert. Jedoch hat diese Therapie keinen Einfluss auf die Expression von pro-inflammatoryischen Genen, welche durch die Hypoxie hochreguliert werden. Eine singuläre Hemmung von VEGF-A wäre zwar ein attraktiver und leicht durchzuführender Therapieansatz, ist aber ohne gleichzeitige Inflammationshemmung nicht zielführend.

Literatur

- Paulus P, et al: Deguelin Attenuates Reperfusion Injury and Improves Outcome after Orthotopic Lung Transplantation in the Rat. PLoS ONE 2012;7(6): e39265. doi:10.1371/journal.pone.0039265
- Krenn K, et al: Vascular endothelial growth factor increases pulmonary vascular permeability in cystic fibrosis patients undergoing lung transplantation. Eur J Cardiothorac Surg 2007;1:35-41
- Abraham D, et al: Upregulated hypoxia-inducible factor-1 DNA binding activity to the vascular endothelial growth factor-A promoter mediates increased vascular permeability in donor lung grafts. Ann Thorac Surg 2004;77:1751-5.

Mögliche Auswirkungen der Epiduralanalgesie auf Morbidität und Letalität nach großen chirurgischen Eingriffen. Eine systematische Übersichtsarbeit mit Meta-Analyse

D. M. Pöpping¹ · N. Elia² · H. Van Aken³ ·
M. R. Tramèr² · E. Marret⁴ · St. S. Schug⁵ ·
M. Wenk² · P. Kranke⁶

- 1 Klinik für Anästhesiologie, operative Intensivmedizin und Schmerztherapie, Universitätsklinikum Münster
- 2 Klinik für Anästhesiologie, Universitätsspital Genf (Schweiz)
- 3 Klinik für Anästhesiologie, operative Intensivmedizin und Schmerztherapie, Universitätsklinikum Münster
- 4 Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin, Publique Hôpitaux de Paris, Paris (Frankreich)
- 5 Pharmacy and Anaesthesia Unit, School of Medicine and Pharmacology, University of Western Australia, Perth (Australien)
- 6 Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie, Universitätsklinikum Würzburg

Korrespondenz: poppind@uni-muenster.de

Fragestellung

Bislang ist nicht ausreichend geklärt, ob die Epiduralanalgesie (EA) als Ergänzung zur Allgemeinanästhesie einen Vorteil jenseits der Verbesserung der Analgesie bietet. Bisherige systematische Übersichtsarbeiten und randomisierte Studien kamen bezüglich dieser Fragestellung zu gegensätzlichen Ergebnissen [1,2]. Die Furcht vor juristischen Klagen durch schwere neurologische Komplikationen hat zudem zu einem Rückgang der Anwendung der EA geführt [3]. Ziel dieser Metaanalyse war es, die Effekte der EA auf die Morbidität und Letalität nach großen chirurgischen Eingriffen zu untersuchen.

Methodik

Wir führten eine systematische Literatursuche in den Datenbanken PubMed, EMBASE, CENTRAL, BIOSIS, CINAHL durch (bis 07.2012). Einschlusskriterien waren: erwachsene Patienten, große operative Eingriffe (Abdominalchirurgie, Gefäßchirurgie, Gynäkologie,

Orthopädie, Thoraxchirurgie, Urologie), ein randomisierter Vergleich zwischen Allgemeinanästhesie mit EA (unter Verwendung eines Lokalanästhetikums mit oder ohne Adjuvanten für mindestens 24 Stunden Dauer) und Allgemeinanästhesie ohne EA. Für kontinuierliche Variablen errechneten wir gewichtete mittlere Differenzen (WMD), für dichotome Daten Odds Ratios (OR), jeweils mit 95%igem Konfidenzintervall (95% CI).

Ergebnisse

Insgesamt konnten 125 Studien (9.044 Patienten, von denen 4.525 eine EA erhielten) in die Analyse eingeschlossen werden. Durch direkten Autorenkontakt gelang es bislang unveröffentlichte Daten inklusive 49 bislang unpublizierte Todesfälle mit in die Analyse einfließen zu lassen. 83 Studien (7.766 Patienten) berichteten über das Auftreten von perioperativen Todesfällen. Die Letalitätsrate betrug insgesamt 2,0% (80/3911) bei Patienten, die eine EA zusätzlich zur Allgemeinanästhesie erhalten hatten, und 3,2% (122/3855) in der Kontrollgruppe in einem Follow-up Zeitraum von bis zu 10 postoperativen Jahren. Das entspricht einer OR von 0,69 (95% CI: 0,51 bis 0,92) und einer NNT von 90. Dieser Effekt war unabhängig von der Insertionshöhe, der Art des chirurgischen Eingriffs, dem Alter und der Qualität der Studien sowie dem Ein- oder Ausschluss der unpublizierten Todesfälle. Keinen signifikanten Einfluss zeigte die EA auf die 30-Tage-Mortalität (OR 0,89; 95%CI: 0,60 bis 1,31) und 90-Tage-Mortalität (OR 0,83; 95%CI: 0,58 bis 1,19). Die EA verringerte signifikant kardiovaskuläre (Herzrhythmusstörungen, tiefe Venenthrombose) sowie pulmonale (Pneumonie, Atemdepression und Atelektasenbildung) Komplikationen und war mit positiven Effekten auf den Gastrointestinaltrakt (Ileusrate / Erholung der gastrointestinalen Funktion, Inzidenz von Übelkeit und Erbrechen) assoziiert.

Die Epiduralanalgesie war mit einem erhöhten Risiko für das Auftreten einer Hypotonie, einem Juckreiz, einer Harnretention und von motorischen Blockaden assoziiert. In 6,1% ereigneten sich technische Fehler.

Interpretation

Bei erwachsenen Patienten, die sich großen chirurgischen Eingriffen unterziehen, hat die Kombination aus Allgemeinanästhesie und Epiduralanalgesie möglicherweise positive Auswirkungen auf die perioperative Letalität von Patienten. Es traten eine Reihe von kardiovaskulären, pulmonalen und gastrointestinalem Komplikationen bei Patienten mit EA seltener auf im Vergleich zu Patienten, die keine zusätzliche EA erhielten. Die vorliegende Analyse vermag angesichts der methodenimmanenten Risiken und mitunter assoziierten schweren neurologischen Komplikationen eine verlässliche Basis hinsichtlich eines möglichen Nutzens – jenseits einer verbesserten Analgesie – für eine individuelle perioperative Nutzen-Risiko-Abwägung zu liefern.

Förderung: Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF), Förderkennzeichen: 01KG1107.

Literatur

- Rodgers A, Walker N, Schug S, McKee A, Kehlet H, van Zundert A, et al: Reduction of postoperative mortality and morbidity with epidural or spinal anaesthesia: results from overview of randomised trials. *BMJ* 2000;321:1493
- Rigg JR, Jamrozik K, Myles PS, Silbert BS, Peyton PJ, Parsons RW, et al: Epidural anaesthesia and analgesia and outcome of major surgery: a randomised trial. *Lancet* 2002;359:1276-82
- Rawal N: Epidural technique for postoperative pain: gold standard no more? *Reg Anesth Pain Med* 2012;37:310-7.

Die reduzierte Formation von Neutrophil Extracellular Traps (NETs) durch Inhibition der CXCL4/CCL5-Heteromerbildung mildert das akute Lungenversagen

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

Klinik für Anästhesiologie, operative Intensivmedizin und Schmerztherapie,
Universitätsklinikum Münster

Korrespondenz: rossaint@uni-muenster.de

Fragestellung

Das akute Lungenversagen ist eine Erkrankung mit einer hohen Morbidität und Letalität [1]. Die Interaktion von polymorphnukleären Granulozyten (PMNs) und Thrombozyten ist an der Rekrutierung von PMNs im Rahmen des akuten Lungenschadens beteiligt [1,2]. Aktivierte Thrombozyten sekretieren die proinflammatorischen Chemokine CXCL4 (Plättchen-Faktor 4, PF4) und CCL5 (RANTES). Das Heteromer aus beiden Chemokinen ist an der Rekrutierung von PMNs beteiligt [3]. Diese Heteromerbildung kann durch einen Peptid-Antagonisten (MKEY) blockiert werden [3]. Der Mechanismus der verminderten PMN-Rekrutierung durch Inhibition der CXCL4/CCL5-Heteromerbildung ist bis heute nicht aufgeklärt. Neben der Freisetzung von Sauerstoffradikalen und Proteasen können PMNs auch direkt pathogene Bakterien über die Bildung von Neutrophil Extracellular Traps (NETs) einfangen. Das Ziel dieser Studie ist die Untersuchung der Rolle der Inhibition der CXCL4/CCL5-Heteromerbildung durch MKEY auf die NET-Formation und die Rekrutierung von PMNs in die Lunge in einem murinen Modell des akuten Lungenschadens.

Methodik

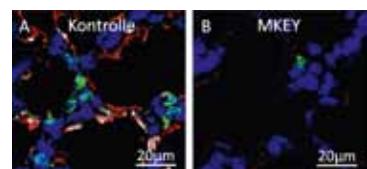
Alle Tierversuche wurden von der Tierschutzkommission genehmigt. Die Anästhesie erfolgte durch intraperitoneale Injektion von Ketamin und Xylazin. Zur Induktion des Ventilator-induzierten Lungenversagens (Ventilator Induced Lung Injury, VILI) wurden Mäuse über 2 Stunden mit niedrigen Atemwegsdrücken (EIP 15 cmH₂O, PEEP 5 cmH₂O, AF 130/min) oder hohen Atemwegsdrücken (EIP 42 cmH₂O, PEEP 5 cmH₂O, AF 40/min) beatmet. Die Rekrutierung von PMNs in die Lunge, die vaskuläre Permeabilität und der Gasaustausch

wurden gemessen (n=4). In einigen Gruppen wurde die CXCL4/CCL5-Heteromerbildung durch Applikation von MKEY inhibiert (n=4). In weiteren Gruppen wurden Thrombozyten mittels Busulfan depletiert (n=6). Die Formation von zirkulierenden Thrombozyten-PMN-Aggregaten 30 Minuten nach Induktion des VILI wurde durchflusszytometrisch bestimmt (n=4). In einigen Experimenten wurde die Lunge nach 30 Minuten Beatmungsdauer entnommen und eine Immunfluoreszenzfärbung zur Darstellung von PMNs (Gr1), Thrombozyten (CD41), extrazellulären Histonen (H3) und intrazellulärer DNA (Hoechst-33342) durchgeführt (n=4). Zirkulierende NET-Strukturen im Plasma wurden mit Hilfe eines Myeloperoxidase-DNA-ELISA quantifiziert (n=4). Die statistische Signifikanz-Bestimmung erfolgte mittels One-way ANOVA und anschließenden Student-Newman-Keuls-Tests oder t-Tests. Das Signifikanz-Niveau wurde bei p<0,05 festgesetzt.

Ergebnisse

Die Induktion des VILI führte zu einem Anstieg der zirkulierenden Thrombozyten-PMN-Aggregate im Blut, zu einer gesteigerten PMN-Rekrutierung in die Lunge, zu einer erhöhten vaskulären Permeabilität und einer vermehrten Anzahl zirkulierender NET-Strukturen. Hieraus resultiert ein verminderter Gasaustausch. Die Thrombozyten-Depletion, die Vorbehandlung mit MKEY oder die Gabe von blockierenden Antikörpern gegen CXCL4 und/oder CCL5 reduzierte die Anzahl der PMNs in der Lunge, die vaskuläre Permeabilität und verbesserte den Gasaustausch. Die Kombination von Thrombozyten-Depletion und Vorbehandlung mit MKEY oder CXCL4/CCL5-Antikörpern zeigte keinen zusätzlichen additiven Effekt. Die VILI-Induktion führte zur NET-Formation und zur Bildung von Thrombozyten-PMN-Komplexen in der Lunge (Abb. 1A). Die Vorbehandlung mit MKEY vor der Induktion des VILI verhinderte die Bildung von NET-Strukturen und Thrombozyten-PMN-Komplexen (Abb. 1B). Die Inhibition der NET-Formation durch Vorbehandlung mit DNase verhinderte die PMN-Rekrutierung und die vaskuläre Permeabilität und verbesserte den Gasaustausch. Um die klinische Relevanz der Gabe von MKEY zu untersuchen, wurde MKEY in zusätzlichen Experimenten nach der Induktion des VILI appliziert. Die Applikation

Abbildung 1



NET-Strukturen (rot) in der Lunge von Kontrolltieren (A) und nach Vorbehandlung mit MKEY (B).

PMNs grün, Histon H3 rot, zelluläre DNA blau, Thrombozyten grau.

von MKEY 15 Minuten nach der Induktion des VILI konnte ebenfalls den Schweregrad des akuten Lungenversagens vermindern.

Interpretation

Die Inhibition der CXCL4/CCL5-Heteromerbildung durch MKEY verhindert die Bildung von NETs und die PMN-Rekrutierung in die Lunge. Dies minderte den Schweregrad des VILI und hat potentielle Bedeutung für die Entwicklung neuer Therapieansätze in der Behandlung des akuten Lungenversagens.

Literatur

1. Matthay MA, Ware LB, Zimmerman GA: The acute respiratory distress syndrome. J Clin Invest 2012;122:2731-40.
2. Zarbock A, Singbartl K, Ley K: Complete reversal of acid-induced acute lung injury by blocking of platelet-neutrophil aggregation. J Clin Invest 2006;116:3211-3219.
3. Grommes J, Alard JE, Drechsler M, Wantha S, Morgelin M, Kuebler WM, et al: Disruption of platelet-derived chemokine heteromers prevents neutrophil extravasation in acute lung injury. Am J Respir Crit Care 2012;185:628-36.

Verträglichkeit und Wirkmechanismen von Claudin-1-Interferenzpeptiden (C1C2) zur Öffnung des Perineuriums für eine Regionalanalgesie bei Ratten

S. Sauer¹ · D. Hackel^{1,3} · B. Niedermirtl¹ · C. Staat² · I. Blasig² · N. Roewer¹ · H. L. Rittner¹ · A. Brack¹

1 Klinik und Poliklinik für Anaesthesiologie, Universitätsklinikum Würzburg

2 Leibniz Institut für Molekulare Pharmakologie, Berlin-Buch

3 Klinik für Anästhesiologie, Charité-Universitätsmedizin, Campus Benjamin Franklin, Berlin

Korrespondenz: sauer_R2@klinik.uni-wuerzburg.de

Fragestellung

Die perineurale Anwendung von Opoiden am N. ischiadicus bzw. bei Regionalanästhesie unter normalen Bedingungen führt in Tiermodellen bzw. in Studien am Menschen zu keiner überzeugenden Opoidwirkung. Perineurialzellen im Perineurium bilden über Tight Junction Proteine (TJ) und insbesondere das abdichtende Claudin-1 eine Barriere, die eine Penetration von hydrophilen Opoiden verhindert. Wirkstoffvermittler wie hypertone Kochsalzlösung, Metalloproteinsase-9-Hemopexin-Domäne, Claudin-1 siRNA können die Barriere öffnen und antinociceptive Effekte von hydrophilen Opoiden wie [D-Ala2, N-MePhe4, Gly5-ol]-Enkephalin (DAMGO) ermöglichen [1,3]. Alternativ können spezifische Claudin-1 Interferenzpeptide (C1C2) eingesetzt werden [2]. C1C2 bindet an die zweite Hälfte des ersten extrazellulären Loop des Claudin-1. C1C2 öffnet in vitro die Barriere von Darmepithelzellen (Caco-Zellen) und ermöglicht bei perineuraler Anwendung eine Opoidwirkung bei nicht vorbehandelten Ratten. Vor einer In-vivo-Anwendung müssen Spezifität und Toxizität der Interferenzpeptide sowie die Wirksamkeit klinisch zugelassener Opioide wie z.B. Morphin untersucht werden.

Methodik

Alle Untersuchungen an Wistar-Ratten wurden von der Regierung von Unterfranken genehmigt. Die Spezifität und Internalisierung von C1C2 wurde in vitro in Pulldown-Experimenten mit kloniertem Claudin-1 (Claudin 2 als Kontrolle) bzw. in Caco-Zellen mitfluoreszierendem C1C2-TAMRA (Tetramethylrhodaminazid) untersucht. In vivo wurden C1C2 oder C1C2-TAMRA perineural an normale Ratten bzw. Ratten mit Pflotenentzündung (150 µl komplettes Freunds Adjuvans, CFA, intraplantar) injiziert. Nach 1-7 d wurden Opioide perineural injiziert und nozizeptive Schwellen (Pfotendruckschwelle) und Motorfunktionstests (Rota Rod) gemessen bzw. Nervengewebe für Dünnschichtschnitte, Immunhistochemie und Testung der Barrierefunktion entnommen.

Ergebnisse

C1C2 und C1C2-TAMRA binden spezifisch an die erste extrazelluläre Loop von Claudin-1. C1C2-TAMRA internalisiert in Caco-Zellen. TAMRA alleine wird kaum internalisiert. Perineurale Gabe von C1C2 öffnet das Perineurium für den Farbstoff Evans-Blue-Albumin (EBA, Abb. A) nach 1-2 d, so dass EBA Färbung im Vergleich zur Kontrolle im Endoneurium (Endo) des Nerven nach 24 bzw. 48 h sichtbar wird. C1C2-TAMRA (rot) bindet an Claudin-1 (grün) im Perineurium (Peri) am stärksten nach 24 h (Abb. B), während die Claudin-1 Immunreaktivität weiter abnimmt. Perineurale Injektion von C1C2 am N. ischiadicus ermöglicht einen Anstieg der mechanischen nozizeptiven Schwellen (Pfotendruckschwelle) durch Morphin oder DAMGO 1-2 d (24 bzw. 48 h) nach perineuraler Peptidgabe bei normalen Ratten oder Ratten mit Hinterpfotenentzündung (CFA, Abbildung C) (Mittelwerte ± SEM, * p<0.05, Two-way Repeated Measurement ANOVA n = 6 Ratten/Gruppe). Die Motorik bleibt unbeeinträchtigt. In der In-vivo-Verträglichkeitsprüfung bleibt die Morphologie des Nerven, d.h. die Myelinierung und Anzahl der Axone,

unverändert, und es kommt zu keiner Infiltration von Makrophagen nach 7 d. Es gibt keine Veränderungen der nozizeptiven basalen Schwellen im Zeitverlauf.

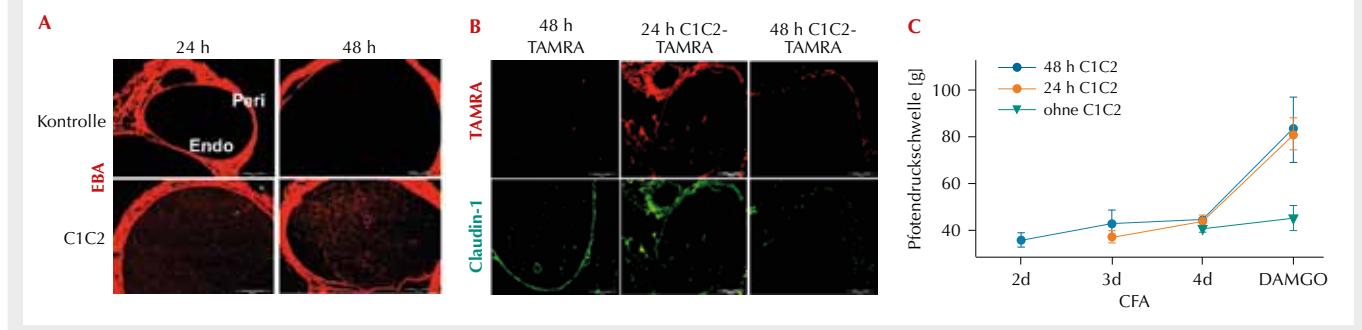
Interpretation

C1C2 bindet spezifisch an Claudin-1 in vitro und im Perineurium und ermöglicht eine nozizeptionsspezifische Regionalanalgesie von Opoiden ohne motorische Funktionsbeeinträchtigung und ohne längerfristige Schädigung des Nerven bei Wistar-Ratten. Dadurch könnte klinisch eine insbesondere für den postoperativen Bereich wichtige Regionalanalgesie bei erhaltener Motorik erzielt werden.

Literatur

- Rittner H.L, Amasheh S, Moshourab R, Hackel D, Yamdeu R.S, Mousa S.A, Fromm M, Stein C, Brack A: Modulation of Tight Junction Proteins in the Perineurium to Facilitate Peripheral Opoid Analgesia. *Anesthesiology* 2012;16: 1323-34
- Zwanziger D, Hackel D, Staat C, Bocker A, Brack A, Beyermann M, Rittner H, Blasig I.E: A peptidomimetic tight junction modulator to improve regional analgesia. *Mol Pharm* 2012;9:1785-94
- Hackel D, Krug SM, Sauer RS, Mousa SA, Bocker A, et al: Transient opening of the perineurial barrier for analgesic drug delivery. *PNAS* 2012;109:E2018-27.

Abbildung 1



Toll-like-Rezeptor-Liganden supprimieren die Immunantwort bei Sepsis: In-vitro-Versuche, Experimente an TLR-9-knockout-Mäusen und klinische Daten

S.T. Schäfer^{1,2} · M. Adamzik¹ · S. Frede^{2,3} · J. Walden¹ · N. Schönborn¹ · J. Fandrey² · A. Limmer⁴ · J. Peters¹

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

Korrespondenz: simon.schaefer@uni-due.de

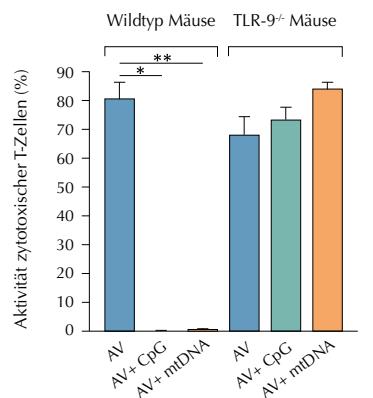
Fragestellung

Die Letalität bei Sepsis wird nicht nur durch systemische Inflammation, sondern vermutlich auch durch Antiinflammation und Immunsuppression bedingt [1]. TLR-Liganden induzieren in myeloiden Zellen zunächst die hypoxisch-inflammatorische Genregulation mit ihren Schlüsselproteinen, Nuklear-Faktor-kappaB1 (NFκB1) und Hypoxie-induzierbarer-Faktor-1α (HIF-1α) [2,3]. Unbekannt ist, welche Effekte eine prolongierte Exposition gegenüber TLR-Liganden hat und ob endogene TLR-Liganden wie mitochondriale DNA (mtDNA) zu einer Antiinflammation und Gen-Suppression führen. Wir testeten ob 1) eine prolongierte Stimulation myeloider Zellen mit mtDNA zur Suppression des innaten Immunsystems führt, 2) mtDNA, TLR-9 abhängig, die adaptive Immunantwort (zytotoxische T-Zellen) inhibiert 3) bei Patienten mit Sepsis mtDNA Serumkonzentration erhöht und HIF-1α Genexpression supprimiert ist, und 4) die klinische Variabilität bei Sepsis auch durch einen Polymorphismus (-94ins/delATTG im NFκB1-Promotor) bedingt ist.

Methodik

Zunächst wurde der Einfluß bakterieller Toxine (LPS, Enterotoxin, Streptolysin O) und mtDNA auf HIF-1α (mRNA Expression: RT-PCR; Protein: Western Blot) in naiven sowie endotoxin-toleranten monozytären Zellen mit/ohne prolongierte Stimulation untersucht. Des Weiteren wurde an TLR-9-Knockout- und Wildtyp-Mäusen geprüft, ob bakterielle DNA (CpG's) bzw. mtDNA zu einer Suppression zytotoxischer T-Zellen führt. Zusätzlich wurden nach positivem Ethikvotum 250 Patienten mit Sepsis sowie 155 gesunde Probanden in eine prospektive Beobachtungsstudie eingeschlossen. Bestimmt wurden mtDNA Serumkonzentration (RT-PCR: D-Loop 1; ATPase 6), leukozytäre HIF-1α mRNA Expression (RT-PCR; housekeeping Gen: GAPDH) und -Pro-

Abbildung 1



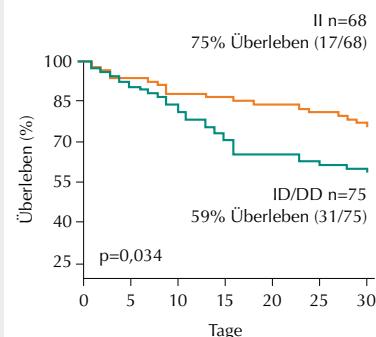
Aktivität zytotoxischer T-Zellen in Wildtyp- und TLR-9^{-/-}-Mäusen nach Adenovirusinfektion (AV) mit/ohne von CpG's/mitochondrial DNA (mtDNA): CpG's und mtDNA supprimieren die Aktivität zytotoxischer T-Zellen in Wildtyp, nicht jedoch in TLR-9^{-/-}-Mäusen.

tein (Immunfluoreszenz) sowie das Vorliegen des NFκB1-Promotorpolymorphismus (-94ins/delATTG; Pyrosequenzierung). Statistik: Mittelwerte \pm SD; Mann-Whitney-U-Test; Ein-Weg-ANOVA mit Post-hoc-t-Test; Spearman-Korrelation; binär logistische Regression $p<0,05$.

Ergebnisse

Bakterielle Bestandteile/mtDNA führen bei einmaliger Stimulation zu einer HIF-1α-mRNA Expressionssteigerung in monozytären Zellen (LPS: 30-fach \pm 42 SD; Enterotoxin: 15-fach \pm 20; Streptolysin 5-fach \pm 3, mtDNA 2,8 \pm 2; alle $p=0,01$ für Stimulus vs. Kontrolle und 4h vs. 24h). Bei repetitiver Gabe jedoch verlieren die Zellen ihre Fähigkeit zur Steigerung von HIF-1α mRNA und Protein (alle $p=n.s.$). In Wildtyp-Mäusen inhibieren CpG's ($p=0,01$) und mtDNA ($p=0,001$) die zytotoxische T-Zellaktivität um 90%. Dieser Effekt ist bei TLR-9-Knockout-Mäusen aufgehoben (Abb. 1). Bei Patienten mit Sepsis ($n=107$) waren die mtDNA-Serumkonzentration stark erhöht (ATPase 6: 64-fach \pm 84; D-Loop1: 79-fach \pm 83; $p=0,0001$), die HIF-1 mRNA-Expression (-67%, $p=0,0001$) und das intrazelluläre HIF-1α Protein (-66%, $p=0,01$) jedoch supprimiert. Die HIF-1 mRNA Expression korrelierte sowohl mit der ATPase 6 Serumkonzentration ($R^2=0,251$; $p=0,011$) als auch invers mit dem Schweregrad der Erkrankung (Simplified Acute Physiology Score II; $r=-0,29$; $p=0,0001$). Des Weiteren war die mtDNA-Konzentration mit der des antiinflammatorischen Zytokins Interleukin 10 (ATPase 6 $R^2=0,339$; $p=0,0001$; D-Loop1: $R^2=0,282$; $p=0,0001$) sowie dem Schweregrad der Erkrankung (Simplified Acute Physiology Score II; $R^2=0,347$; $p=0,0001$; D-Loop1: $R^2=0,341$ $p=0,0001$) assoziiert. Der NFκB1-Promotor-Polymorphismus

Abbildung 2



Das Deletions-Allel des NFκB1-Promotor-Polymorphismus (-94ins/delATTG) ist unabhängiger Prädiktor für die 30-Tage-Letalität bei Sepsis.

(homozygoter Deletionsgenotyp; DD) war im Vergleich zum Insertionsgenotyp (II) mit einer verstärkten NFκB1-Kerntranslokation ($p=0,001$), einer 3-fach höheren mRNA-Expression ($p=0,001$) sowie Verdopplung der Tissue Factor Expression ($p=0,021$) assoziiert. Zudem war das Deletions Allel bei Patienten mit Sepsis ($n=143$) ein unabhängiger Prädiktor für die 30-Tage-Letalität (Hazard Ratio, 2,3; 95% CI, 1,13-4,8; $p=0,022$; II vs. ID/DD-Genotyp: 25 vs. 41%, $p=0,034$).

Interpretation

Die Genexpression bei Sepsis ist also differenziell reguliert: 1) Initial stimulieren TLR-Liganden das innate Immunsystem. 2) prolongierte Stimulation führt jedoch zu Endotoxintoleranz, was 3) neben dem innaten Immunsystem, TLR-9-abhängig, auch die Aktivität zytotoxischer T-Zellen, also das adaptive Immunsystem supprimiert. Bei Patienten mit Sepsis sind zudem 4) mtDNA-Konzentration erhöht und hypoxische Genregulation (HIF-1α) supprimiert, wobei 5) ein NFκB1-Promotor-Polymorphismus eine Ursache für die hohe intraindividuelle Variabilität von Genexpression und Outcome bei Sepsis und insbesondere unabhängiger Prädiktor für die Letalität ist. Weitere Studien werden zeigen, ob die Umprogrammierung der Inflammation in eine immununsensitiv wirkende Antiinflammation modifiziert werden kann.

Literatur

- Oschowski MF, Welch K: Circulating cytokine/inhibitor profiles reshape the understanding of the SIRS/CARS continuum in sepsis and predict mortality. *J Immunol* 2006;177:1967-74
- Eltzschig HK, Carmeliet P: Hypoxia and inflammation. *N Engl J Med* 2011;364:656-65
- Rius J, Guma M, Schachtrup C: NF-κB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1α. *Nature* 2008;453:807-11.

Phosphodiesterase-4-Inhibition verbessert die mesenteriale Mikrozirkulation durch die Reduktion der endothelialen Schrankenstörung in der polymikrobiellen Sepsis bei Ratten

M. A. Schick¹ · S. Flemming² · J. Wollborn¹ · W. Baar¹ · C. T. Germer² · N. Roewer¹ · N. Schlegel² · C. Wunder¹

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

Korrespondenz:
Schick_M@klinik.uni-wuerzburg.de

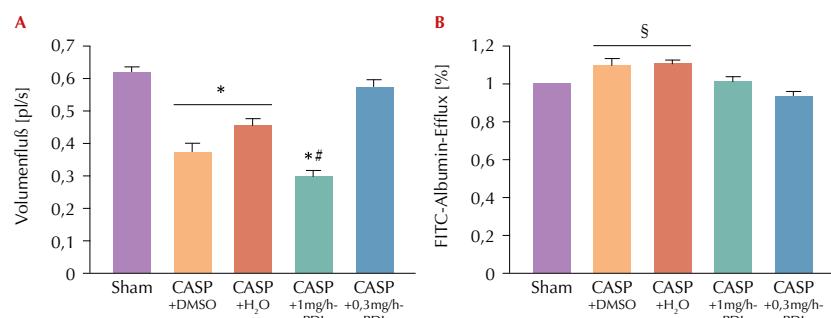
Einleitung

Die Entwicklung einer endothelialen Schrankenstörung in der Sepsis führt über den Verlust von intravasaler Flüssigkeit zu Mikrozirkulationsstörungen und Organversagen. Eine spezifische Therapie für dieses Problem existiert nicht. Vorarbeiten zeigen, dass die endotheliale Schrankenstörung durch einen Abfall endothelialer cAMP-Spiegel induziert wird und dass in der systemischen Hyperinflammation eine systemische Applikation von Phosphodiesterase-4-Inhibitoren (PDI) zur Stabilisierung der endothelialen Schrankenstörung führt [1]. In der aktuellen Studie wurde an einem Modell der polymikrobiellen Sepsis untersucht, ob ein derartiger Ansatz auch in der polymikrobiellen Sepsis die endothelialen Schrankenstörung stabilisiert und welche Aus- und Nebenwirkungen die PDI-Applikation auf die Makro- und Mikrohämodynamik hat.

Methoden

Nach behördlicher Genehmigung wurden 31 männliche SD-Ratten (350 ± 40 g) narkotisiert und für eine invasive kontinuierliche Blutdruckmessung und zentralvenöse Medikamentenapplikation instrumentiert. Alle Tiere ($n=5-7/\text{Gruppe}$) wurden laparotomiert und bis auf die Tiere der Sham-Gruppe eine polymikrobielle Sepsis durch Implantation eines Stents in das Colon ascendens (Colon ascendens Stent Peritonitis = CASP) induziert. Nach Verschluss des Abdomens erfolgten Substitution des Flüssigkeitsgrundbedarfs ($14,4 \text{ ml/kg}/24 \text{ h} \text{ NaCl } 0,9\%$) und Analgesie (Fentanyl i.v.). Nach 12 h erhielten die Tiere über weitere 12 h kontinuierlich: H_2O [5ml/12h Ampuwa] (CASP+ H_2O -Gruppe), DMSO [0,5ml DMSO+4,5ml Ampuwa] (CASP+DMSO-Gruppe; Sham-Gruppe), 1mg/h-PDI [PDI

Abbildung 1



A) Mesenteriale Mikrozirkulation nach 24h CASP-Sepsis. Die Vehikelgruppen CASP+DMSO und CASP+ H_2O zeigten eine signifikant reduzierte Mikrozirkulation. Die 1,0 mg/h PDI Rolipram Therapie verschlechterte zusätzlich die Mikrozirkulation, wohingegen durch 0,3mg/h PDI eine signifikante Verbesserung erreicht wurde ($p<0,05$, *vs. Sham und CASP+Rolipram 0,3mg/h, *#vs. CASP+DMSO, CASP+ H_2O).

B) Quantifizierung der endothelialen Schrankenstörung durch Extravasation von FITC-Albumin im Vergleich zu Sham. Im Vergleich zu CASP+0,3 mg/h PDI kam es zur signifikanten Steigerung des Albumin-Austritts bei CASP+DMSO (17%) bzw. CASP+ H_2O (18%) ($p<0,05$, § vs. CASP+0,3mg/h Rolipram).

Rolipram in 1,5ml DMSO+3,5ml Ampuwa] (CASP+1mg/h-PDI-Gruppe) bzw. 0,3 mg/h-PDI [PDI Rolipram in 0,5ml DMSO+4,5ml Ampuwa] (CASP+0,3mg/h-PDI-Gruppe). Nach 24h wurden die Tiere erneut narkotisiert, tracheotomiert und maschinell beatmet und für die Messung der mesenterialen Mikrozirkulation und der endothelialen Schrankenstörung zur Intravitalmikroskopie re-laparotomiert [1]. Die endotheliale Schrankenstörung wurde durch Messung der Extravasation von i.v. appliziertem Fluorescein-isothioncyanat-conjugat-(FITC)-Albumin (5 mg/100g KG) ermittelt. Postmortale erfolgte eine Interleukin-6 Bestimmung aus den Seren der Versuchstiere mittels Multiplex Luminex® Assay. Statistische Auswertungen erfolgten mit ANOVA mit Post-hoc-Testung n. Duncan, Kruskal-Wallis-Test und konsekutiven Mann-Whitney-U-Tests mit Bonferroni Korrektur ($MW \pm SEM$).

Ergebnisse

Alle CASP-Tiere zeigten klinische Zeichen einer schweren Sepsis mit erhöhten IL-6-Spiegeln (CASP+DMSO $1986 \pm 1027 \text{ pg/ml}$, CASP+ H_2O $909 \pm 186 \text{ pg/ml}$, CASP+1mg/h-PDI $3027 \pm 2010 \text{ pg/ml}$, CASP+0,3mg/h-PDI $4204 \pm 2270 \text{ pg/ml}$) verglichen mit Sham ($493 \pm 203 \text{ pg/ml}$). Die Applikation von PDI führte 24 h nach Sepsisinduktion zu keiner relevanten Veränderung der Makrohämodynamik (MAD, ZVD, HF) zwischen den CASP-Gruppen. In der CASP+0,3 mg/h PDI-Gruppe zeigte sich eine Stabilisierung der endothelialen Schrankenstörung im Vergleich zu den CASP+DMSO und CASP+ H_2O (Abb. 1B). Gleichzeitig wurde durch die 0,3 mg/h PDI-Applikation eine signifikante Verbesserung der mesenterialen Mikrozirkulation gegenüber allen anderen CASP-Gruppen beobachtet ohne Unterschied zur Sham-Gruppe (Abb. 1A). Die 1 mg/h PDI-Therapie verschlechterte dagegen die Mikrozirkulation.

namik (MAD, ZVD, HF) zwischen den CASP-Gruppen. In der CASP+0,3 mg/h PDI-Gruppe zeigte sich eine Stabilisierung der endothelialen Schrankenstörung im Vergleich zu den CASP+DMSO und CASP+ H_2O (Abb. 1B). Gleichzeitig wurde durch die 0,3 mg/h PDI-Applikation eine signifikante Verbesserung der mesenterialen Mikrozirkulation gegenüber allen anderen CASP-Gruppen beobachtet ohne Unterschied zur Sham-Gruppe (Abb. 1A). Die 1 mg/h PDI-Therapie verschlechterte dagegen die Mikrozirkulation.

Schlussfolgerung

Die systemische Applikation des Phosphodiesterase-4-Inhibitors Rolipram stabilisiert dosisabhängig die Endothelbarriere und verbessert die mesenteriale Mikrozirkulation in der polymikrobiellen Sepsis ohne makrohämodynamische Nebenwirkungen. Die vorliegenden Daten legen nahe, dass mittels Applikation von PDI in der Sepsis eine spezifische Therapie zur Behandlung der endothelialen Schrankenstörung entwickelt werden könnte.

Literatur

1. Schick MA, Wunder C, Wollborn J, Roewer N, Waschke J, Germer CT, Schlegel N: Phosphodiesterase-4 inhibition as a therapeutic approach to treat capillary leakage in systemic inflammation. *J Physiol* 2012;590:2693-708.

Anstieg von proangiogenen Zellen nach präoperativer Spiroergometrie assoziiert mit postoperativen Komplikationen

R. Schier¹ · V. Schick¹ · H. Marcus¹ · B. Riedel²

1 Klinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin, Uniklinik Köln

2 Department of Anaesthesia & Pain Medicine, Peter MacCallum Cancer Centre, Melbourne (Australien)

Korrespondenz: robert.schier@uk-koeln.de

Fragestellung

Der prognostische Wert einer präoperativen diagnostischen Spiroergometrie wird in der Literatur kontrovers diskutiert [1-2]. Jedoch ist eine Zellantwort proangiogener Zellen (proangiogenic hematopoietic cells = PHC) als direkte Antwort auf einen spiroergometrischen Belastungsreiz kaum erforscht. Dabei ist eine verminderte Mobilisation von PHC mit einem reduzierten Überleben bei Sepsis [3] assoziiert. In dieser prospektiven Beobachtungsstudie wurde die Zellantwort von PHC auf einen präoperativen, spiroergometrischen Belastungsreiz im Zusammenhang mit der Inzidenz postoperativer Komplikationen untersucht.

Methodik

Nach Zustimmung der Ethikkommission (IRB#2003-0434) und schriftlichem Einverständnis wurde bei 53 thoraxchirurgischen Patienten die Expression von PHC auf einen physiologischen Belastungsreiz (Spiroergometrie) untersucht. Die Bestimmung der PHC im Blut erfolgte per Durchfluszytometrie mit den Oberflächenmarkern CD45, CD133, CD31, CD34 und VEGFR2 präoperativ vor und 10 Minuten nach einem maximalen spiroergometrischen Belastungsreiz über der anaeroben Schwelle. Eine Veränderung der Zellzahl vor und nach Spiroergometrie wurde mit der Inzidenz prädefinierter, postoperativer Komplikationen (Tab. 1) verglichen. Die Datenanalyse erfolgte per ROC-Kurven-Analyse mit der Angabe von Odds Ratio (OR) und 95%-Konfidenzintervall (95% CI); als Signifikanzgrenze wurde p<0,05 gewählt.

Tabelle 1

Anstieg der PHC vor und nach Spiroergometrie (Zellen / μ L)	Postoperative Komplikationen*				OR	95% CI	p-Wert**			
	Nein		Ja							
	n	%	n	%						
Kardiale Komplikationen*										
Anstieg PHC<60	25	71%	10	29%						
Anstieg PHC≥60	17	94%	1	6%	0,15	(0,02, 1,26)	0,03			
Pulmonale Komplikationen*										
Anstieg PHC<60	27	77%	8	23%						
Anstieg PHC≥60	15	83%	3	17%	0,68	(0,16, 2,93)	0,59			
Chirurgische Komplikationen*										
Anstieg PHC<60	26	74%	9	26%						
Anstieg PHC≥60	17	94%	1	6%	0,17	(0,02, 1,47)	0,05			
Postoperative Komplikationen (gesamt)*										
Anstieg PHC<60	16	46%	19	54%						
Anstieg PHC≥60	15	83%	3	17%	0,17	(0,04, 0,69)	0,006			

* Kardiale Komplikationen: u.a. Myokardischämie, -infarkt, postoperativer Vasopressorbedarf

* Pulmonale Komplikationen: u.a. verzögerte Extubation, Reintubation, ARDS, ALI, Pneumonie

* Chirurgische Komplikationen: u.a. Re-Eingriff, Anastomoseninsuffizienz, Wundinfektion, Sepsis; eine ausführliche Liste der prädefinierten Komplikationen ist im Studienprotokoll abgebildet.

** Signifikanzgrenze p<0,05.

Ergebnisse

Eine präoperative, spiroergometrische Belastung oberhalb der anaeroben Schwelle führte zu einem signifikanten Anstieg der PHC. Eine ROC-Kurven-Analyse zeigte, dass ein Anstieg der PHC von ≥ 60 Zellen/ μ L nach Spiroergometrie einen Schwellenpunkt für postoperative Komplikationen darstellt (Fläche unter der Kurve = 0,71; Sensitivität = 86%; Spezifität = 48%).

Interpretation

Eine präoperative spiroergometrische Belastung oberhalb der anaeroben Schwelle induziert den Anstieg von PHC. Eine verminderte Zellzahl an PHC nach spiroergometrischer Belastung geht mit einer erhöhten Inzidenz postoperativer Komplikationen einher. Inwiefern dieses Zellsignal als Biomarker sowie für präoperative Strategien zur Verbesserung der vaskulären Funktion (z.B. durch ein präope-

ratives Training) genutzt werden kann, wird in weiteren Studien untersucht.

Förderung: Die Studie wurde durch Drittmittel des „International Anesthesia Research Society (IARS) Clinical Scholar Grant“ von Herrn Professor Bernhard Riedel finanziert.

Literatur

- Forshaw MJ, Strauss DC, Davies AR, et al: Is cardiopulmonary exercise testing a useful test before esophagectomy? Ann Thorac Surg 2008;85:294-299
- Smith TB, Stonell C, Purkayastha S, et al: Cardiopulmonary exercise testing as a risk assessment method in non cardio-pulmonary surgery: a systematic review. Anaesthesia 2009;64:883-893
- Rafat N, Hanusch C, Brinkkoetter PT, et al: Increased circulating endothelial progenitor cells in septic patients: correlation with survival. Crit Care Med 2007;35:1677-1684.

Thiopental hemmt in vitro die globale Proteinbiosynthese durch Inhibition des eukaryotischen Elongationsfaktors eEF2 und schützt vor Hypoxie-induziertem neuronalem Zelltod

C.I. Schwer · T. Loop · M. Humar

Klinik für Anästhesiologie, Sektion Experimentelle Anästhesiologie, Universitätsklinikum Freiburg

Korrespondenz:

christian.schwer@uniklinik-freiburg.de

Fragestellung

Thiopental wird aufgrund seiner hirndrucksenkenden und neuroprotektiven Eigenschaften in der Intensivtherapie zur Behandlung therapierefraktärer Hirndruckanstiege bei schwerem Schädel-Hirn-Trauma eingesetzt. Die molekularen Mechanismen, die den perfusionsunabhängigen neuroprotektiven Effekten zugrunde liegen, sind nur unzureichend charakterisiert. Die globale Proteinbiosynthese geht mit einem hohen Verbrauch an intrazellulärem Adenosintriphosphat (ATP) einher [1]. Daher stellt die Hemmung der Translation von mRNA einen möglichen Mechanismus zum Schutz vor hypoxischer Zellschädigung dar [2]. Im Rahmen dieser Studie sollten die Effekte von Thiopental auf die neuronale Proteinbiosynthese untersucht werden.

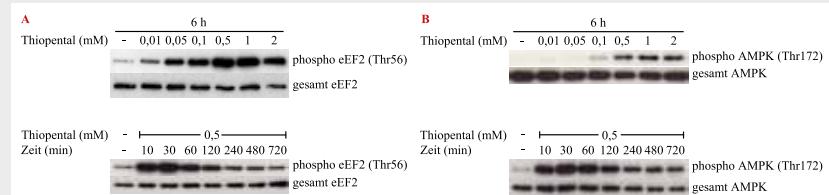
Methodik

Humane Neuroblastomzellen (SK-N-SH, ATCC, Nr. HTB-11) wurden unter Normoxie (5% CO₂, 21% O₂, 74% N₂) und Hypoxiebedingungen (5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂) mit Thiopental (0,01-2 mM) oder dem Translationshemmer Cycloheximid (CHX; 5 µg/ml) bei 37 °C in einem Begasungsbrutschrank inkubiert. Für die Hypoxieversuche wurde das Zellkulturmödium 15 h vor Versuchsbeginn mit dem hypoxischen Gasgemisch präequilibriert. Die Expression des eukaryotischen Elongationsfaktors 2 (eEF2) und der AMP-aktivierten Proteinkinase (AMPK) wurde im Western Blot analysiert. Der Einfluss von Thiopental auf die globale Proteinbiosynthese wurde durch Bestimmung des Einbaus von radioaktiv markiertem Methionin (³⁵S) in neu gebildetes Protein untersucht. Die Zellschädigung unter Hypoxiebedingungen wurde mittels Laktat-Dehydrogenase-Assay analysiert. Die Ergebnisse wurden statistisch durch eine Varianzanalyse (One-Way-ANOVA mit Post-hoc-Dunnet-Test bzw. Two-Way-ANOVA mit Post-hoc-Bonferroni-Test) verglichen.

Ergebnisse

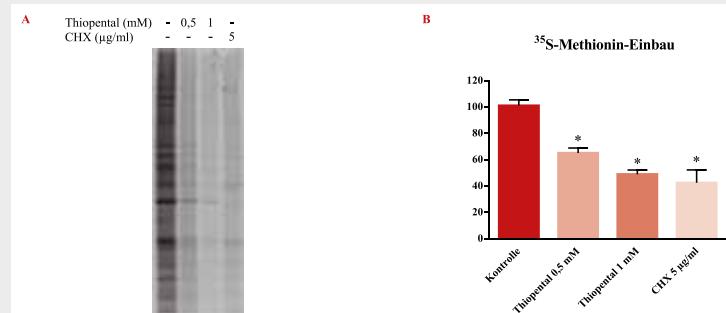
Thiopental induziert zeit- und dosisabhängig die Phosphorylierung der translationalen Regulatoren eEF2 (Abb. 1A) und AMPK (Abb. 1B). Der Effekt auf eEF2 ist bereits ab

Abbildung 1



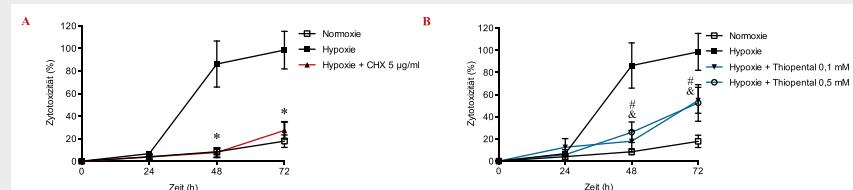
Repräsentative Western-Blot-Analysen der dosis- und zeitabhängigen eEF2 (A) und AMPK (B) Phosphorylierung.

Abbildung 2



Einfluss von CHX und Thiopental auf die globale Proteinbiosynthese. Repräsentative Autoradiographie (A) und Quantifizierung durch Densitometrie (B). Mittelwert ± Standardabweichung (n=4); * = p < 0,05 vs. Kontrolle.

Abbildung 3



Einfluss von CHX (A) und Thiopental (B) auf die hypoxische Zellschädigung.

Mittelwert ± Standardabweichung (n=3); * = p < 0,05 Hypoxie + CHX, # = p < 0,05 Hypoxie vs. Hypoxie + Thiopental 0,1 mM, & = p < 0,05 Hypoxie vs. Hypoxie + Thiopental 0,5 mM.

10 µM und somit in einer klinisch relevanten Konzentration nachweisbar. Verglichen mit unbehandelten Zellen (101±4,4%) führt die Inkubation mit CHX (42,6±9,8%) und Thiopental in höheren Konzentrationen (0,5 mM: 65,2±3,8%; 1 mM: 49,1±3,2%) zu einer signifikanten Reduktion der globalen Proteinbiosynthese (Abb. 2). Unter Hypoxiebedingungen resultiert die Inkubation mit CHX (Abb. 3A) und Thiopental (0,1 und 0,5 mM; Abb. 3B) in einer Abnahme des Zellschadens.

Interpretation

In der neuronalen Zelllinie SK-N-SH wirkt Thiopental durch Hemmung der globalen Proteinbiosynthese zytoprotektiv. Dieser Me-

chanismus könnte für die bekannten neuroprotektiven Eigenschaften dieser Substanz mitverantwortlich sein.

Literatur

- Hand SC, Hardewig I: Downregulation of cellular metabolism during environmental stress: mechanisms and implications. *Annu Rev Physiol* 1996;58:539-563
- Dessi F, Charriaut-Marlangue C, Ben Ari Y: Anisomycin and cycloheximide protect cerebellar neurons in culture from anoxia. *Brain Res* 1992;581:323-326.

Eine posttraumatische Propofolgabe vergrößert den sekundären Hirnschaden nach experimentellem Schädel-Hirn-Trauma im Mausmodell

A. Sebastiani · M.K. Schäfer · A. Ditter · E.-V. Schaible · C. Luh · C. Werner · K. Engelhard · S.C. Thal

Klinik für Anästhesiologie, Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Korrespondenz:

Anne.Sebastiani@unimedizin-mainz.de

Fragestellung

Das Hypnotikum Propofol wird für die Sedierung von Patienten nach Schädel-Hirn-Trauma (SHT) verwendet, da diesem Medikament neben günstigen pharmakokinetischen Eigenschaften auch ein zerebroprotektiver Effekt zugesprochen wird [1]. Jedoch konnte tierexperimentell ein durch Hypnotika (z.B. Propofol) hervorgerufener neurotoxischer Effekt im Hirngewebe gesunder neonataler/juveniler Tiere nachgewiesen werden, welcher mit der Beeinflussung von Neurotrophinen und deren Wirkung an p75 Neurotrophin-Rezeptoren (p75NTR) assoziiert ist [2]. p75NTR wird in Neuronen sich entwickelnder Gehirne exprimiert, während adultes Hirngewebe nur eine geringe p75NTR-Expression zeigt. Durch zerebrale Läsionen kann die p75NTR-Expression auch im adulten Gehirn wieder ansteigen [3]. In der vorliegenden Studie wurde die Kinetik der Neurotrophin-, sowie p75NTR-Regulation in verletztem Hirnparenchym und der Einfluss einer verzögerten posttraumatischen Propofolgabe zum Zeitpunkt der maximalen p75NTR-Expression untersucht.

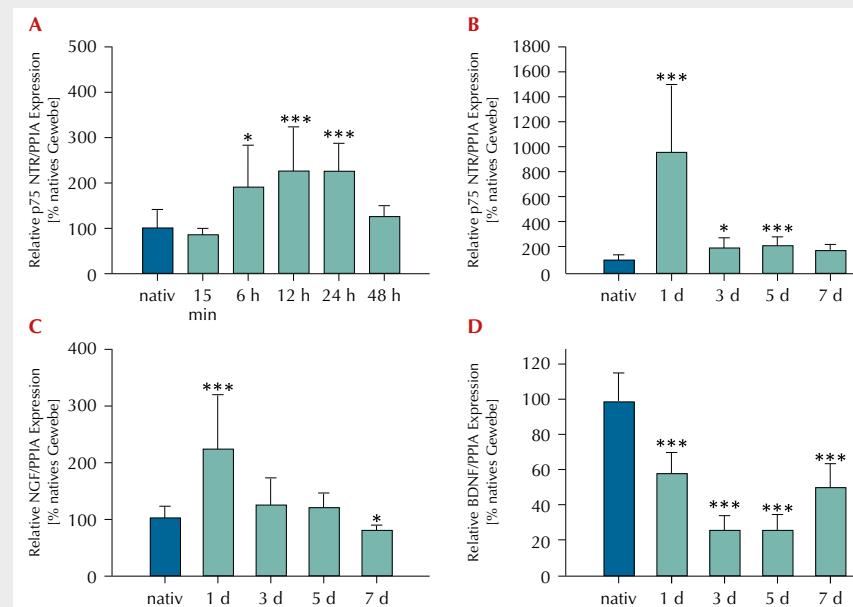
Methodik

Mit Genehmigung der Tierschutzbehörde wurde an adulten, Isofluran-anästhesierten C57BL/6-Mäusen eine fokale Kontusion über dem rechten Kortex [controlled cortical impact (CCI)] erzeugt. Die mRNA-Expression von p75NTR, Nerve Growth Factor (NGF) und Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) wurde mit real-time PCR im geschädigten Gehirngewebe zu den Zeitpunkten 15 Minuten, 6, 12, 24, 48 h und in einem zweiten Versuch 1, 3, 5 und 7 Tagen nach CCI ermittelt ($n=9-10/\text{Gruppe}$). Die relative p75NTR-Proteinkonzentration wurde mittels Western Blot 24 h nach CCI verifiziert ($n=6$). Der Einfluss einer bei Mäusen leicht sedierend wirkenden Propofolgabe (10mg/kg KG i.v.; 24 h nach CCI) auf den sekundären Hirnschaden nach 72 h wurde anhand Nissl-gefärbter Kryotomoschnitte analysiert ($n=12/\text{Gruppe}$). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Test oder paired t-Test und ggf. Bonferroni-Holm-Korrektur. Signifikanzniveau: $P<0,05$ (* $P<0,05$; ** $P<0,001$).

Ergebnisse

Die p75NTR-mRNA-Expression war nach CCI signifikant erhöht und erreichte ein Maximum

Abbildung 1



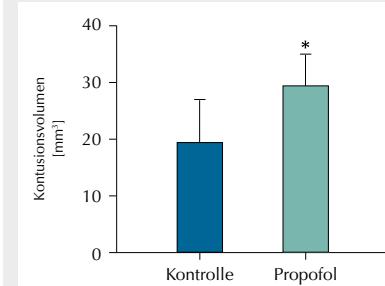
A) Relative p75 NTR mRNA-Expression in perikontusionalem Hirngewebe. **B)** Relative p75NTR-mRNA-Expression in perikontusionalem kortikalem Gewebe. **C)** Relative NGF- und **D)** BDNF-mRNA-Expression in perikontusionalem kortikalem Gewebe. Relative Darstellung im Vergleich zu gesundem Kontrollgewebe. PPIA: CyclophilinA; Mittelwerte \pm Standardabweichung; $n=9-10$ Mäuse/Gruppe; * $P<0,05$, ** $P<0,001$.

12-24 h nach Insult ($P<0,001$ vs nativ; Abb. 1A und 1B). Analog zeigte sich ein 2,4-facher Anstieg des p75NTR-Signals in der geschädigten im Vergleich zur kontralateralen Hemisphäre ($P<0,05$). Nach CCI zeigte sich eine Dysregulation der Neurotrophin-Expression mit Anstieg (+100%) von NGF 24 h nach Trauma (Abb. 1C) und Reduktion der BDNF- Expression (-70%) 3 und 5 Tage nach Insult (Abb. 1D). Die Propofol-Applikation zum Zeitpunkt 24 h nach Insult führte zu einer Vergrößerung (+29%) des Sekundärschadens im Vergleich zur Kontrollgruppe ($\text{NaCl } 0,9\%$; $P<0,05$; Abb. 2).

Interpretation

Eine mechanische Verletzung des Gehirns bewirkt eine Induktion der p75NTR-Expression, welche als Aktivierung von reparativen Mechanismen aus der frühen Hirnentwicklung interpretiert werden könnte. Analog zur p75NTR-vermittelten, toxischen Wirkung von Anästhetika im juvenilen Gehirn könnte die Hochregulation des p75NTR die Sensitivität des posttraumatischen Gehirngewebes gegenüber Anästhetika somit wieder erhöhen. Entsprechend vergrößerte die Gabe von Propofol 24 h nach Trauma das Kontusionsvolumen. Die bisher tierexperimentell gezeigte neuroprotektive Wirkung einer frühzeitigen Propofolgabe [1] scheint sich nach einem später applizierten Propofolbolus in den gegenteiligen Effekt umzuwandeln – Propofol könnte sich somit, abhängig vom Applikationszeitpunkt, auch negativ auf die Entwicklung des neuronalen Schadens nach SHT auswirken.

Abbildung 2



Histopathologischer Schaden 72 h nach CCI. Propofol versus Kontroll-Gruppe ($\text{NaCl } 0,9\%$); Mittelwerte \pm Standardabweichung, $n=12$ Mäuse/Gruppe; * $P<0,05$.

Literatur

- Rossaint J, Rossaint R, Weis J, Fries M, Rex S, Coburn M: Propofol: neuroprotection in an in vitro model of traumatic brain injury. Crit Care 2009;13(2):R61
- Pearn ML, Hu Y, Niesman IR, Patel HH, Drummond JC, Roth DM, et al: Propofol neurotoxicity is mediated by p75 neurotrophin receptor activation. Anesthesiology 2012;116(2):352-61
- Shulga A, Magalhaes AC, Autio H, Plantman S, di Lieto A, Nykjaer A, et al: The loop diuretic bumetanide blocks posttraumatic p75NTR upregulation and rescues injured neurons. J Neurosci 2012;32(5):1757-70.

Effekte von variablen Tidalvolumina auf Gasaustausch, Lungenmechanik und Inflammation bei lungengesunden sowie akut und chronisch lungenbeschädigten Ratten

P. M. Spieth · T. Bluth · H. Krause ·
M. Lippmann · N. Oppermann · R. Huhle ·
I. Rentzsch · T. Koch · M. Gama de Abreu

Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und
Intensivtherapie, Universitätsklinikum Dresden

Korrespondenz:
peter.spieth@uniklinikum-dresden.de

Fragestellung

Mechanische Beatmung mit variablen Tidalvolumina kann die pulmonale Funktion und Protektion gegenüber konventionellen Beatmungsformen verbessern [1]. Die Effekte variabler Beatmung bei chronischer Lungenschädigung sind dabei noch unbekannt. In dieser Studie verglichen wir konventionelle und variable volumenkontrollierte Beatmung bei nicht lungengeschädigten sowie durch Salzsäure-aspiration akut und chronisch lungengeschädigten Ratten. Wir prüften die Hypothese, dass die Anwendung variabler Tidalvolumina zu einer Verbesserung von Gasaustausch, Lungenmechanik und pulmonaler Inflammation führt.

Methodik

Für die Versuche wurden nach behördlicher Genehmigung insgesamt 48 männliche Sprague-Dawley-Ratten ($n=6$ /Gruppe; 250-350g) verwendet. Die intraperitoneale Induktion und kontinuierliche intravenöse Aufrechterhaltung der Narkose erfolgte mit Ketamin/Midazolam, Muskelrelaxation mit Atracurium. Beatmung und lungenmechanische Messungen wurden an einem eigens entwickelten Messplatz durchgeführt [2]. Die Induktion der Lungenschädigung erfolgte durch intratracheale Instillation von 0,2N Salzsäure (1,2 ml/kg akute Schädigung, 0,5 ml/kg chronische Schädigung). Die lungengesunden und akut geschädigten Tiere wurden unmittelbar, die chronisch geschädigten Tiere 14 Tage nach Aspiration randomisiert für 4h mit konventioneller oder variabler volumenkontrollierter Beatmung behandelt. Die Beatmungseinstellungen waren: F_1O_2 0,35; PEEP 5 cmH₂O; Atemfrequenz 80/min; Tidalvolumen 6 ml/kg; unter variabler Beatmung mittleres Tidalvolumen 6 ml/kg. Variationskoeffizient des Tidalvolumens 30% [1]. Sechs nichtbeatmete gesunde Tiere dienten als gesunde Kontrolle, sechs chronisch geschädigte, aber nicht beatmete Tiere als chronische Kontrolle. Die statistische Analyse zwischen variabler und konventioneller Beatmung erfolgte für lungengesunde, akut und chronisch lungengeschädigte Tiere getrennt, mittels Two-way-ANOVA für Mess-

Tabelle 1

Oxygenierung, Atemwegsspitzendruck und Elastance des respiratorischen Systems.

		Start	1h	2h	3h	4h
PaO₂/F₁O₂ [mmHg] lungengesund	Konventionell	451±54	431±34	425±43	401±40	397±42
	Variabel	468±12	454±53	442±28	439±48	456±40
akut	Konventionell	458±23	253±26	260±29	247±21	242±23
	Variabel	456±24	363±41*	373±42*	374±30*	381±48*
chronisch	Konventionell	391±51	399±38	356±41	346±41	340±37
	Variabel	406±51	424±42	438±25*	442±28*	449±22*
Ppeak [cmH₂O] lungengesund	Konventionell	11,2±1,4	12,9±1,8	14,0±1,8	14,8±2,0	16,1±2,1
	Variabel	10,5±0,3	12,1±0,4	12,4±0,4	12,4±0,4*	12,3±0,3*
akut	Konventionell	10,6±0,8	18,9±1,5	18,9±1,7	19,3±1,6	19,6±1,5
	Variabel	10,4±0,5	14,0±0,5*	14,0±0,6*	13,9±0,6*	14,0±0,6*
chronisch	Konventionell	12,1±1,6	15,3±2,9	16,2±2,7	17,4±2,4	17,7±2,2
	Variabel	12,5±1,2	13,7±0,2	13,5±0,6	13,2±0,9*	13,0±0,6*
Elastance [cmH₂O/L] lungengesund	Konventionell	2,5±0,5	3,2±0,5	3,6±0,6	3,9±0,6	4,3±0,5
	Variabel	2,3±0,2	2,8±0,3	2,9±0,4	2,9±0,3*	2,9±0,3*
akut	Konventionell	2,3±0,2	5,5±0,5	5,3±0,3	5,5±0,3	5,4±0,5
	Variabel	2,4±0,4	3,6±0,6*	3,6±0,6*	3,5±0,6*	3,6±0,5*
chronisch	Konventionell	3,6±1,4	4,9±1,8	5,5±1,7	5,7±2,1	6,0±1,7
	Variabel	3,3±0,6	3,5±0,4	3,5±0,4	3,5±0,4*	3,4±0,4*

* = p<0,05 vs. konventionelle Beatmung, alle Werte sind als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben.

wiederholungen und Bonferroni-Korrektur bei funktionellen Variablen und t-Tests für Post-mortem-Analysen. Statistische Signifikanz wurde bei p<0,05 angenommen.

Ergebnisse

Die wichtigsten funktionellen Variablen sind in Tabelle 1, die wichtigsten Post-mortem-Ergebnisse in Tabelle 2 dargestellt. Körpergewicht und -temperatur, infundierte Flüssigkeitsmenge, Herzfrequenz, mittlerer arterieller Blutdruck, Minutenventilation und PaCO₂ unterschieden sich nicht signifikant zwischen den Gruppen. Der transpulmonale Druck war unter variabler Beatmung bei lungengesunden sowie akut und chronisch geschädigten Tieren signifikant reduziert.

Das pulmonale Wet/Dry-Verhältnis sowie die Proteinkonzentration in der bronchoalveolären Lavage unterschieden sich nicht signifikant. Die Bestimmung der Myeloperoxidaseaktivität als Aktivitätsmarker neutrophiler Granulozyten sowie die Quantifizierung von Hydroxyprolin als Fibrosemarker lieferten keine signifikanten Unterschiede. Die Leukozytenzahl war unter

variabler Beatmung im Vergleich zu konventioneller Beatmung bei nicht lungengeschädigten, nicht aber bei akut und chronisch lungenbeschädigten Tieren signifikant reduziert.

Interpretation

Im Vergleich zu konventioneller Beatmung verbesserte variable Beatmung die arterielle Oxygenierung bei akut und chronisch lungenbeschädigten sowie die Lungenmechanik bei nicht lungengeschädigten, akut und chronisch lungenbeschädigten Ratten signifikant. Variable Beatmung resultierte in verminderter mRNA-Expression pro-inflammatorischer Zytokine und könnte damit zu einer Reduktion der beatmungsassoziierten Lungenschädigung führen.

Literatur

1. Spieth PM, et al: Am J Respir Crit Care Med 2009;179(8):684-93
2. Huhle R, Spieth PM, et al: Biomed Tech (Berl) 2012;57 Suppl 1.

Tabelle 2

mRNA-Expression (real-time quantitative PCR, $2^{-\Delta\Delta CT}$) im Lungengewebe.

		TGF-β	IL-6	MCP-1
lungengesund	Konventionell	0,74±0,08	2,80±2,25	0,93±0,43
	Variabel	0,73±0,15	1,43±1,10	1,05±0,82
akut	Konventionell	1,29±0,29	147,40±57,24	10,01±6,56
	Variabel	0,74±0,29*	142,9±107,2	12,49±13,43
chronisch	Konventionell	0,73±0,11	1,54±0,70	2,01±1,07
	Variabel	0,63±0,04	0,56±0,26*	0,64±0,29*

* = p<0,05 vs. konventionelle Beatmung, alle Werte sind als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben.

Ist eine selektive Inhibition einzelner Natriumkanäle ein molekulares Korrelat für die geringe Kardiotoxizität und die präferentiell sensorische Blockade durch Ropivacain?

C. Stoetzer · T. Doll · S. Reuter · N. Foadi ·

J. de la Roche · J. Ahrens · A. Leffler

Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin,
Medizinische Hochschule Hannover

Korrespondenz: stoetzer.carsten@mh-hannover.de

Fragestellung

Ropivacain ist ein Lokalanästhetikum vom Amid-Typ, abgeleitet von Bupivacain. Verglichen mit Bupivacain weist es eine vergleichbare lokalanästhetische Potenz [1] und eine ähnlich lange Anschlagzeit sowie eine vergleichbare Wirkdauer auf [2]. Allerdings zeigt Ropivacain ein deutlich günstigeres kardiovaskuläres Risikoprofil als Bupivacain, zudem wird Ropivacain eine präferentielle Inhibition sensorischer Nervenfasern zugeschrieben. Als mögliche Ursache für dieses günstige pharmakologische Wirkungsprofil wird eine relativ geringe Lipophilie von Ropivacain verglichen mit Bupivacain diskutiert. Ebenso die Tatsache, dass die handelsüblichen Präparate von Ropivacain nur das S-Enantiomer enthalten, und Bupivacain als Racemat verwendet wird [3]. In dieser Studie sollte evaluiert werden, ob durch eine schwache Inhibition des kardialen Natriumkanals Nav1.5 oder eine selektive oder präferentielle Inhibition neuronaler Natriumkanäle ein molekulares Korrelat zum Wirkprofil von Ropivacain gefunden werden kann.

Methodik

Effekte von Ropivacain wurden an den α -Untereinheiten der Natriumkanäle Nav1.2, Nav1.3, Nav1.4, Nav1.5 und Nav1.7 (stabile Expression in HEK-293 Zellen) sowie Nav1.6 und Nav1.8 (transiente Expression in Neuroblastoma-ND7/23-Zellen), mittels der whole-cell Patch-Clamp-Technik untersucht. Statistische Vergleiche wurden mittels des ungepaarten Student's t-Test oder mittels ANOVA errechnet.

Ergebnis

Ropivacain ($n=9$) [R] und Bupivacain ($n=9$) [B] induzieren eine ähnliche konzentrationsabhängige und reversible Blockade von Nav1.5. Die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) für die tonische Blockade an ruhenden Na-

Abbildung 1 und 2

Abb. 1

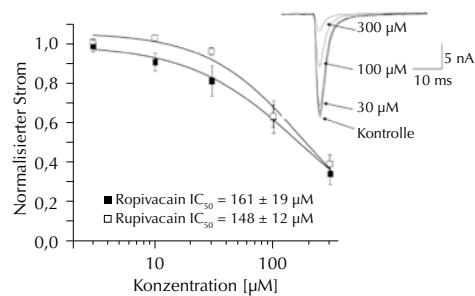


Abb. 2

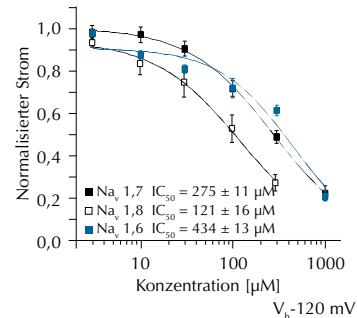


Abb. 1: Dosis-Wirkungskurve für die tonische Blockade des kardialen Natriumkanals Nav 1.5 durch Ropivacain und Bupivacain. Die Substanzen wurden in Konzentrationen zwischen 1 und 300 μ M appliziert. Die partielle Blockade der einzelnen Konzentrationen wurde durch eine Normalisierung mit dem Kontrollwert errechnet und der IC_{50} -Wert wurde mittels der Hill-Gleichung ermittelt. Zusätzlich dargestellt sind repräsentative Stromkurven für Ropivacain.

Abb. 2: Dosis-Wirkungskurve für die tonische neuronale Natriumkanäle durch Ropivacain. Ropivacain wurde in Konzentrationen zwischen 1 und 300 μ 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.

triumkanälen war für [R]: $161 \pm 19 \mu$ M, und für [B]: $148 \pm 12 \mu$ M (Abb. 1). Die Interaktion beider Lokalanästhetika mit Nav1.5 ist stark konformationsabhängig: Beide Substanzen induzieren eine prominente hyperpolarisierende Verschiebung der spannungsabhängigen schnellen Inaktivierung: [R]: ($V_{1/2}$ -Kontrolle: 84 ± 1 mV; [R]: $V_{1/2}$ 100 μ M: 106 ± 4 mV, [B]: $V_{1/2}$ 100 μ M: 106 ± 7 mV, n=9) [3]. 100 μ M beider Substanzen induzieren eine frequenzabhängige Blockade bei 10 Hz [R] ($76 \pm 4\%$; n=9); [B] $72 \pm 8\%$; n=14) ($p > 0.05$, Student's t-Test). Ropivacain induziert eine potente und zum Teil differentielle Blockade neuronaler Natriumkanäle (IC_{50} Nav1.2 $277 \pm 21 \mu$ M, n=10; Nav1.3 $450 \pm 18 \mu$ M, n=10; Nav1.4 $252 \pm 10 \mu$ M, n=10, Nav1.6 $434 \pm 13 \mu$ M, n=10, Nav1.7 $275 \pm 11 \mu$ M, n=10 und Nav1.8 $121 \pm 16 \mu$ M n=8) (Abb. 2). Weiterhin induziert Ropivacain (100 μ M) eine starke frequenzabhängige Blockade. Auch hier zeigte Ropivacain eine potentere Blockade an den Untereinheiten Nav1.7 und Nav1.8 als an Nav1.6 ($p < 0.05$, ANOVA).

Interpretation

In dieser Studie konnten wir zeigen, dass Ropivacain ein potenter Inhibitor aller untersuchten Natriumkanäle ist. Diese Blockade ist konformationsabhängig eine typische Eigenschaft von Lokalanästhetika. Die schnellere Erholung

von der Inaktivierung an Nav1.5 könnte eine Erklärung für die geringere Kardiotoxizität von Ropivacain sein. Durch die differentielle Blockade der α -Untereinheiten Nav1.8 (spezifisch für C-Fasern) und Nav1.6 (spezifisch für A-Fasern) lässt sich zumindest teilweise die differentielle Blockade von Ropivacain erklären.

Literatur

- Whiteside JB, Wildsmith JA: Developments in local anaesthetic drugs. Br J Anaesth 2001;87:27-35.
- Leone S, Di Cianni S, Casati A, Fanelli G: Pharmacology, toxicology, and clinical use of new long acting local anaesthetics, ropivacaine and levobupivacaine. Acta Biomed 2008; 79(2):92-105.
- Knudsen K, Beckman Suurküla M, Blomberg S, Sjövall J, Edvardsson N: Central nervous and cardiovascular effects of iv infusions of ropivacaine, bupivacaine and placebo in volunteers. Br J Anaesth 1997;78:507-14.

Eine über Blockade der thrombozytären P₂Y₁₂-Rezeptoren vermittelte Verringerung der posttraumatischen Hyperkoagulation reduziert den sekundären Hirnschaden nach Schädel-Hirn-Trauma

S. C. Thal¹ · D. Yang^{1,3} · A. Sebastiani¹ · C. Reiß² · K. Jurk² · M. Schäfer¹ · C. Werner¹ · K. Engelhard¹

1 Klinik für Anästhesiologie,

2 Centrum für Thrombose und Hämostase,
Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-
Universität Mainz

3 Department of Anesthesiology, Huazhong
University of Science and Technology,
Wuhan (China)

Korrespondenz: thal@uni-mainz.de

Fragestellung

Nach mechanischer Hirnschädigung führen multiple pathophysiologische Mechanismen innerhalb der ersten Stunden zum Untergang von gesundem Hirngewebe in der Grenzzone. Neben neuroinflammatorischen Vorgängen könnten ischämische Prozesse den Schaden nach Schädel-Hirn-Trauma (SHT) verstärken. Dehn- und Zug-Belastungen des Aufpralls können durch Gefäßverletzungen eine Aktivierung des Gerinnungssystems induzieren, welche bereits zwei Stunden nach Insult mittels Intravital-Mikroskopie in Form einer erhöhten Thrombogeneserate darstellbar ist [1]. Obwohl verschiedene Arbeiten eine überschießende Aktivierung der Gerinnung in der Frühphase nach SHT postulieren [1,2], wird der Fokus aufgrund der schwerwiegenden Folgen einer Blutung auf die verzögert auftretende (Verbrauchs-) Koagulopathie gelegt. Die vorliegende Studie untersucht deshalb die Dynamik der zerebralen Expression vaskulärer Adhäsiomsmoleküle, die posttraumatischen Veränderungen der Thrombozytenaktivität und den Einfluss der reversible P₂Y₁₂-Rezeptor-vermittelten Blockade der Thrombozytenaggregation auf den sekundären Hirnschaden im murinen SHT-Modell.

Methodik

Nach Genehmigung durch das Landesuntersuchungsamt Koblenz wurden Isofluran-anästhesierte, männliche Mäuse randomisiert ei-

ner pneumatischen, kontrollierten kortikalen Kontusion (controlled cortical impact [CCI]) unterzogen. Die von-Willebrand-Faktor (vWF), Thromboplastin (TF) und Prothrombin mRNA-Expression wurde mittels real-time Polymerase-Kettenreaktion im Hirngewebe von C57Bl/6N-Mäusen quantifiziert (nativ, 15 Minuten, 3, 6, 12, 24 Stunden nach CCI; je n=6). Der Einfluss eines CCI auf die Thrombozytenaktivität wurde nach retroorbitaler Blutentnahme mittels Multiplate (ADPtest, ASPtest, COLtest) in Sham-Tieren und 1, 3, 6, 24 Stunden nach CCI untersucht (je n=10). Die Ergebnisse wurden in einer weiteren Studie mit FACS-Analyse (p-Selektin, GPIIbIIIa) vor und nach ADP-Stimulation zu den Zeitpunkten 3, 6, 12 Stunden nach CCI bzw. Sham OP (je n=5) verifiziert. Der Einfluss der Thrombozytenaggregation auf den sekundären Hirnschaden (TTC-Färbung) wurden 24 Stunden nach CCI nach pharmakologischer P₂Y₁₂-Hemmung mit Ticagrelor (Vehikel, 0,1/1/10 mg/kg KG oral, 30 min und 6 Stunden nach CCI, je n=10) untersucht. Anschließend erfolgte die Untersuchung der Langzeitwirkung (5 Tage Überleben, Nissl-Färbung) einer Ticagrelor-Gabe (1 mg/kg, Applikation oral: Tag 1 versus Tag 1 bis 4 versus Vehikel, je n=10). Die Primärläsion (je n=7) wurde 15 min nach CCI evaluiert. In P₂Y₁₂-inhibierten Tieren sowie in deren Vergleichsgruppen wurde die zerebrale Inflammation (qPCR: TNF- α , IL1- β) gemessen und die Gerinnungsbildung (CD31/CD41 Färbung, FibrinII) und die Mikrogliaaktivität (Iba1) mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie dargestellt. Blockade von P₂Y₁₂ verstärkte die Vasodilatator-Stimuliertes Phosphoprotein (VASP) Phosphorylierung. Abschließend wurde deshalb die Wirkung von Ticagrelor in VASP-defizienten Tieren untersucht.

Statistik

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

Ergebnisse

Die vWF, TF und Prothrombin mRNA-Expression steigt 3 Stunden nach Trauma an und

erreicht für vWF und TF eine maximalen Erhöhung um 40% nach 6 Stunden (p<0,05). Dem gegenüber steigt die Expression von Prothrombin um 400% mit Maximum nach 12 Stunden an (p<0,05). Im Multiplate zeigte sich 3-6 Stunden nach Trauma eine signifikant erhöhte Aggregationsneigung des Vollblutes mit ADP (+28%), Collagen (+15%) oder Arachidonsäure (+15%). Im FACS war die Stimulierbarkeit der Thrombozyten reduziert. Da die Thrombozytenzahl nach CCI signifikant erhöht ist, deuteten die Daten auf eine relative Hyperkoagulation hin. Die Inhibition der Thrombozytenaggregation mit 1 mg/kg KG Ticagrelor bewirkt eine Schadenreduktion auf 15,5±3,9 mm³ vs. Vehikel: 19,7±2,8 mm³ (p<0,05). Der Effekt ist auch 5 Tagen nach CCI histologisch nachweisbar. Die Gabe von 0,1 und 10 mg/kg beeinflusst den Schaden nicht. In VASP-defizienten Tieren bewirkte die Gabe von Ticagrelor keine Schadensreduktion nach 24 Stunden. TNF- α - und IL1- β -Expression und Mikrogliaaktivität (Iba1) steigen nach Trauma an, weisen jedoch nur für IL1- β eine signifikante Reduktion in der 1 mg/kg Therapiegruppe auf. Die Mikrogliaaktivität wird durch Ticagrelor nicht verändert. Immunhistochemisch sind mehr Mikrothromben in den Vehikelgruppen gegenüber Ticagrelor therapierten zu visualisieren.

Interpretation

Die Ergebnisse zeigen erstmalig mit einer klinisch verbreiteten Analysetechnik eine verstärkte Aggregationsneigung des Vollblutes in der Frühphase nach SHT. Eine Begrenzung der Thrombozytenaggregation durch Blockade der P₂Y₁₂-Rezeptoren verringert VASP-abhängig den Hirnschaden. Die Daten unterstützen die Annahme, dass Mikrothromben eine perikontusionale Perfusionsstörung hervorrufen und einen entscheidenden Faktor für die Entstehung eines sekundären Hirnschadens darstellen.

Literatur

1. Schwarzmaier SM, et al: Temporal profile of thrombogenesis in the cerebral microcirculation after traumatic brain injury in mice. J Neurotrauma 2010;27:121-130
2. Stein SC, Smith DH: Coagulopathy in traumatic brain injury. Neurocrit Care 2004;1(4):479-88.

Die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II δ ist essentiell für die Kardioprotektion durch Desfluran-induzierte Präkonditionierung: Ergebnisse einer Knockout-Studie

T. Tischer-Zeitl¹ · J. Stumpner¹ · C. Lotz¹ · A. Frank¹ · M. Lange² · N. Roewer¹ · T. Smul¹

¹ Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie, Universitätsklinikum Würzburg

² Klinik für Anästhesie und Intensivmedizin, Mathias-Spital Rheine

Korrespondenz:

Tischer_T@klinik.uni-wuerzburg.de

Fragestellung

Die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) ist unter physiologischen Bedingungen für die Ca^{2+} -Homöostase und die Stressadaptation in Kardiomyozyten verantwortlich [1]. Die pharmakologische Blockade der CaMKII oder des vorgeschalteten beta1-adrenergen Rezeptors (ADRB1) verhindern die Kardioprotektion durch Anästhetika-induzierte Präkonditionierung (APC) [2]. Die Wirksamkeit der APC bei einem genetischen Knockout (KO) der CaMKII und die Wechselwirkungen mit möglichen Adaptationsmechanismen wurden bislang nicht untersucht und sind Gegenstand dieser Studie.

Methodik

Nach behördlicher Genehmigung wurden C57Bl/6-Mäuse entweder als Wildtyp (WT) oder mit heterozygotem (+/-) bzw. homozygotem (-/-) KO der im Myokard vorherrschenden δ -Isoform der CaMKII gezüchtet. Im Alter von acht bis 16 Wochen erhielten die Männchen unter Pentobarbital-Narkose ein Ischämie/Reperfusions-Protokoll mit 45-minütiger Koronararterien-Okklusion gefolgt von einer dreistündigen Reperfusion. Tiere der Kontrollgruppen (CON) erhielten keine weitere Intervention. APC wurde in den entsprechenden Gruppen durch die Applikation von Desfluran (1,0 MAC) über 15 Minuten mit anschließender 15-minütiger Auswaschphase induziert. Die Infarktgröße (IS) wurde gravitoplanimetrisch als Anteil des Risikoareals (AAR) mittels der Evans Blue/TTC-Methode bestimmt. Mittels Western-Immunoblotting wurden die Konzentrationen von ADRB1, Phospholamban (PLB) sowie die durch Proteinkinase A (Serin 16; pPLBSer16) und CaMKII δ (Threonin 17; pPLBThr17) spezifisch phosphorylierten Formen des PLB bestimmt. Die Daten wurden mittels ANOVA und Post-hoc-Duncan's-Test ausgewertet und als Mittelwert \pm SEM angegeben.

mie/Reperfusions-Protokoll mit 45-minütiger Koronararterien-Okklusion gefolgt von einer dreistündigen Reperfusion. Tiere der Kontrollgruppen (CON) erhielten keine weitere Intervention. APC wurde in den entsprechenden Gruppen durch die Applikation von Desfluran (1,0 MAC) über 15 Minuten mit anschließender 15-minütiger Auswaschphase induziert. Die Infarktgröße (IS) wurde gravitoplanimetrisch als Anteil des Risikoareals (AAR) mittels der Evans Blue/TTC-Methode bestimmt. Mittels Western-Immunoblotting wurden die Konzentrationen von ADRB1, Phospholamban (PLB) sowie die durch Proteinkinase A (Serin 16; pPLBSer16) und CaMKII δ (Threonin 17; pPLBThr17) spezifisch phosphorylierten Formen des PLB bestimmt. Die Daten wurden mittels ANOVA und Post-hoc-Duncan's-Test ausgewertet und als Mittelwert \pm SEM angegeben.

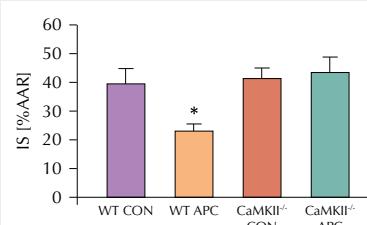
Ergebnisse

APC verminderte die IS in WT-Tieren ($23\pm2\%$, n=7; *p<0,05) im Vergleich zu WT CON ($39\pm5\%$, n=8; s. Abb. 1). Die IS der CaMKII $^{-/-}$ CON ($41\pm4\%$, n=8) und der WT CON unterschieden sich nicht. APC ($43\pm5\%$, n=9) reduzierte die IS in CaMKII $^{-/-}$ nicht. Bei CaMKII $^{-/-}$ Tieren waren die Konzentrationen von PLB und pPLBSer16 erhöht, die Konzentration von pPLBThr17 dagegen reduziert (Abb. 2a). Die ADRB1-Konzentration war bei hetero- wie homozygotem KO erhöht. Dieser ADRB1-Anstieg wurde in CaMKII $^{-/-}$ durch APC aufgehoben (Abb. 2b).

Interpretation

Der homozygote KO der CaMKII δ führte zu einer Aufhebung der kardioprotektiven Wirkung der APC. Die erhöhte Expression von ADRB1 unter hetero- und homozygotem KO

Abbildung 1



Aufhebung der APC-vermittelten IS-Reduktion in Tieren mit homozygotem KO der CaMKII δ .

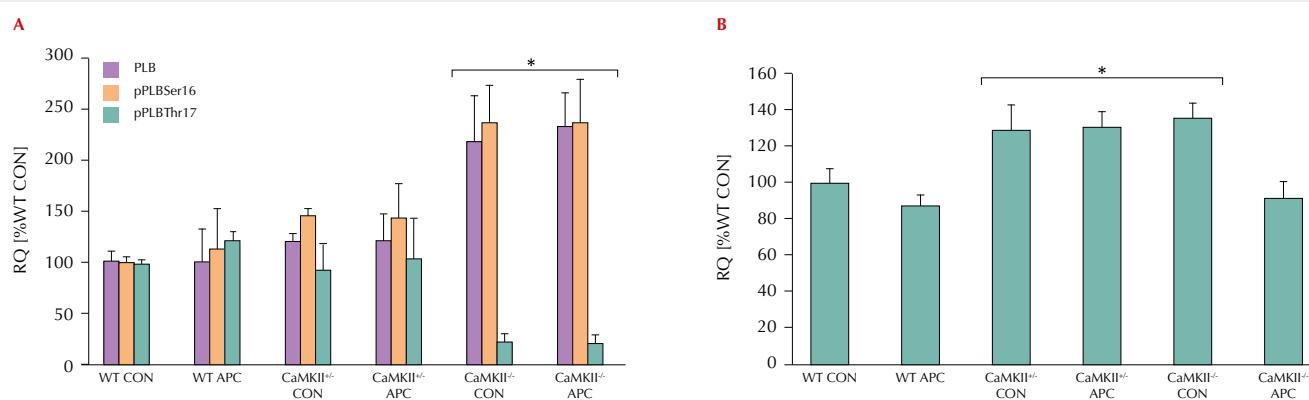
*p<0,05 vs. WT CON.

der CaMKII δ wurde durch Desfluran-Applikation aufgehoben. Die CaMKII δ spielt eine bedeutende Rolle bei der Vermittlung der Desfluran-induzierten Präkonditionierung. Sowohl die Bedeutung von KO-bedingten Kompensationsmechanismen der myokardialen Proteinexpression als auch deren explizite Wechselwirkungen mit der APC sind Gegenstand zukünftiger Untersuchungen.

Literatur

- Xu L, Lai D, Cheng J, et al.: Alterations of L-type calcium current and cardiac function in CaMKII $\{\delta\}$ knockout mice. Circ Res 2010;107:398-407
- Lange M, Smul TM, Redel A, et al.: Differential role of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in desflurane-induced preconditioning and cardioprotection by metoprolol: metoprolol blocks desflurane-induced preconditioning. Anesthesiology 2008;109:72-80.

Abbildung 2



A) Kompensatorische Zunahme der PLB-Konzentration bei gleichzeitiger Abnahme des pPLBThr17-Gehalts in Tieren mit homozygotem KO der CaMKII δ .

B) Aufhebung des kompensatorischen Anstiegs von ADRB1 nach Desfluran-Applikation in Tieren mit homozygotem KO der CaMKII δ .

N=4 je Gruppe; *p<0,05 vs. WT CON.

Adipositas-bedingte Leptinämie verbessert Entzündungsantwort, Immunabwehr und Sepsisverlauf bei der Maus

J. Tschöp¹ · D. Siegl¹ · N. Huber² · A. Martignoni¹ · P. Conzen¹ · T. Annecke¹

1 Klinik für Anaesthesiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München
2 Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie, Universitätsklinikum Ulm

Korrespondenz:
Johannes.Tschoep@med.uni-muenchen.de

Fragestellung

Adipositas nimmt in den Industriestaaten stetig zu und stellt einen wesentlichen gesundheitlichen Risikofaktor dar. Zusätzlich kommt es bei Adipositas zu einer dauerhaften Beeinflussung des Immunsystems mit noch ungeklärter Wirkung auf den Verlauf einer Sepsis. Das adipozytäre Hormon Leptin steuert nicht nur wichtige metabolische Funktionen, sondern hat auch regulierende Funktionen in der Immunantwort [1,2]. Ziel unserer Studie war es, in einem murinen Sepsismodell die Hypothese zu testen, dass die Adipositas-assoziierte Hyperleptinämie Sepsisverlauf und Letalität verbessert.

Methodik

Die Durchführung der Tierversuche war von der Regierung von Oberbayern genehmigt. 7 Wochen alte C57Bl/6-Mäuse wurden in 2 Gruppen aufgeteilt und erhielten für 12 Wochen entweder 1) eine hoch-kalorische Ernährung (=hfd-Gruppe) oder 2) eine Standard-Ernährung (=Kontrollgruppe). Anschließend wurde durch zökale Ligation und Punktion (CLP) eine Sepsis induziert. Zunächst wurde der Einfluss der Adipositas auf Körpertemperatur und Überleben nach CLP untersucht. In

weiteren Experimenten wurden Leptin und spezifische Zytokine der Entzündungsantwort im zeitlichen Verlauf (6h, 24h und 48h) nach CLP mittels ELISA und der Verlauf der zellulären Immunantwort mittels FACS-Analyse bestimmt. Um den kausalen Beitrag von Leptin zu testen, wurde bei einem Teil beider Gruppen post-operativ Leptin substituiert (1 µg/g KG intraperitoneal, 2x täglich). Typische Sepsis-bedingte Organschädigungen wurden histologisch (HE-Färbung) quantifiziert. Daten sind angegeben als MW ± SEM unter Verwendung des Student's t-Tests bei angenommener Normalverteilung. P<0,05 wurde als statistisch signifikant angenommen.

Ergebnisse

In der Kontroll-Gruppe war das Überleben nach CLP reduziert (10% vs. 71,4%; p<0,0001), verbunden mit einer kürzeren mittleren Überlebenszeit (91,3±17,2h vs. 199,9±17,6h; n=10-14; p=0,0003) und einem signifikanten Abfall der Körpertemperatur im zeitlichen Verlauf. In der hfd-Gruppe war das Serum-Leptin schon vor CLP signifikant erhöht, stieg 6h nach CLP in Serum und peritonealer Lavage signifikant an und blieb im weiteren Verlauf erhöht, während es in der Kontrollgruppe gleichbleibend niedrig blieb. In beiden Gruppen kam es parallel zu einem vergleichbar IL-6-Anstieg nach 6h. Einen zweiten IL-6-Peak in der peritonealen Lavage mit erhöhten Serum-TNFα-Spiegeln und vermehrten histologischen Zeichen einer Lungenschädigung beobachteten wir nur in der Kontrollgruppe nach 48h. Konsistent mit diesen Befunden waren vor Sepsisinduktion sowohl Leukozyten und neutrophile Zellen im Serum als auch natürliche Killer (NK)-Zellen und γδ-T-Zellen in der peritonealen Lavage der Kontrollgruppe

signifikant erniedrigt. Auch 24h nach Sepsis blieb die zelluläre Antwort der Kontrollgruppe niedriger als im Vergleich zur hfd-Gruppe. Unter therapeutischer Leptin-Substitution stiegen die Leptin-Spiegel in der Kontrollgruppe signifikant an. Die Intensivierung des Leptinsignals verhinderte nicht nur den Sepsis-bedingten Abfall der Körpertemperatur, sondern auch die erhöhte Ausschüttung von TNFα und IL-6. Des Weiteren kam es in beiden Gruppen 24h nach CLP zu signifikanten Anstiegen der Neutrophilen im Serum als auch der NK-Zellen und der γδ-T-Zellen in der peritonealen Lavage.

Interpretation

Eine vorbestehende Adipositas und die damit verbundene Hyperleptinämie führten in unserem Modell zu einem verbesserten Überleben in der Sepsis, einer Stabilisierung der Körpertemperatur, einer Verbesserung der primären zellulären Abwehrreaktion (mit bestehender Vor-Aktivierung) in Kombination mit einer verminderten sekundären Hyperinflammationsreaktion. Dies konnte durch eine therapeutische Leptin-Substitution auch bei nicht-adipösen Tieren erreicht werden. Eine Behandlung mit Leptin, vor allem bei Patienten mit relativer Hypoleptinämie, bietet somit einen vielversprechenden neuen Ansatz für eine personalisierte Sepsis-Therapie.

Literatur

- Tschöp J, Dattilo JR, Prakash PS, Kasten KR, Tschöp MH, Caldwell CC: The leptin system: a potential target for sepsis-induced immune suppression. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets 2010;10:336-47
- Tschöp J, Nogueiras R, Haas-Lockie S, Kasten KR, Castaneda TR, Huber N, et al: CNS leptin action modulates immune response and survival in sepsis. J Neurosci 2010;30:6036-47.

Tabelle 1

	before		after CLP								
	hfl	Kontrolle	6h			24h			48h		
			hfl	Kontrolle	Kontrolle + Leptin	hfl	Kontrolle	Kontrolle + Leptin	hfl	Kontrolle	Kontrolle + Leptin
Leptin (S) [ng/ml]	5,7±1,2	2,7±0,2	16,7±2,4	4,7±0,7	35,8±3,3	7,7±1,6	3,0±0,3	5,4±1,5	8,7±1,7	3,8±0,5	3,6±0,7
Leptin (PL) [ng/ml]	0,1±0,1	0,2±0,1	3,6±1,3	0,6±0,1	8,4±2,1	0,8±0,2	0,3±0,1	0,8±0,2	1,0±0,3	0,3±0,1	1,2±0,6
IL-6 (S) [ng/ml]	1,3±0,6	0,9±0,9	18,2±2,6	20,8±2,2	21,8±3,0	15±1,8	16,7±2,8	10,2±0,6	14±1,3	17,1±3,0	12,2±1,3
IL-6 (PL) [ng/ml]	0,8±0,4	1,0±0,9	7,1±1,7	6,5±1,1	2,8±0,5	2,4±0,7	3,3±0,6	2,8±0,5	2,4±0,7	6,0±1,8	1,1±0,5
TNF (S) [ng/ml]	0,8±0,1	0,5±0,1	2,4±0,6	3,2±0,6	2,0±0,4	1,3±0,1	4,2±1,0	3,2±0,5	3,0±0,7	5,7±0,9	3,5±0,4
TNF (PL) [ng/ml]	0,2±0,1	0,2±0,1	0,4±0,1	0,4±0,1	0,3±0,1	0,3±0,1	0,9±0,2	0,4±0,1	0,3±0,1	0,6±0,2	0,5±0,3
Leukozyten (S) [$\times 10^3/\mu\text{l}$]	6,4±0,7	4,0±0,5	4,1±0,5	4,2±0,6	3,3±0,3	3,3±1,1	6,6±2,1	3,1±0,7	4,6±0,7	6,5±0,9	4,8±1,8
Leukozyten (PL) [$\times 10^3/\mu\text{l}$]	n.d.	n.d.	0,8±0,2	0,7±0,1	0,8±0,1	2,8±0,2	1,5±0,4	2,0±0,1	1,9±0,03	1,6±0,3	1,6±0,2
Neutrophile (S) [$\times 10^6/\text{ml}$]	0,2±0,1	0,03±0,01				2,0±0,2	0,8±0,2	2,2±1,0			
Neutrophile (PL) [$\times 10^6/\text{ml}$]	n.d.	n.d.				3,4±0,7	0,9±0,2	1,3±0,6			
NK-Zellen (PL) [$\times 10^6/\text{ml}$]	11,4±3,2	3,0±0,7				4,9±0,7	9,9±1,6	39,9±15,5			
γδ-T-Zellen (PL) [$\times 10^6/\text{ml}$]	5,6±1,2	1,7±0,5				5,3±1,4	3,4±0,5	9,8±2,5			

Docosahexaensäure (DHA)-Supplementierung während Schwangerschaft und Stillzeit vermindert eine durch perinatale Inflammation verursachte pulmonale Fibrose

M. Velten^{1,2} · R. D. Britt Jr.² · T. E. Tipple² · G. Baumgarten¹ · A. Hoeft¹ · S. J. Allen² · L. K. Rogers²

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

2 Center for Perinatal Research, The Research Institute at Nationwide Children's Hospital, Columbus, Ohio (USA)

Korrespondenz: Markus.Velten@ukb.uni-bonn.de

Fragestellung

Epidemiologische Daten belegen einen Zusammenhang zwischen mütterlicher Inflammation, reduziertem Geburtsgewicht und dem Auftreten pulmonaler Erkrankungen im Erwachsenenalter [1]. Neugeborene mit reduziertem Geburtsgewicht oder systemischer Inflammation bedürfen häufig einer Sauerstofftherapie oder Beatmung. Perinatale Inflammation und neonatale Sauerstofftherapie können eine pulmonale Fibrose verursachen [2]. Für DHA konnten bei pulmonalen Erkrankungen protektive und anti-inflammatorische Effekte nachgewiesen werden [3]. Unklar sind jedoch die zu Grunde liegenden Mechanismen. Daher wurde untersucht, ob der durch perinatale Inflammation und neonatale Hyperoxie entstehenden pulmonalen Fibrose eine epithelial-mesenchymale Transition (EMT) zugrunde liegt und ob eine präventive DHA-Nahrungssupplementierung über eine Beeinflussung der EMT einer Kollagendeposition vorbeugt.

Methodik

Zu diesem Zweck wurden trächtigen Wildtyp-Mäusen am 16. Embryonaltag LPS (80µg/kg) oder Kochsalz (KS) i.p. injiziert. Die Muttertiere erhielten Kontrollfutter (KF) oder mit DHA-angereichertes Futter. Nach der Geburt wurden die Nachkommen aus je zwei Würfen identischer Vorbehandlung zufällig auf die beiden Muttertiere verteilt und für 14 d in 85% O₂ oder Raumluft (RL) gehalten. Zur

Vermeidung Hyperoxie-bedingter Schäden rotierten die Muttertiere täglich zwischen der O₂- und RL-Gruppe. Nachfolgend wurden alle Gruppen in RL bis zum Alter von 8 Wochen aufgezogen. Zur Vermeidung wurfbedingter Unterschiede wurde für Lungenfunktion-, Histologie-, Protein- und RNA-Analysen jeweils nur ein Tier pro Wurf verwendet. Alle tierexperimentellen Versuche erfolgten in Übereinstimmung mit den „Principles of Laboratory Animal Care“ in seiner aktuellen Version und wurden genehmigt durch das Institutional Animal Care and Use Committee des Nationwide Children's Hospital, Columbus, Ohio (USA).

Ergebnisse

Eine LPS-Injektion in das Muttertier führte zu erniedrigten Geburtsgewichten (1,32±0,14 KS vs. 1,12±0,15 LPS, g). Eine nachfolgende O₂-Exposition reduzierte die Anzahl der Alveolen (152±5 KS/RL vs. 52±3 LPS/O₂, Gesichtsfeld (GF)), verminderte die pulmonale Compliance (0,070±0,002 KS/RL vs. 0,048±0,004 LPS/O₂, ml/cmH₂O), verursachte einen Anstieg von matrix metalloproteinase (MMP)-8, tissue inhibitor der matrix metalloproteinase (TIMP)-1, transforming growth factor (TGF)-β und Kollagen III mRNA. Weiterhin kam es zur Veränderung der epithelialen mesenchymalen Transition (EMT) mit einem Anstieg des pulmonalen Proteingehaltes von β-Catenin, Vimentin und Slug sowie zur Phosphorylierung von Smad2 und 3 und Ablagerungen von Kollagen I (7,6±1,1 KS/RL vs. 33,3±3,3 LPS/O₂, µm²/GF) und III (18,6±2,4 KS/RL vs. 88,0±9,6 LPS/O₂, µm²/GF). Eine DHA-Supplementierung des Futters verhinderte die durch LPS/O₂ ausgelöste Reduktion des Geburtsgewichtes (1,12±0,15 KF vs. 1,26±0,10 DHA, g), der Alveolarisierung (52±3 KF vs. 80±3 LPS/O₂, GF), der pulmonalen Compliance (0,048±0,004 KF vs. 0,064±0,002 DHA, ml/cmH₂O) und des Anstiegs von MMP-8, TIMP-1, TGF-β und Kollagen III mRNA. Darüber hinaus führte eine DHA-Supplementierung zu einem Anstieg von MMP-2 und MMP-9 mRNA bei LPS/O₂-behandelten Mäusen. Ferner verhinderte DHA den durch LPS/O₂-verursachten Anstieg des pulmonalen Proteingehaltes von β-Catenin, Vimentin und Slug, inhibierte die Phosphorylierung von

Smad2 und 3 und reduzierte den Gehalt an Kollagen I (33,3±3,3 KF vs. 11,1±0,9 DHA, µm²/GF) und III (88,0±9,6 KF vs. 27,0±1,7 DHA, µm²/GF). Zusätzlich führte eine DHA-Supplementierung zu einem Anstieg des Proteingehaltes von E-Cadherin und Claudin im Lungengewebe von LPS/O₂-behandelten Mäusen.

Interpretation

Unsere Ergebnisse belegen, dass mütterliche Inflammation und neonatale Hyperoxie über eine Veränderung der EMT strukturelle und funktionelle Veränderungen der Lunge im Sinne einer pulmonalen Fibrose verursachen. Die Supplementierung der mütterlichen Nahrung mittels DHA während der Schwangerschaft und Stillzeit verhindert den durch perinatale Inflammation entstehenden Gewebeumbau und dadurch bedingte strukturelle und funktionelle Veränderungen und wirkt daher vorbeugend auf die Entstehung pulmonaler Erkrankungen der Nachkommen.

Literatur

- Barker DJ, Godfrey KM, Fall C, Osmond C, Winter PD, Shaheen SO: Relation of birth weight and childhood respiratory infection to adult lung function and death from chronic obstructive airways disease. *BMJ* 1991; 303(6804):671-5
- Velten M, Heyob KM, Rogers LK, Welty SE: Deficits in lung alveolarization and function after systemic maternal inflammation and neonatal hyperoxia exposure. *J Appl Physiol* 2010;108(5):1347-56
- Rogers LK, Valentine CJ, Pennell M, Velten M, Britt RD, Dingess K, Zhao X, Welty SE, Tipple TE: Maternal docosahexaenoic acid supplementation decreases lung inflammation in hyperoxia-exposed newborn mice. *J Nutr* 2011;141(2):214-22.

Die pro-angiogene Wirkung einer TLR2-Inhibition geht mit einer verbesserten regenerativen Funktion knochenmarkstämmer Stammzellen einher

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

1 Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie, Universitätsmedizin Rostock

2 Institut für Experimentelle Chirurgie, Universitätsmedizin Rostock

Korrespondenz:

nana-maria.wagner@med.uni-rostock.de

Preisträgerin des DGAI-Forschungsstipendiums der Fresenius-Stiftung 2013

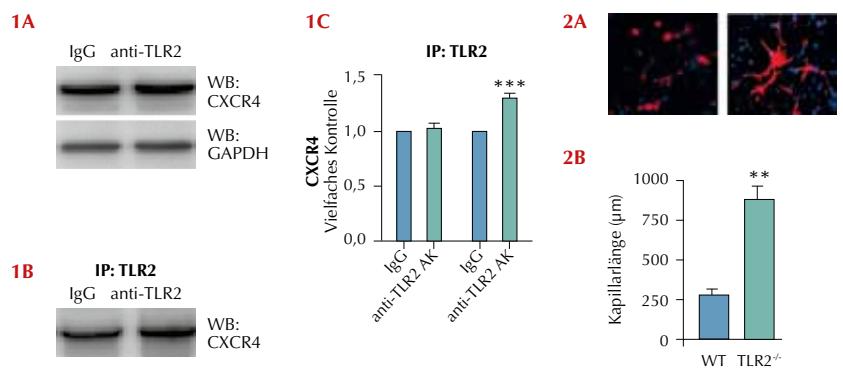
Fragestellung

Toll-like-Rezeptor-2 (TLR2)-Defizienz bzw. die Behandlung mit TLR2-blockierenden Antikörpern ist im Mausmodell mit verbessertem Outcome nach Herzinfarkt, Herzkreislaufstillstand und Reanimation assoziiert [1,2]. Wir konnten kürzlich zeigen, dass TLR2-blockierende Antikörper *in vitro* vergleichbar dem bekannten pro-angiogenen Faktor und Stammzellmodulator Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) Endothelzellfunktionen verstärken. In vivo resultierte die verstärkte Ischämie-induzierte Angiogenese durch TLR2-Blockade oder Defizienz in einer suffizienteren Reperfusion [3]. Es gelang nun, den durch Inkubation mit anti-TLR2-Antikörpern induzierten pro-angiogenen Mechanismus in Endothelzellen zu identifizieren sowie Hinweise für die möglicherweise Stammzell-vermittelten günstigen Effekte einer TLR2-Defizienz im Herzkreislaufsystem zu sammeln.

Methodik

Humane Endothelzellen wurden mit TLR2-blockierenden Antikörpern bzw. SDF-1 behandelt und mittels Western Blot für die induzierten Signaltransduktionswege sowie mittels Immunpräzipitation für die Interaktion des TLR2 mit dem SDF-1 Rezeptor (CXCR4) analysiert. Inhibitoren gegen die identifizierten Signalmoleküle und TLR2-blockierende Antikörper bzw. SDF-1 wurden mit Endothelzellen ko-inkubiert und diese nachfolgend für ihre spontane Kapillarbildung *in vitro* analysiert. Mononukleäre Zellen (PBMNC) und knochenmarkstämme, c-Kit-positive Stammzellen (BMSC) wurden aus TLR2-defizienten ($TLR2^{-/-}$)- und Wildtyp (WT)-Mäusen isoliert und für ihre supportive Wirkung auf die Kapillarbildung, Sprossung und Migration (Matrigel-/Sphäroid-Angiogenese- bzw. Scratch-Modell) ausdifferenzierter Endothelzellen *in vitro* untersucht. Im In-vivo-Matrigel-Plug-Modell in der Maus wurde die Gefäßneubildungspotenz der Zellen drei Wochen nach subkutaner Injektion analysiert.

Abbildung 1 und 2



Western Blot (WB) für CXCR4 **1A** vor und **1B** nach Immunpräzipitation (IP) für TLR2 nach 10-minütiger Behandlung von Endothelzellen mit 10 µg/ml Kontroll-IgG oder anti-TLR2 Antikörper (AK). **1C** Quantitative Zusammenfassung der densitometrischen Auswertung der CXCR4 Western Blots von n=4 unabhängigen Experimenten. Die Kontrollen wurden definiert als 1,0 (**P<0,001).

2A Repräsentative Bildausschnitte von Wildtyp- (links) und TLR2-defizienten (rechts) c-Kit-positiven Stammzellen im Matrigel-Plug, jeweils rot fluoreszierend. Kernfärbung mit DAPI, blau. 100-fache Vergrößerung.

2B Quantitative Zusammenfassung der kumulativen Kapillarlänge pro Gesichtsfeld bestehend aus Wildtyp (WT)- oder TLR2-defizienten ($TLR2^{-/-}$) Stammzellen nach drei Wochen im Matrigel-Plug (n=3 Mäuse pro Gruppe, **P<0,01).

Statistik: Mittelwert ± SD; t-Test bzw. ANOVA/Bonferroni.

Ergebnisse

Behandlung mit 10 µg/ml mono- oder polyclonalem anti-TLR2-Antikörper resultierte binnen zehn Minuten in einer verstärkten Assoziation des TLR2 mit CXCR4 (P<0,001; n=4, Abb. 1 A-C) und in der Aktivierung (Phosphorylierung) der für das SDF-1/CXCR4-System typischen Mitogen-activated protein (MAP) Kinasen ERK1/2 und AKT (jeweils P<0,05 im Vergleich zu Kontroll-IgG; n=4). Entsprechend unterdrückte die Inhibition des ERK1/2- und PI3K/AKT-Signalweges die pro-angiogene Wirkung der anti-TLR2 Antikörper *in vitro* vollständig (je P<0,001; n=8). PBMNC sowie knochenmarkstämme c-Kit positive Stammzellen aus $TLR2^{-/-}$ -Mäusen förderten die In-vitro-Kapillarbildung, Sprossung sowie Migration maturer Endothelzellen besser als aus WT-Mäusen isolierte Zellen (je P<0,01, n=4) und zeigten eine verstärkte Gefäßneubildungspotenz nach subkutaner Injektion in die Maus (P<0,01; n=3 Mäuse pro Gruppe, Abb. 2A, B).

Interpretation

Unsere Ergebnisse identifizieren eine bislang nicht beschriebene Interaktion des TLR2 mit dem SDF-1-Rezeptor CXCR4 in Endothelzellen, welche durch Bindung TLR2-blockierender Antikörper induziert wird und in einer vergleichbar pro-angiogenen Wirkung wie die Inkubation mit SDF-1 selbst resultiert. Genetische TLR2-Defizienz geht mit einer ver-

besserten, diverse Endothelzellfunktionen unterstützenden Stammzellpotenz einher, was insgesamt erstmals Hinweise für die Grundlage der günstigen Effekte einer TLR2-Inhibition bzw. Defizienz im kardiovaskulären System liefern könnte.

Zusammenfassend deuten unsere Befunde auf einen neuen molekularen Mechanismus an der Schnittstelle von Inflammation und Angiogenese hin und unterstützen die Annahme eines therapeutischen Potentials TLR2-blockierender Substanzen für den Erhalt und die Regeneration der vaskulären Homöostase.

Literatur

- 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;
- 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;7:483-84.
- Wagner NM, Bierhansl L, Roesner JP: Der Toll-like Rezeptor 2 moduliert Endothelzellfunktionen und Gefäßneubildungsprozesse: Bedeutung der Interaktion von TLR2 mit dem SDF-1/CXCR4 System. Abstract Wissenschaftliche Arbeitstage Würzburg 2012, Anästh Intensivmed 2012;7:417-18.

Bedeutung des Slo1-Kanals für die Blutdruckregulation unter intensiv-medizinisch relevanten Bedingungen bei der Maus

B. Wissuwa¹ · T. Hoshi³ · S. Stehr¹ ·
S. H. Heinemann² · M. Bauer¹

1 Center for Sepsis Control and Care,

2 Center for Molecular Biomedicine,

Universitätsklinikum Jena

3 Department of Physiology, University of Pennsylvania, Philadelphia (USA)

Korrespondenz:

Bianka.Wissuwa@med.uni-jena.de

Fragestellung

Der Ca^{2+} - und spannungsgesteuerte Kaliumkanal Slo1 nimmt eine zentrale Rolle in der Blutdruckregulation und Aufrechterhaltung des peripheren Widerstandes ein. Die Aktivierung des Slo1-Kanals führt zu einer Vasodilatation. Wir wollen klären, ob das Kreislaufversagen bei Sepsis sowie die Blutdruck-senkende Wirkung von Omega-3-Fettsäuren, deren Gabe in der Intensivmedizin mit widersprüchlichen Ergebnissen assoziiert ist, über Slo1-Kanäle vermittelt wird.

Methodik

Nach behördlicher Genehmigung wurden zunächst Patch-Clamp-Messungen an isolierten aortalen glatten Muskelzellen aus Wildtyp- und $\text{Slo1}^{-/-}$ -Tieren sowie an HEK-Zellen nach heterologer Expression von Slo1-Kanälen durchgeführt. Um den Einfluss der Derivatisierung auf die Blutdruck-senkende Wirkung von Omega-3-Fettsäuren aufzuklären, erfolgten kontinuierliche Blutdruckmessungen in anästhesierten Wildtyp- und $\text{Slo1}^{-/-}$ -Mäusen über einen Katheter in der A. carotis unter Applikation von Docosahexaensäure (DHA)

sowie deren Ethylester (DHA-EE) über die V. jugularis. Eine Überlebenszeitanalyse erfolgte in Wildtyp- und $\text{Slo1}^{-/-}$ -Mäusen nach Sepsisinduktion durch intraperitoneale Injektion einer mikrobiologisch validierten, humanen Stuhlsuspension (PCI-Modell). Die statistische Überprüfung wurde mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Test, einem α -Fehler von 0,05 und Bonferroni-Korrektur durchgeführt.

Ergebnisse

Die elektrophysiologischen Untersuchungen zeigten, dass die Applikation von 3 μM DHA eine bis zu 20-fache Erhöhung der Ionenauströmme von Slo1-Kanälen zur Folge hat. Dies wird durch eine Verschiebung der Spannung halbmaximaler Aktivierung ($\Delta V_{0.5} = -59,0 \pm 3,7 \text{ mV}$, $n=10$, $P<0,05$), welche zur Kanalöffnung benötigt wird, verursacht. Eine Injektion von DHA (62,5 $\mu\text{mol/kg}$) in Wildtyp-Mäusen senkte den arteriellen Mitteldruck signifikant ($-12,0 \pm 2,7 \text{ mmHg}$, $n=7$, $P<0,05$), ohne die Herz- oder Atemfrequenz zu beeinflussen. Bei $\text{Slo1}^{-/-}$ -Tieren hatte DHA keinen Einfluss auf den arteriellen Mitteldruck ($-0,5 \pm 0,2 \text{ mmHg}$, $n=6$). Das Derivat DHA-EE (3 μM), welches alternativ zur freien Fettsäure DHA ebenfalls im Rahmen der Immunonutrition eingesetzt wird, hatte keinen Effekt auf die Spannung der halbmaximalen Aktivierung des Slo1-Kanals ($\Delta V_{0.5} = -1,0 \pm 6,4 \text{ mV}$, $n=8$) und kann somit den Slo1-Kanal nicht aktivieren. Die gleichzeitige Applikation von DHA und DHA-EE resultierte in signifikant niedrigeren Spannungen als durch DHA allein ($\Delta V_{0.5} = -31,8 \pm 3,0 \text{ mV}$, $n=9$, $P<0,05$), was einer Antagonisierung des stimulatorischen Effekts von DHA durch DHA-EE entspricht. Die Tierexperimente beweisen zudem, dass 250 $\mu\text{mol/kg}$ DHA-EE keinen Einfluss auf den arteriellen Mitteldruck bei Wildtyp- ($-0,7 \pm 0,4 \text{ mmHg}$, $n=6$) und $\text{Slo1}^{-/-}$ -Mäusen ($-0,6 \pm 0,4 \text{ mmHg}$, $n=4$) hatte.

$\text{Slo1}^{-/-}$ -Mäuse ($n=9$) zeigten im Modell des septischen Schocks mit 44% tendenziell bessere Überlebensraten als Wildtyp-Mäuse ($n=10$) mit 20% ($P=0,7216$).

Interpretation

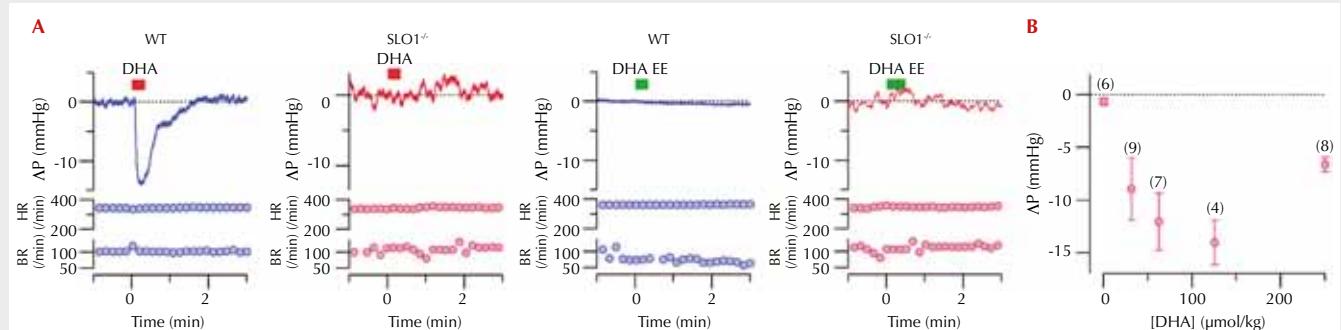
Freie Omega-3-Fettsäuren, jedoch nicht ihre Esterderivate, beeinflussen die Blutdruckregulation direkt über Slo1-Kanäle. Die erhältlichen Emulsionen für enterale und parenterale Applikation entsprechen Gaben von bis zu 10 g DHA täglich pro Patient und enthalten entweder freie oder veresterte Omega-3-Fettsäuren. Somit können Dosierungen, die in unserem Tiermodell signifikante Blutdruck-senkende Effekte von DHA zeigten, im klinischen Kontext erreicht werden. Es ist weiterhin zu klären, ob die DHA-vermittelte Blutdruckregulation über den Slo1-Kanal bei kritisch Kranken, insbesondere septischen Patienten, eine Rolle spielt.

Gefördert durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (FOR 1738) sowie National Institutes of Health (R01GM057654).

Literaturangabe

1. Marik PE & Zaloga GP: Immunonutrition in critically ill patients: a systematic review and analysis of the literature. *Intensive Care Med* 2008;34:1980-1990
2. Nelson MT & Bonev AD: The $\beta 1$ subunit of the Ca^{2+} -sensitive K⁺ channel protects against hypertension. *J Clin Invest* 2004;113:955-957
3. Patterson AJ, Henrie-Olson J & Brenner R: Vasoregulation at the molecular level: a role for the $\beta 1$ subunit of the calcium-activated potassium (BK) channel. *Trends Cardiovasc Med* 2002;12:78-82.

Abbildung 1



A) Repräsentative Aufzeichnung des arteriellen Mitteldrucks sowie von Herz- und Atemfrequenz in Wildtyp- und $\text{Slo1}^{-/-}$ -Tieren bei Applikation von DHA (rote Balken) und DHA-EE (grüne Balken).

B) Dosisabhängigkeit des Blutdruck-senkenden Effekts von DHA.