

Inhalt

R.R. Bruno · W. Neuhaus · N. Roewer · C. Wunder · M.A. Schick	341
Die Molekülgröße und die Herstellungsgrundlage (Mais oder Kartoffel) haben keinen Einfluss auf die schädigende Wirkung von Hydroxyethylstärke (HES) auf proximale humane Nierentubulusepithelzellen in vitro	
I. Eichler	342
Neuronale Mechanismen der Opioid-induzierten Hyperalgesie – Effekte von Remifentanil auf die zentrale Schmerzverarbeitung	
A. Güldner · A. Braune · C. Becker · M. Scharffenberg · J. Wittgenstein · P.L. Silva · M. Andreff · L. Oehme · T. Koch · J. Kotzerke · M.G. de Abreu	344
Quantifizierung der regionalen pulmonalen neutrophilen Akkumulation mittels Positronenemissionstomographie während Volutrauma und Atelektrauma beim Schwein	
F. Hausler · S. Spassov · M. Hummel · S. Faller · A. Hötzler	345
Die protektive Wirkung durch Schwefelwasserstoff beim Ventilator-induzierten Lungen-schaden bei der Maus wird durch COX2 und PPAR γ mit vermittelt	
J. M. Herter · N. Grabie · A. Lichtman · T. Mayadas	346
Die Rolle des A-Kinase-Ankerproteins AKAP9 in CD4 $^{+}$ -T-Zellen in einem murinen Modell der akuten Nierenschädigung	
C. Hinske · M. Koeppen · J. Anton · S. Kretsch	347
MUC5AC wird in humanen Lungenepithelzellen durch miR-193a-3p reguliert	
S. Högl · K.S. Brodsky · B. Zwölfer · H.K. Eltzschig	348
Die Rolle epithelialer Adora2b-Adenosinrezeptoren in einem Mausmodell des akuten Lungenschadens	
M. Honickel · J. van Ryn · H.M.H. Spronk · H. ten Cate · R. Rossaint · O. Grottke	349
Antagonisierung des Thrombininhibitors Dabigatran in supratherapeutischer Dosis in einem Polytraumamodell beim Schwein	
M. Köppen · S.-W. Seo · T. Eckle · V. van der Heide · S. Kretsch · H. K. Eltzschig	350
HIF2 α -abhängige Induktion von Amphiregulin vermittelt Kardioprotektion während muriner myokardialer Ischämie-Reperfusion	
T.J. Krämer · P. Hübener · B. Pöttker · K. Engelhard · C. Werner · S.C. Thal	352
Einfluss von zellfreier DNA auf den funktionellen und histologischen Schaden eines experimentellen Schädel-Hirn-Traumas bei Mäusen	
J. Küstermann · D. Bauer · A. Neuhoff · N. Roewer · R.M. Muellenbach · W. Neuhaus	353
Hyperoxie induziert eine Steigerung der Barriere in einem humanen In-vitro-Modell des Lungenealveolarepithels	
M. Meersch · C. Schmidt · H. Van Aken · S. Martens · J. Rossaint · K. Singbartl · D. Görlich · J. Kellum · A. Zarbock	354
TIMP-2 und IGFBP7 als Biomarker zur Früherkennung der akuten Nierenschädigung und der Erholung der Nierenfunktion nach herzchirurgischen Eingriffen	
T. Treschan · M. Beiderlinden · A. Greinacher · D. Kindgen-Milles · B. Pannen · P. Kienbaum	356
Prospektiv-randomisierte doppel-blind Studie zum Vergleich von Argatroban versus Lepirudin bei kritisch Kranken mit HIT-Verdacht (ALICIA-Studie)	
E. Neumann · T. Brandenburger · F. Barthel · I. Bauer · H. Hermanns · J. Zhao · R. Werdehausen	357
Einfluss der microRNA-1/BDNF-Interaktion auf die Expression von in Signalkaskaden des neuropathischen Schmerzes involvierten Proteinen	
B. Oehler · R. Mayer · J. Schiller · K. Kistner · N. Roewer · P. Reeh · R. Blum · A. Brack · H. Rittner	358
OxPAPC als endogener Agonist von Transient Receptor Potential A1 und V1 bei Entzündung und Schmerz	
C. Olotu · B. Koch · T. Kieffmann · A. Mecklenburg · R. Kieffmann · A.E. Goetz	360
S. pneumoniae inhibiert die purinerge Signaltransduktion in Alveolarepithelzellen durch direkte Inaktivierung des Purinrezeptors P2Y ₂	
K. Rump · A. von Busch · L. Bergmann · A. Menon · S. Schäfer · W. Siffert · J. Peters · M. Adamzik	361
Der AQP5-A(-1364)C-Promotorpolymorphismus und die AQP5-Expression beeinflussen die Letalität bei LPS-induzierter Inflammation und die Migration von Immunzellen	
R.-S. Sauer · J.-A. Broscheit · T. Sohajda · A. Brack · H. L. Rittner · N. Roewer	362
Hemmung der Wirkung von Prostaglandin E2 durch Komplexierung mit methylierten Beta-Cyclodextrinen zur Behandlung von entzündungsbedingten Schmerzen bei Ratten	

Abstracts der 28. Wissenschaftlichen Arbeitstage der DGAI

14. - 15.02.2014, 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 14. - 15.02.2014 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 2015 der Fresenius-Stiftung und das DGAI-Forschungsstipendium der Fresenius-Stiftung finden Sie auf der Seite 340.

S.T. Schäfer · S. Gessner · K. Rump · U. Frey · W. Siffert · J. Fandrey · J. Peters · M. Adamzik Der NFκB1-Promotorpolymorphismus -94ins/delATTG beeinflusst die Wirkung von Hydrocortison bei schwerer Sepsis	363
S.T. Schäfer · M. Adamzik · L. Franken · S. Frede · J. Walden · N. Schönborn · A. Engler · J. Fandrey · A.M. Westendorf · J. Peters · A. Limmer Endogen-freigesetzte mitochondriale DNA supprimiert das adaptive Immunsystem	364
S.T. Schäfer · S. Frede · L. Cox · M. Rabeling · A.M. Westendorf · A. Engler · M. Adamzik · J. Fandrey · J. Peters Zirkulierende mitochondriale DNA – Ursache des postoperativen systemischen inflammatorischen Response-Syndroms?	368
N. Schallner · F. Ulbrich · H. Engelstädtler · J. Biermann · V. Auwärter · U. Göbel Isofluran verstärkt den neuronalen Zellschaden in vitro und in vivo durch Aktivierung von p75 ^{NR} und NF-κB	369
P.M. Schlegel · D. Köhler · A. Körner · H. Frohnmeyer · V. Mirakaj Netrin-1 fördert die hepatische Regeneration nach Ischämie-Reperfusionsschaden	370
J. Spaeth · S. Wirth · M. Baur · H. Bürkle · S. Schumann Lungenprotektive PEEP-Einstellung während intraoperativer Beatmung: mit Standardwerten oder auf Basis der Atemmechanikanalyse?	371
P.M. Spieth · T. Bluth · H. Krause · N. Oppermann · M. Lippmann · R. Huhle · I. Rentzsch · T. Koch · M.G. de Abreu Differentielle Genexpression unter protektiver Beatmung mit variablen Tidalvolumina bei lungengesunden, akut und chronifiziert lungen-geschädigten Ratten	372
J. Stumpner · A. Frank · M. Balz · N. Roewer · T. Smul Die Bedeutung klinisch relevanter Cyclooxygenase-1- und -2-Inhibitoren im Rahmen der Kardioprotektion durch Anästhetika-induzierte Postkonditionierung	374

R. Timaru-Kast · S.P. Coronel-Castello · C. Götz · T. Krämer · A. Sebastiani · K. Engelhard · S.C. Thal	375
Die genetische Defizienz von Angiotensin-II-Typ-2-Rezeptoren bewirkt erst mit zeitlicher Verzögerung nach experimentellem Schädel-Hirn-Trauma eine Vergrößerung des Hirnschadens	
J. Tschöp · D. Siegl · N. Huber · M. Radeva · J. Waschke · P. Conzen · U. Pohl · T. Annecke	376
Sevofluran verbessert die Überlebensrate im murinen Sepsismodell über einen Leptin-abhängigen Mechanismus	
F. Ulbrich · J. Biermann · W. Lagrèze · M. Coburn · T. Loop · U. Goebel	377
Inhalativ appliziertes Argon wirkt protektiv auf retinale Ganglienzellen der Ratte durch die Induktion der mitogenaktivierten Proteinkinase ERK 1/2	
C.M.E. Van Aken · A. Butschkau · G.E.F. Nöldge-Schomburg · B. Vollmar · J.P. Roesner · N.-M. Wagner	379
Procalcitonin unterdrückt endotheliale Gefäßneubildungsprozesse und moduliert die vaskuläre Barrierefunktion in vitro	
V. van der Heide · P. Möhnle · S. Schütz · J. Briegel · S. Kreth	380
microRNAs beeinflussen die T-Zell-Antwort bei humaner Sepsis	
C. Vollmer · A. Mathes · A. Weber · F. Barthel · C. Beck · I. Bauer · O. Picker	381
Melatonin verbessert die regionale Mikrozirkulation und erhält die Barrierefunktion des Gastrointestinal-Traktes während milder Hämorrhagie bei Hunden	
C. Weisheit · M. Schiwon · A. Dixit · S. Gutweiler · G. Baumgarten · C. Kurts · D. Engel	384
Neutrophile Granulozyten gelangen erst durch die gezielte Kommunikation von Makrophagen an den Infektionsherd	
K.H. Wodack · A.M. Poppe · C.J.C. Trepte · B. Saugel · K. Heckel · C.M. Strobel · D.A. Reuter	385
Individualisierte zielgerichtete Volumentherapie bei der schweren experimentellen akuten Pankreatitis – impliziert positive Volumenreagibilität immer die Indikation zur Volumengabe?	
J. Wollborn · C. Wunder · J. Stix · W. Neuhaus · R. Bruno · S. Flemming · N. Roewer · N. Schlegel · M.A. Schick	386
Phosphodiesterase-4-Inhibition vermindert den hepatozellulären Schaden bei der systemischen Hyperinflammation in vitro und in vivo ohne Einfluss auf die Inflammation und die HO-1	

Ausschreibung des DGAI-Forschungsstipendiums der Fresenius-Stiftung

Die 29. Wissenschaftlichen Arbeitstage der Deutschen Gesellschaft für Anästhesiologie und Intensivmedizin (DGAI) werden vom **27. - 28.02.2015** 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.

2015 wird das DGAI-Forschungsstipendium der Fresenius-Stiftung für eine hervorragende Forschungsarbeit mit 15.000 € dotiert. Grundlagenforschung und klinische Forschung sollen gleichermaßen gefördert werden.

Einsendeschluss:
06.01.2015

Nähere Informationen:

www.anaesthesia.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

Die Molekülgröße und die Herstellungsgrundlage (Mais oder Kartoffel) haben keinen Einfluss auf die schädigende Wirkung von Hydroxyethylstärke (HES) auf proximale humane Nierentubulusepithelzellen *in vitro*

R. R. Bruno¹ · W. Neuhaus^{1,2} · N. Roewer¹ · C. Wunder¹ · M. A. Schick¹

1 Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie, Universitätsklinikum Würzburg

2 Department für Medizinische/Pharmazeutische Chemie, Universität Wien (Österreich)

Korrespondenz: schick_m@ukw.de

Fragestellung

HES erhöht das Risiko für ein akutes Nierenversagen und die Mortalität bei septischen Patienten. Dies führte im November letzten Jahres zu einer Anwendungsbeschränkung von HES. Der Pathomechanismus der Nierenschädigung ist unklar. Die perioperative Applikation von HES wird meist als unbedenklich eingestuft. In unseren Vorarbeiten konnten wir zeigen, dass HES sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in den proximalen Tubuluszellen schädigend wirkt [1,2]. Ziel dieser Arbeit war es, die Hypothese zu testen, dass alleine das HES-Molekül für die Nierenschädigung verantwortlich ist, unabhängig von der Molekülgröße, dem Ursprung (Mais bzw. Kartoffelstärke), der Inflammation oder der Trägerlösung.

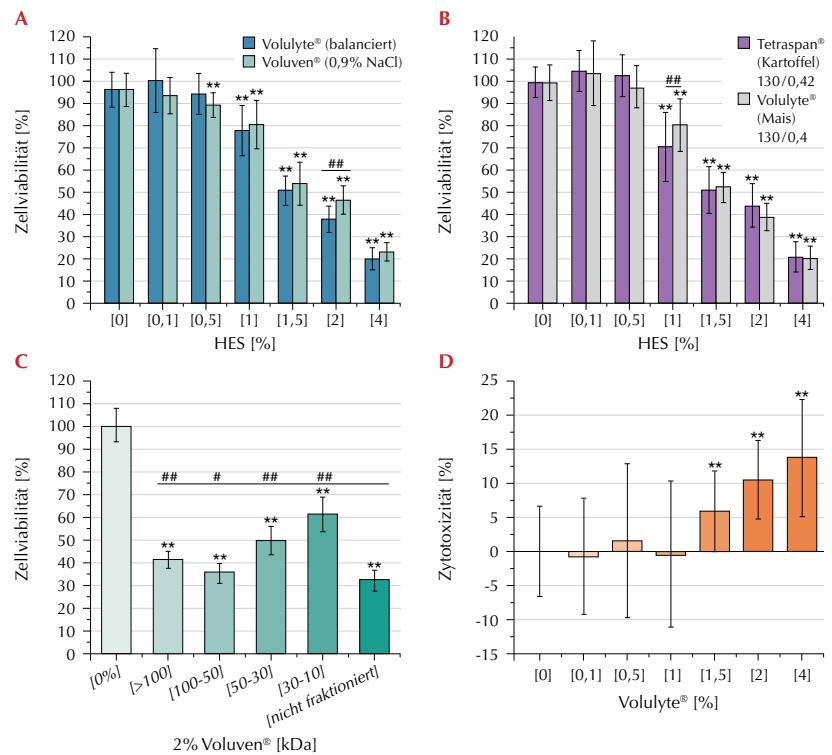
Methodik

Für die Untersuchungen *in vitro* verwendeten wir ein etabliertes Zellkulturmödell mit humanen proximalen Tubuluszellen (HK-2). Die Zellviabilität wurde mit EZ4U- und die Zelltoxizität mit LDH-Assays analysiert [1]. HK-2-Zellen wurden über 21 h mit HES 130/0,4 (im Medium 0,1-4%) oder in Koinkubation mit TNF- α (0,1 ng/ml bis 100 ng/ml) behandelt. Des Weiteren wurde die Auswirkung auf die Viabilität der HK-2 (je 130 kDa; 0,1-4% Lösung) von balanciertem, unbalanciertem HES oder HES gelöst in Zellkulturmödium gemessen. Der potentielle Unterschied von Mais- oder Kartoffelstärke wurde ebenfalls mit 0,1-4% HES Lösung analysiert. Um den Einfluss der Molekülgröße zu bestimmen, wurde 6% HES 130/0,4 über Dialysemembranen in <3, 3-10, 10-30, 30-50, 50-100 und >100 kDa filtriert, getrocknet und auf eine 2% HES-Lösung mit Zellkulturmödium gelöst. Die Statistik erfolgte mit zweiseitigem T-Test (n=32-96; p<0,01*, 0,001** für EZ4U; p<0,05*, p<0,01** für LDH; MW \pm SD).

Ergebnisse

Unbalanciertes und balanciertes HES zeigten

Abbildung 1



A) EZ4U: Auswirkung der Trägerlösung auf die Viabilitätsreduktion der HK-2-Zellen (Voluven® unbalanciert, Volulyte® balancierte Lösung). **B)** EZ4U: Auswirkung der Herstellungsart Kartoffelstärke entspricht Tetraspan® und Maisstärke Voluven®. **C)** EZ4U: Für diesen Versuch wurde Voluven® auf verschiedenen Molekülgrößen gefiltert und in Zellkulturmödium auf eine 2% Lösung gelöst. Alle Molekülfraktionen reduzieren signifikant die Viabilität der humanen proximalen Tubuluszellen (Inkubationszeit 21 h, n=32-96; ** p<0,001, *p<0,01 vs 0%; **A+B**) # p<0,01, ## p<0,01 vs unterschiedlicher HES-Lösungen; **C**) # p<0,01, ## p<0,01 vs unfraktioniertem Voluven®); **D)** LDH-Zytotoxizitätstest von Volulyte® (Inkubationszeit 24 h, n=32-96; ** p<0,001, *p<0,01 vs 0%).

eine dosisabhängige Reduktion der HK-2-Zellviabilität (Abb. 1 A). HES 130/0,4 gelöst in Medium (1,5% Voluven®) hatte zum Beispiel eine Reduktion der Viabilität auf $47,3\% \pm 6,8\%$ zur Folge. Ebenfalls bewirkten sowohl Mais- (Volulyte®) als auch Kartoffelstärke (Tetraspan®) nach 21 h Inkubationszeit eine dosisabhängige Viabilitätsreduktion (Abb. 1 B). Die mit TNF- α inflammatorisch vorbehandelten HK-2-Zellen konnten keinen Unterschied in der schädigenden Wirkung der 130 kDa HES-Lösung zeigen. Eine 2% HES-Lösung mit einer Molekülgröße >100 kDa reduzierte die Viabilität auf $40,8 \pm 3,6\%$, HES-Moleküle mit 100-50 kDa auf $35,2 \pm 4,3\%$ und die kleineren Moleküle 30-50 kDa auf $49,1 \pm 6,2\%$. Zusätzlich zeigte sich im LDH-Assay, dass nach 24 h Inkubation nicht nur eine Viabilitätsreduktion, sondern auch eine statistisch hochsignifikante Zytotoxizität vorlag (ab 1,5% Volulyte®, siehe Abbildung 1 D).

Interpretation

Die Beeinträchtigung der Viabilität von proximalen humanen Nierentubuluszellen (HK-2) durch Hydroxethylstärke in klinisch relevanten Konzentrationen ist unabhängig von der Herstellungsgrundlage (Kartoffel- oder Maisstärke), der Trägersubstanz und der Molekülgröße. Unabhängig vom Vorliegen einer Inflammation scheint nur die applizierte Masse von HES-Molekülen die Schädigung in den Nierenzellen zu bewirken.

Literatur

1. Schick MA, Isbary TJ, Schlegel N, Brugger J, Waschke J, Muellenbach R, Roewer N, Wunder C: The impact of crystalloid and colloid infusion on the kidney in rodent sepsis. *Intensive Care Med* 2010;36(3):541-8
2. Neuhaus W, Schick MA, Bruno RR, Schneiker B, Förster CY, Roewer N, Wunder C: The effects of colloid solutions on renal proximal tubular cells *in vitro*. *Anesth Analg* 2012;114(2).

Neuronale Mechanismen der Opioid-induzierten Hyperalgesie – Effekte von Remifentanil auf die zentrale Schmerzverarbeitung

I. Eichler

Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Korrespondenz: i.eichler@uke.de

Einleitung

In den letzten Jahren wurde die Opioid-induzierte Hyperalgesie, d.h. eine gesteigerte Schmerzwahrnehmung nach Opioid-Gabe, in der Literatur viel diskutiert. Die genauen molekularen Mechanismen sind bislang nicht abschließend geklärt. In unserer Arbeitsgruppe konnte labor- und verhaltensexperimentell gezeigt werden, dass der TRPV1-Rezeptor eine wesentliche Rolle bei der Entstehung der Opioid-induzierten Hyperalgesie spielt [1]. Die klinische Relevanz dieser gesteigerten Schmerzempfindlichkeit wird derzeit noch kontrovers diskutiert [2]. In vorangegangenen Untersuchungen an gesunden Probanden konnten wir mittels quantitativer sensorischer Testverfahren feststellen, dass die Hitze-Schmerzschwelle nach intravenöser Gabe von Remifentanil erniedrigt ist – die Intensitätsbewertung auf einer visuellen Analogskala (VAS) zeigte jedoch keinen Unterschied.

In Kooperation mit dem Institut für systemische Neurowissenschaften am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf wurde mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. C. Büchel eine funktionellen Magnetresonanztomographie-Studie (fMRT) durchgeführt, um die beteiligten zentralnervösen Mechanismen zu charakterisieren.

Material und Methoden

32 gesunde männliche Probanden (mittleres Alter $26,5 \pm 1,1$ Jahre) durchliefen zwei aufeinanderfolgende, vom Ablauf her identische fMRT-Messungen. Während jeder Messung wurden den Probanden identische, ansteigende Temperatur-Rampen (33 bis 48°C,

0,5°C Anstieg pro Sekunde) mittels einer Peltier-Thermode am linken Unterarm appliziert. Während dieser Temperatur-Rampen wurde die Hitze-Schmerzschwelle erfasst. Zudem wurde die Schmerzhaftigkeit jedes Reizes vom Probanden auf einer visuellen Analogskala (0-100) bewertet. Nach der ersten fMRT-Messung erfolgte bei 16 Probanden eine intravenöse Applikation von Remifentanil mit einer Dosierung von 0,1 µg/kg KG/min über 30min. Die anderen 16 Probanden erhielten 0,9%ige Kochsalzlösung für die gleiche Zeitdauer. Beide Gruppen unterschieden sich nicht in Alter, Gewicht oder initialer Schmerzschwelle. Nach einer anschließenden, 60 minütigen Pause erfolgte dann die 2. fMRT-Messung mit dem identischen Versuchsablauf. Die Differenzen zwischen den beiden fMRT-Messungen wurden mittels ungepaarten t-Tests zwischen den Gruppen verglichen. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Ärztekammer Hamburg genehmigt; alle Teilnehmer gaben schriftlich ihr Einverständnis.

Ergebnisse

Die Applikation von Remifentanil bewirkte übereinstimmend mit unseren Vorversuchen eine statistisch signifikante Absenkung der Hitze-Schmerzschwelle im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p<0,05$). Die erniedrigte Hitze-Schmerzschwelle ging nicht mit einer gesteigerten Einschätzung der Schmerzhaftigkeit der thermischen Reize auf der VAS einher ($p=0,36$).

Die fMRT-Analyse der schmerzhaften Phase der Hitze-Reize zeigte generell einen Anstieg des blood-oxygen-level-dependend (BOLD)-Signals in typischen schmerzresponsive Hirnarealen, wie z.B. im kontralateralen Thalamus, primäreren und sekundären somatosensorischen Kortex, Insula und anterioren zingulären Kortex (ACC). Bereits in der nichtschmerzhaften Phase der thermischen Reize bewirkte Remifentanil im Vergleich zur Kochsalzgruppe ein gesteigertes BOLD-Signal in der mesenzephalen retikulären Formation (MRF) ($p<0,05$). Auch der Thalamus zeigte bereits in der nichtschmerzhaften

Phase der thermischen Reize eine gesteigerte Aktivität unter Remifentanil im Vergleich zu Kochsalz ($p<0,05$). In der letzten Phase der thermischen Reize – nachdem alle Probanden ihre individuelle Schmerzschwelle überschritten hatten – konnten keine Unterschiede zwischen Remifentanil und der Kochsalzgruppe mehr festgestellt werden.

Analog zu fehlenden Unterschieden bei den Intensitätserschätzungen konnten keine Unterschiede in Hirnregionen detektiert werden, die an der Intensitätskodierung beteiligt sind. Schließlich beobachteten wir eine gesteigerte funktionelle Konnektivität zwischen MRF und rostralem ACC nach Remifentanil-Applikation ($p<0,05$). Dabei korrelierte interessanterweise die Stärke der funktionellen Konnektivität zwischen rostralem ACC und MRF negativ mit der individuellen Hitze-Schmerzschwelle ($r=-0,8$, $p<0,05$).

Schlussfolgerungen

Die Gabe von Remifentanil führt zu einer Veränderung bei der Verarbeitung von thermischen Reizen im Zentralnervensystem. Dies betrifft in diesem verletzungsfreien Schmerzmodell isoliert die Hitze-Schmerzschwelle, nicht die Intensitätswahrnehmung. Eine gesteigerte Aktivität der MRF im Hirnstamm unter Remifentanil zeigt sich schon vor Erreichen der Hitze-Schmerzschwelle und wurde bereits zuvor in Zusammenhang mit zentraler Sensitivierung gebracht [3,4]. Darüber hinaus deutet die gesteigerte Konnektivität zwischen MRF und rACC auf eine Beteiligung des deszendierenden schmerzmodulierenden Systems. Die deutliche negative Korrelation zwischen der individuellen Stärke der funktionellen Konnektivität und der individuellen Hitze-Schmerzschwelle weist auf die funktionelle Bedeutung dieser Beobachtung.

Literatur

1. Spahn V, et al: Pain 2013
2. Fishbain DA, et al: PM 2009
3. Wanigasekera, et al: JN 2011
4. Lee MC, et al: JN 2008 .

Quantifizierung der regionalen pulmonalen neutrophilen Akkumulation mittels Positronenemissionstomographie während Volutrauma und Atelektrauma beim Schwein

A. Gündner¹ · A. Braune¹ · C. Becker¹ · M. Scharffenberg¹ · J. Wittgenstein¹ · P. L. Silva¹ · M. Andreff² · L. Oehme² · T. Koch¹ · J. Kotzerke² · M. G. de Abreu¹

1 Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie, Universitätsklinikum Dresden

2 Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin, Universitätsklinikum Dresden

Korrespondenz:

Andreas.Gueldner@uniklinikum-dresden.de

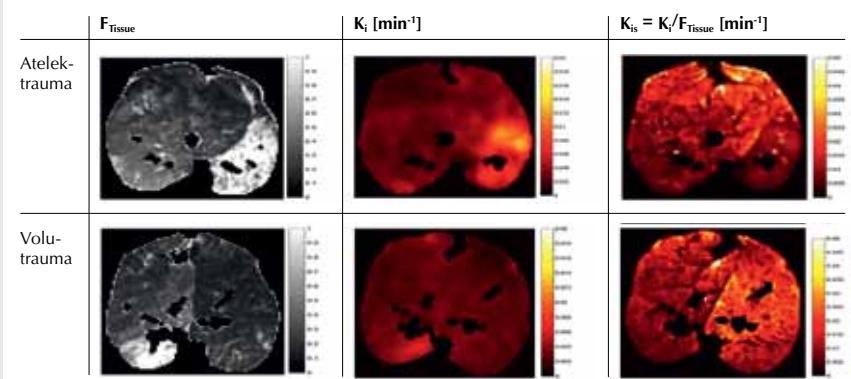
Fragestellung

Volutrauma und Atelektrauma stellen die wichtigsten Mechanismen bei Ausbildung einer beatmungsinduzierten Lungenschädigung (VILI) dar [1], aber es ist unklar, welches dieser Phänomene wichtiger ist. Die Positronenemissionstomographie (PET) mittels ¹⁸Fluorodesoxyglucose (¹⁸FDG) stellt eine Möglichkeit zur Quantifizierung von Ausmaß und regionaler Verteilung neutrophilisch inflammatorischer Prozesse in der Lunge dar. Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, Ausmaß und regionale Verteilung der pulmonalen Inflammation während Volu- und Atelektrauma in einem Modell des ARDS zu untersuchen.

Methodik

Nach behördlicher Genehmigung wurden 14 Hausschweine (34,7-49,9 kg) analgosediert, intubiert und im volumenkontrollierten Modus beatmet. 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. Im Anschluss erfolgten die Platzierung eines Doppelklemmentubus via Tracheotomie zur seitengrenzen Beatmung sowie die Anlage einer extrakorporalen Lungenunterstützung (iLA[®]) zwischen linker Femoralarterie und rechter Femoralvene. Nach Rekrutement beider Lungen mittels kontinuierlichen, positiven Atemwegsdrucks (CPAP) wurde in der rechten Lunge ein CPAP-Level von 20 cm H₂O etabliert. In der linken Lunge erfolgte eine absteigende PEEP-Titration mit folgenden Beatmungseinstellungen: druckregulierte volumenkontrollierte Beatmung (PRVC), $V_t = 3$ ml/kg, AF=30 min⁻¹, Reduktion des PEEP von 36 bis 0 in Schritten von 2 cm H₂O. An-

Abbildung 1



Beispieldatensatz eines Volu- und eines Atelektrauma-Tieres.

schließend erfolgte die randomisierte Zuordnung der Versuchstiere zu einer Beatmungstherapie der linken Lunge zur Induktion eines Atelek- oder Volutraumas mit folgenden Einstellungen: Volutrauma – PEEP 2 cm H₂O oberhalb des oberen Infektionspunktes der Druck-Volumenbeziehung, Atelektrauma – PEEP bei dem eine identische Atemwegsdruckdifferenz (ΔP , Differenz aus Spitzendruck und PEEP) im Vergleich zu Volutrauma besteht. Die anderen Beatmungseinstellungen wurden in beiden Gruppen wie folgt gewählt: $V_t = 3$ ml/kg, AF adjustiert für $\text{pH} > 7,15$ und ≤ 30 min⁻¹, I:E=1:1. Die FiO_2 wurde bis zum Versuchsende bei 1,0 belassen. Nach einer Beatmungsdauer von 2h erfolgte die Applikation von ¹⁸FDG und die Messung der resultierenden Aktivität während eines 75 minütigen, dynamischen PET-Scans gemäß eines vorbeschriebenen Protokolls [2]. Parallel erfolgten Messungen der Lungenfunktion. Ein computertomographischer Scan, welcher unmittelbar vor der PET-Aufnahme erfasst wurde, wurde zur Bestimmung des Gewebeanteils eines Voxels herangezogen ($F_{\text{Tissue}} = 1 - F_{\text{Gas}}$). Nach einer Gesamtbeatmungsdauer von 4 h wurden die Tiere in tiefer Narkose getötet. Die Nettoaufnahmerate von ¹⁸FDG in der Lunge (K_t) wurde anhand der Methode nach Patlak bestimmt [2]. Um den Einfluss des variierenden Gewebeanteils auf die lokale ¹⁸FDG Nettoaufnahmerate zu korrigieren, wurde die spezifische Nettoaufnahmerate definiert ($K_{is} = K_t/F_{\text{Tissue}}$). Die statistischen Analysen wurden mittels Mann-Whitney-U-Tests bzw. two way-ANOVA durchgeführt. Ein $P < 0,05$ wurde als signifikant angenommen.

Ergebnisse

1 Tier der Atelek- und 2 Tiere der Volutraumagruppe starben vor der PET-Aufnahme. Abbildung 1 zeigt einen Beispieldatensatz eines Tieres pro Gruppe. Volutrauma führte im Vergleich zu Atelektrauma zu einem signifikant höheren K_{is} in ventralen (1,25; 1,16-1,67 vs. 0,96; 0,53-1,15) und zentralen (1,76; 1,61-2,14 vs. 1,08; 0,96-1,40) Lungenarealen (Median und Interquartile, Werte normalisiert auf die rechte, nicht beatmete Lunge). Bei anfänglich vergleichbaren Werten zeigte die Beatmung mit Atelektrauma im Zeitverlauf ein höheres ΔP . Für V_t ließen sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen nachweisen. Bei vergleichbarer Oxygenierung zeigte die Beatmung mit Volutrauma im Vergleich zu Atelektrauma einen erhöhten PaCO_2 .

Interpretation

Volutrauma führt im Vergleich zu Atelektrauma bei vergleichbaren Tidalvolumina und trotz niedrigeren ΔP -Werten zu einer Verstärkung der pulmonalen Inflammation, besonders in ventralen und zentralen Lungenarealen und ist somit der wichtigere Mechanismus für die Entstehung von VILI in diesem Modell des ARDS.

Literatur

- Slutsky AS and Ranieri VM: Ventilator-induced lung injury. N Engl J Med 2013;369(22): 2126-36
- Musch G, Venegas JG, Bellani G, Winkler T, Schroeder T, Petersen B, Harris RS, and Melo MF: Regional gas exchange and cellular metabolic activity in ventilator-induced lung injury. Anesthesiology 2007;106(4):723-35.

Die protektive Wirkung durch Schwefelwasserstoff beim Ventilator-induzierten Lungenschaden bei der Maus wird durch COX2 und PPAR γ mit vermittelt

F. Hausler · S. Spassov · M. Hummel · S. Faller · A. Hötzl

Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin, Universitätsklinikum Freiburg

Korrespondenz:
florian.hausler@uniklinik-freiburg.de

Fragestellung

Die mechanische Beatmung kann bei Patienten zu einem Ventilator-assoziierten bzw. Ventilator-induzierten Lungenschaden (VILI) führen [1]. Diesbezüglich konnte in einem experimentellen VILI-Modell eine lungenprotektive Wirkung durch Schwefelwasserstoff (H_2S) gezeigt werden [2]. Um die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen zu

identifizieren, untersuchten wir in dieser Studie die Rolle der Cyclooxygenase 2 (COX2) und des Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptors Gamma (PPAR γ).

Methodik

Nach Genehmigung durch das Regierungs-präsidium (G07/25 und G12/073) wurden C57/BL6-Mäuse randomisiert vier Gruppen (n=7/Gruppe) zugeteilt und in Spontanatmung (Kontrolle) oder unter mechanischer Beatmung (Vent, Tidalvolumen 12 ml/kg, 6 Std.) Raumluft mit und ohne 80 ppm H_2S zugeführt. Die Bewertung des Lungenschadens erfolgte durch histologische Auswertungen sowie durch einen VILI-Score [2]. Effekte von H_2S auf die COX2- und PPAR γ -Regulation wurden mittels rtPCR, Westernblot und Immunfluoreszenz in Lungenproben bestimmt. Begleitend wurden in vitro murine RAW264.7-Makrophagen mit Natriumhydrogensulfid (NaHS, 3 mM, 6 Std., n=3/Versuchspunkt) inkubiert und die COX2-, PPAR γ - und Prostaglandin J2 (15d-PGJ2)-Regulation im

Zellüberstand mittels rtPCR, Westernblot und ELISA analysiert. Die funktionelle Relevanz der COX2 und des PPAR γ wurde in zwei weiteren VILI-Modell-Versuchsreihen mit je vier Gruppen (n=7/Gruppe) durch die Hemmung von COX2 (Inhibitor Cay10404, 30 mg/kg/Tag für drei Tage sowie eine Stunde vor Versuchsbeginn) bzw. PPAR γ (Inhibitor GW9662, 5 mg/kg, eine Stunde vor Versuchsbeginn) untersucht. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ANOVA und t-Tests. Ein p-Wert <0,05 wurde als signifikant erachtet. Dargestellt wurden Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM).

Ergebnisse

Die mechanische Beatmung verursachte eine Erhöhung des VILI-Scores, die durch die Zufuhr von H_2S verhindert wurde (Abb. 1). Nach H_2S -Inhalation war in der Lunge die COX2 mRNA- und Proteinkonzentration erhöht. In RAW-Zellen führte die Inkubation mit NaHS zu einer vermehrten Expression der COX2, dessen Produktes 15d-PGJ2 und PPAR γ . Letzteres stellt eine Bindungsstelle für 15d-PGJ2 dar [3]. Gleichermaßen wurde eine Erhöhung der PPAR γ -mRNA und des PPAR γ -Proteins nach H_2S -Inhalation im Lungengewebe beobachtet (Tab. 1, Abb. 2). Durch die Gabe des selektiven COX2-Inhibitors Cay10404 wurde die H_2S -vermittelte Reduktion des VILI-Scores teilweise und durch die Applikation des PPAR γ -Inhibitors GW9662 vollständig aufgehoben (Abb. 3 A+B).

Interpretation

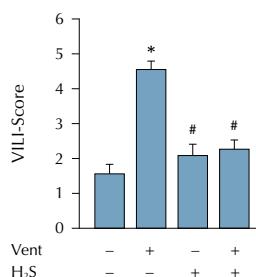
Die Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass COX2, 15d-PGJ2 und PPAR γ in der H_2S vermittelten Lungenprotektion einen wesentlichen molekularen Mechanismus darstellen.

Literatur

- Slutsky AS, Ranieri VM: Ventilator-induced lung injury. N Engl J Med 2013;369:2126-36
- Faller S, Ryter SW, Choi AM, Loop T, Schmidt R, Hoetzl A: Inhaled hydrogen sulfide protects against ventilator-induced lung injury. Anesthesiology 2010;113:104-15
- Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK: The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. Nature 1998;391:79-82.

Abbildung 1, 2 und 3 | Tabelle 1

Abb. 1



Tab. 1

Lunge	Kontrolle	Vent	Vent+H ₂ S
COX2 mRNA	1,0 \pm 0,2	1,77 \pm 0,2	11,04 \pm 3,0*#
COX2-Protein	1,0 \pm 0,02	1,05 \pm 0,1	1,54 \pm 0,2*#
PPAR γ mRNA	1,0 \pm 0,1	0,91 \pm 0,02	1,21 \pm 0,1

RAW-Zellen	Kontrolle	NaHS
COX2 mRNA	1,0 \pm 0,2	10,6 \pm 2,7*
COX2-Protein	1,0 \pm 0,009	1,8 \pm 0,2*
15d-PGJ2-Protein	1,0 \pm 0,1	5,5 \pm 1,2*
PPAR γ mRNA	1,0 \pm 0,6	10,3 \pm 2,7*

Abb. 2

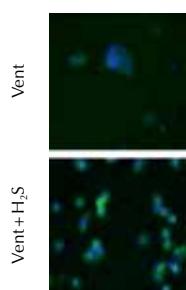


Abb. 3

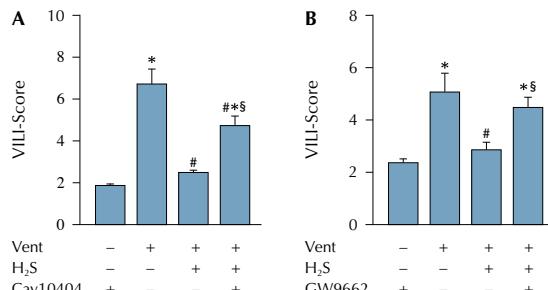


Abb. 1: VILI-Score; ANOVA, *p<0,05 vs Luft spontan, #p<0,05 vs Vent.

Abb. 2: Indirekte Immunfluoreszenzfärbung, PPAR γ (grün) / DAPI (blau), rel. Intensitätserhöhung 1,44 \pm 0,08; t-test p<0,05.

Abb. 3: VILI-Score; A: Inhibition der COX2, B: Inhibition des PPAR γ ; ANOVA, *p<0,05 vs Luft spontan + Inhibitor, #p<0,05 vs Vent, §p<0,05 vs Vent + H₂S.

Tab. 1: Relative Induktion; ANOVA (Lungengewebe), bzw. t-Test (Zellexperimente), *p<0,05 vs Kontrolle, #p<0,05 vs Vent.

Die Rolle des A-Kinase-Ankerproteins AKAP9 in CD4⁺-T-Zellen in einem murinen Modell der akuten Nierenschädigung

J. M. Herter^{1,2} · N. Grabie¹ · A. Lichtman¹ · T. Mayadas¹

1 Center for Excellence in Vascular Biology, Department of Pathology, Brigham and Women's Hospital, and Harvard Medical School, Boston, MA (USA)

2 Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie, operative Intensivmedizin und Schmerztherapie, Universität Münster

Korrespondenz: jherter@partners.org

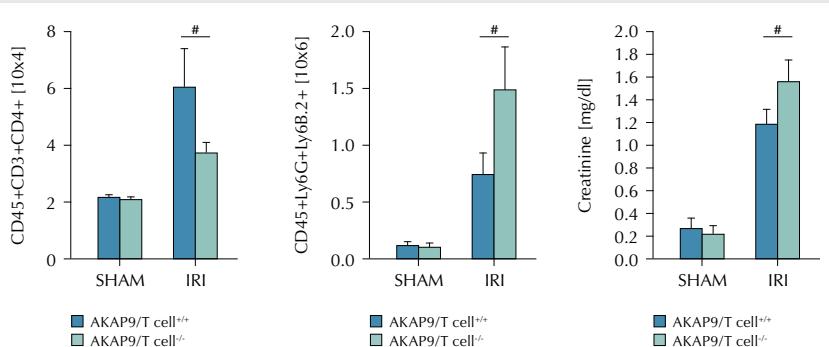
Fragestellung

Die akute Nierenschädigung ist eine häufige Komplikation bei kritisch kranken Patienten und geht mit einer hohen Morbität und Letalität einher [1]. Der Ischämie-Reperfusionschaden gehört zu den häufigsten Auslösern des akuten Nierenversagens [1]. Es konnte gezeigt werden, dass die Rekrutierung und Aktivierung von CD4⁺-T-Zellen nach Reperfusion eine entscheidende Rolle sowohl bei der Initierung durch Th₁-T-Zellen als auch der Limitierung durch regulatorische T-Zellen (Tregs) der akuten Nierenschädigung spielt [2]. Das A-Kinase-Ankerprotein 9 (AKAP9) wird am Golgi und am Zentrosom exprimiert und gehört zu einer Familie von Faltungsproteinen, die an der subzellulären Kompartimentalisierung von Signalwegen durch Regulation des Signalmoleküls cAMP beteiligt sind [3]. Durch die Generierung von Mäusen, denen AKAP9 in CD4⁺-T-Zellen fehlt, konnten wir die Funktion von AKAP9 für CD4⁺-T-Zellen-Funktionen in vitro und in vivo bei der akuten Nierenschädigung untersuchen.

Methodik

Alle Tierversuche wurden durch das Institutional Animal Care and Use Committee genehmigt. In-vitro-T-Zell-Kulturen wurden entweder mit gebundenem CD3ε oder mit dem Superantigen Staphylococcus enterotoxin B (SEB, präsentiert durch inaktivierte Milzellen), um die T-Zell-Rezeptorabhängige Proliferation und Differenzierung zu untersuchen, durchgeführt. Um die Funktion von AKAP9 nach Ischämie-Reperfusion zu untersuchen, wurden Kontrollmäuse und Mäuse ohne AKAP9 in CD4⁺-T-Zellen nach 32 min renaler Ischämie in Bezug auf Serumkreatinin (ELISA) und die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und CD4⁺-T-Zellen in die Niere mittels Durchflusszytometrie nach 3 bzw. 24 h analysiert. CD4⁺-T-Zellen wurden weiterhin auf die Produktion von IFNγ (Th₁) und Expression von FOXP3 und CD25 (Treg) untersucht. Um den Anteil von T-Zell-Rekrutierung

Abbildung 1



24 h nach Reperfusion wurden in der Niere CD4⁺-T-Zellen (links), Neutrophile (Mitte) und Serumkreatinin als Surrogatparameter des Organsschadens (rechts) in Wildtyp-Kontrollmäusen und Mäusen ohne AKAP9 in CD4⁺-T-Zellen bestimmt. n=6-8, #p<0.05.

und Auswanderung zu beurteilen, wurden Mäuse mit in vitro differenzierten, markierten T-Zellen nach Reperfusion injiziert. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ANOVA und anschließenden Student-Newmann-Keul-Tests (Daten als Mittelwert \pm SEM).

Ergebnisse

Mäuse ohne AKAP9 in CD4⁺-T-Zellen haben normale T-Zell-Zahlen in Blut, Lymphknoten und Milz. AKAP9-defiziente CD4⁺-T-Zellen proliferieren und differenzieren nach Vernetzung von CD3ε normal, aber zeigen eine signifikante Reduktion der Proliferation bei Stimulation mit SEB in vitro. Dies weist auf eine Rolle von AKAP9 bei der T-Zell/MHCII Komplex Formierung oder Aktivierung hin. Transferierte CD4⁺-Th₁-Zellen rekrutierten vergleichbar in die Niere 3 h nach Reperfusion (51.2% vs. WT 48.8%). Jedoch wurden nach 24h signifikant weniger AKAP9-defiziente T-Zellen in der Niere gefunden (31.3% vs WT 68.7%), aber eine signifikant erhöhte Zellzahl in den drainierenden Lymphknoten (31.3% vs WT 68.7%). Diese Daten zeigen, dass die Retention von AKAP9-defizienten T-Zellen in der Niere gestört ist. Um die pathophysiologische Bedeutung dieser Ergebnisse zu untersuchen, wurden Mäuse mit CD4-spezifischem AKAP9-knock-out nach Ischämie-Reperfusion untersucht. Erneut fanden wir nach 24 h signifikant weniger T-Zellen in der Niere ($3.6 \pm 0.3 \times 10^4$ vs WT $6.0 \pm 1.3 \times 10^4$), einhergehend mit einem signifikanten Anstieg der Neutrophilen ($1.4 \pm 0.3 \times 10^6$ vs WT $7.1 \pm 1.8 \times 10^5$, Abb. 1 links und Mitte). Die Reduktion der T-Zellen war in IFNγ-produzierenden und in FOXP3⁺CD25⁺-Populationen ähnlich. Die Makrophageninfiltration unterschied sich nicht zwischen den Gruppen ($3.2 \pm 0.2 \times 10^6$ vs WT $3.0 \pm 0.4 \times 10^6$). Das Serumkreatinin als Surrogatparameter des

Nierenschadens war bei Mäusen ohne AKAP in CD4⁺-Zellen signifikant erhöht (1.55 ± 0.18 mg/dl vs WT 1.18 ± 0.12 mg/dl, Abb. 1 rechts).

Interpretation

Unsere Daten zeigen zum einen, dass obwohl die Reduktion von pro-inflammatorischen Th₁-T-Zellen und anti-inflammatorischen regulatorischen T-Zellen ähnlich war, eine vermehrte Inflammation und ein größerer renaler Organschaden beobachtet wurde. Für den Verlauf der Immunantwort in der Niere scheint die Zahl der regulatorischen T-Zellen somit wichtiger als die Zahl der proinflammatorischen Th₁-Zellen zu sein. Zum anderen weisen unsere Daten darauf hin, dass die Antigenpräsentation in der Niere zwar nicht von entscheidender Bedeutung für die Rekrutierung von T-Zellen, aber essentiell für die Retention von sowohl Th₁- als auch regulatorischen T-Zellen ist. Diese Ergebnisse könnten die Grundlage für neue therapeutische Optionen bei der akuten Nierenschädigung darstellen, die die Antigenpräsentation im Gewebe als Voraussetzung der T-Zell-Aktivierung oder die Retention von vor allem regulatorischen T-Zellen zum Ziel haben.

Literatur

1. 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.
2. Kinsley GR, Sharma R, Okusa MD: Regulatory T cells in AKI. J Am Soc Nephrol 2013;Nov; 24(11):1720-6
3. Esselte JL, Scott JD: AKAP signaling complexes: pointing towards the next generation of therapeutic targets? Trends Pharmacol Sci 2013;Dec;34(12):648-55.

MUC5AC wird in humanen Lungenepithelzellen durch miR-193a-3p reguliert

C. Hinske* · M. Koeppen* · J. Anton · S. Kreth

Klinik für Anaesthesiologie der Universität München

Korrespondenz:

christian.hinske@med.uni-muenchen.de

* am Abstract gleichermaßen beteiligt

Fragestellung

Das Glycoprotein MUC5AC als wesentlicher Bestandteil des Atemwegsmucus stellt eine bedeutende Komponente des angeborenen Immunsystems der Lunge dar [1,2]. Wir konnten zeigen, dass MUC5AC die Inflammation im akuten Lungenversagen verstärkt, indem es die Transmigration neutrophiler Granulozyten erhöht [3]. Wie die Expression von MUC5AC in der Lunge reguliert wird, ist bislang kaum untersucht. Der MUC5AC-Genlocus liegt in einer hypervariablen chromosomal Region und gesicherte Informationen über die Sequenz der in Lungenzellen exprimierten Transkripte fehlen. Die vorliegende Studie fokussierte zunächst darauf, die MUC5AC-mRNA samt ihres 3'-UTRs zu charakterisieren, um dann zu untersuchen, ob micro-RNAs (miRs) an der Regulation der MUC5AC-Expression in Lungenepithelzellen beteiligt sind und ob dies funktionell relevant sein könnte.

Methodik

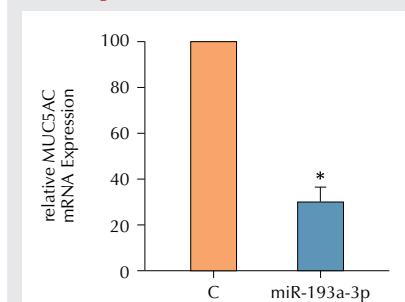
Eine mögliche miR-Regulation von MUC5AC wurde durch DICER-Knock-down (Transfektion spezifischer siRNA) in humanen pulmo-

nalen Epithelzellen (A549) mit nachfolgender Bestimmung der MUC5AC-Expression mittels quantitativer real-time PCR (qPCR) untersucht. Die Sequenz des in A549-Zellen exprimierten MUC5AC-Transkriptes wurde durch multiple PCRs mit nachfolgenden Sequenzierungen bestimmt; der 3'-UTR wurde durch 3'-RACE (rapid amplification of cDNA ends) ermittelt. Die 3'-UTR-Sequenz wurde mittels bioinformatischer Methoden auf Basenkomplementarität zu miRNA-Seed-Regionen hin überprüft, und potenziell regulierende miRs wurden nach Trefferfrequenz, Bindungsenergie und Interaktions-Regulationswahrscheinlichkeit bewertet. Der die putativen Bindungsstellen enthaltende Teil des 3'-UTR des MUC5AC-Gens wurde durch PCR amplifiziert, in einen Reportervektor kloniert und mit pre-miR-193a-3p bzw. Kontroll-miR in HEK293-Zellen transfiziert; die Luciferaseaktivität wurde luminometrisch quantifiziert. A549-Zellen wurden mit pre-miR-193a-3p transfiziert, und nach 24 h wurde die MUC5AC-mRNA-Expression mittels qPCR gemessen. Zudem wurden A549-Zellen mit 20µM TNF-α stimuliert (24 h), und MUC5AC-mRNA sowie miR-193a-3p wurden durch qPCR bestimmt. Statistische Analysen erfolgten mittels t- bzw. Mann-Whitney-U-Tests.

Ergebnisse

Knock-down von Dicer (-61±8%, p<0.001, n=5) führte zu einer signifikanten Erhöhung der mRNA von MUC5AC (35±6%, p=0.006), weshalb im Folgenden auf die Identifizierung regulierender miRs fokussiert wurde. Die in A549-Zellen exprimierte MUC5AC-mRNA-Sequenz konnte vollständig ermittelt werden (Abb. 1): Die mRNA wird sowohl aus dem

Abbildung 2



MUC5AC mRNA-Expression in A549-Zellen nach Transfektion von pre-miR-193a-3p; C, Kontroll-miR (n=6).

MUC5AC- als auch aus dem vorderen Teil des MUC5AC-like-Genlocus unter Herauspleißen eines dazwischenliegenden Introns gebildet; ein etwa in der Hälfte des MUC5AC-like-Sequenz gelegenes Stop-Codon führt zur Expression eines ca. 2100 bp langen 3'-UTRs, der – wie durch bioinformatische Methoden ermittelt – 3 mögliche Bindungsstellen der miR-193a-3p enthalten könnte. A549-Zellen zeigten nach Transfektion von pre-miR-193a-3p eine um 70% verminderte Expression von MUC5AC (Abb. 2). Die direkte Regulation durch miR-193a-3p konnte mittels Reportergen-Assay bestätigt werden (n=6; Reduktion Luciferase vs. Kontrolle 30±2.7%, p<0.001). Nach TNF-α-Stimulation von A549-Zellen wurde eine starke Abnahme der MUC5AC-Expression gefunden (-69±5.7%, p<0.01, n=6), während miR-193a-3p deutlich induziert war (74±5.6%, p<0.01).

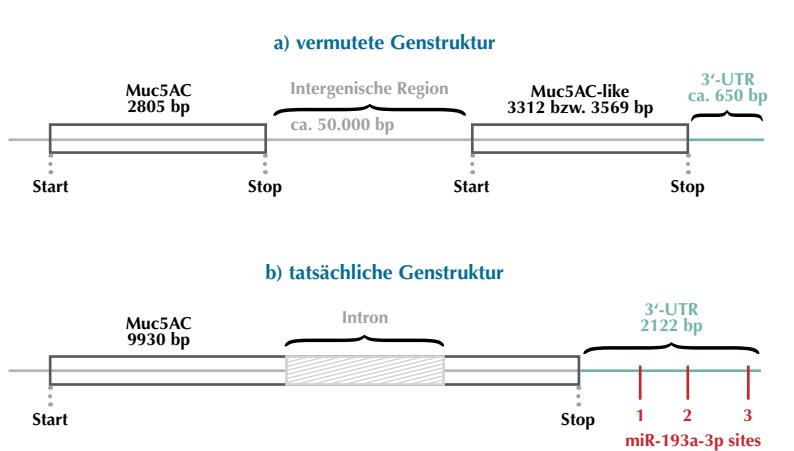
Interpretation

Da die pulmonale Inflammation verstärkende MUC5AC wird posttranskriptionell durch miR-193a-3p reguliert; Induktion dieser miR führt zu einer Suppression der MUC5AC-Expression. miR-193a-3p könnte von therapeutischem Nutzen zur Verminderung der MUC5AC-Expression bei pulmonaler Inflammation sein.

Literatur

1. Knowles MR, Boucher RC: Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. *J Clin Invest* Mar 2002; 109(5):571-577
2. Thornton DJ, Rousseau K, McGuckin MA: Structure and function of the polymeric mucins in airways mucus. *Annu Rev Physiol* 2008;70:459-486
3. Koeppen M, McNamee EN, Brodsky KS, et al: Detrimental role of the airway mucin MUC5ac during ventilator-induced lung injury. *Mucosal Immunology* Nov 28 2012.

Abbildung 1



Genstruktur von MUC5AC in A549-Zellen; a) aus Datenbankrecherchen abgeleitet, b) experimentell ermittelt.

Die Rolle epithelialer Adora2b-Adenosinrezeptoren in einem Mausmodell des akuten Lungenschadens

S. Högl^{1,2} · K. S. Brodsky¹ · B. Zwölfer² · H. K. Eltzschig¹

1 Department of Anesthesiology, University of Colorado, Aurora (USA)

2 Klinik für Anaesthesiologie, LMU München

Korrespondenz:

Sandra.Hoegl@med.uni-muenchen.de

Fragestellung

Invasive Beatmung kann beim kritisch Kranken eine vorbestehende pulmonale Entzündungsreaktion agravieren und zum akuten Lungenschaden (ALI) führen. Durch Aktivierung endogener Signalwege kann sich die Lunge vor einer überschließenden, inflammatorischen Reaktion schützen. Hierbei scheint extrazelluläres Adenosin über Bindung an spezifische Adenosinrezeptoren eine wichtige Rolle zu spielen [1,2]. In einem kombinierten Modell des LPS- und beatmungsinduzierten

Lungenschadens untersuchten wir die Hypothese, dass insbesondere die Aktivierung von A2B-Rezeptoren lungenprotektiv wirkt.

Methodik

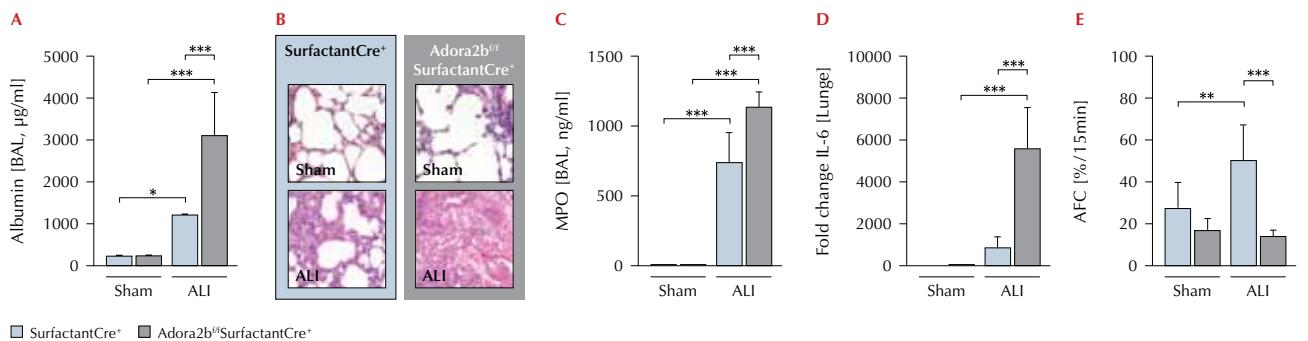
Alle Tierversuche wurden durch die zuständigen Behörden genehmigt. Zunächst erhielten die Mäuse LPS intratracheal (3,75 mg/kg), nach 24 h erfolgte nach Tracheotomie die 180-minütige druckkontrollierte Beatmung zur Induktion eines Lungenschadens (VILI; p_{max} : 35 mbar, PEEP: 3 mbar, AF: 95/min, FiO_2 : 100%) [3]. Die Shamgruppe erhielt PBS intratracheal und wurde mit einem Spitzendruck von 15 mbar beatmet (AF: 110/min). Folgende Mauslinien wurden verwendet (n=5-6): Ganzkörper-Knockout des A2B-Rezeptors (Adora2b^{-/-}), gewebespezifische A2B-Rezeptor defiziente Mäuse mit Deletion von Adora2b in der myeloischen Zellreihe (Adora2b^{fl/fl}LysozymeCre⁺), in Endothelzellen (Adora2b^{fl/fl}CadherinCre⁺), bzw. Epithelzellen (Adora2b^{fl/fl}SurfactantCre⁺). Mäuse mit dem passenden genetischen Hintergrund dienten als Kontrolle. Um die therapeutische Aktivie-

zung von pulmonalen Adora2b-Rezeptoren zu untersuchen, applizierten wir C57/BL6-Mäusen während der VILI-Induktion einen spezifischen Adora2b-Agonisten (BAY 60-6583, 1 mg/kg) mittels Ultraschallverneblers. Zur Quantifizierung des Lungenschadens wurden histologische Veränderungen im Lungengewebe untersucht sowie der Albumingehalt in der BAL bestimmt. Transkriptionelle Veränderungen wurden mittels RT-PCR, Änderungen auf Proteinebene mittels ELISA analysiert. Des Weiteren wurde die alveolare Flüssigkeitsclearance (AFC) nach Instillation von 300 µl iso-osmolarer 0.9% NaCl Lösung mit 5% BSA am Versuchsende bestimmt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweifaktorieller Varianzanalyse und Post-Hoc-Tests mit Bonferroni Korrektur, * p<0,05, Ergebnisse als Mittelwert (Standardabweichung).

Ergebnisse

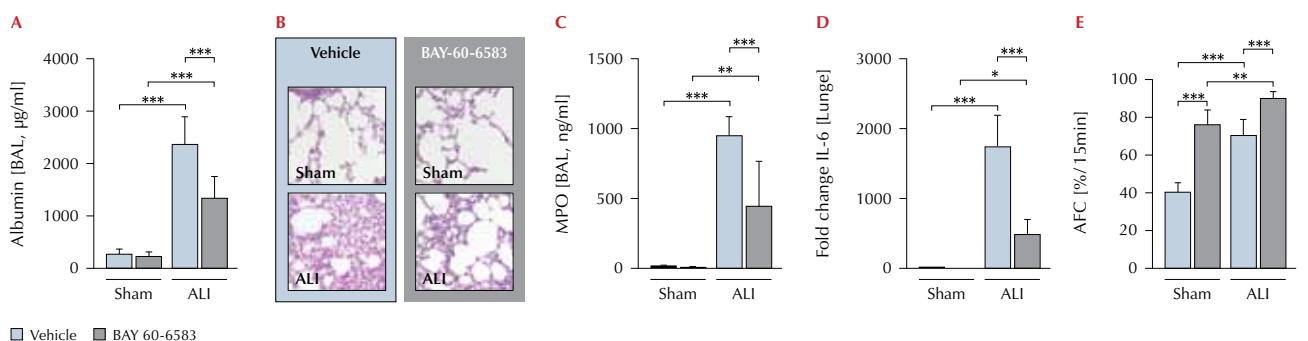
Adora2b^{-/-}-Mäuse zeigen nach ALI im Vergleich zu C57/BL6-Mäusen ausgeprägtere pulmonale Schäden und eine erhöhte Durch-

Abbildung 1



Epitheliale Adora2b-Deletion agraviert ALI. A) Albuminkonzentration (ELISA, BAL). B) Repräsentative histologische Lungenschnitte, 10x. C) MPO-Konzentration (ELISA, BAL). D) RT-PCR gegen IL-6 (Lungengewebe). E) Alveolare Flüssigkeitsclearance (in % des instillierten Volumens).

Abbildung 2



Inhalative Applikation des Adora2b-Agonisten BAY 60-6583 schützt vor ALI. A) Albuminkonzentration (ELISA, BAL). B) Repräsentative histologische Lungenschnitte, 10x. C) MPO-Konzentration (ELISA, BAL). D) RT-PCR gegen IL-6 (Lungengewebe). E) Alveolare Flüssigkeitsclearance (in % des instillierten Volumens).

lässigkeit der alveolo-kapillären Barriere (Albumin (BAL): 1891 [549] vs. 818 [121] $\mu\text{g}/\text{ml}$, $p<0,05$). Im direkten Vergleich des gewebespezifischen Knockouts zeigt nur die epitheliale Adora2b-Deletion einen entsprechenden Phänotyp mit Verstärkung des Lungenschadens. Die Myeloperoxidase-Konzentration (MPO), als Surrogatparameter für die Anzahl neutrophiler Granulozyten in der BAL, ist bei den Adora2b^{fl/fl}/SurfactantCre⁺-Mäusen signifikant erhöht, ebenso wie die pulmonale mRNA-Expression inflammatorischer Zytokine. Des Weiteren ist der Flüssigkeitstransport über die Zellmembran gestört (Abb. 1).

Antagonisierung des Thrombin-inhibitors Dabigatran in supratherapeutischer Dosis in einem Polytraumamodell beim Schwein

M. Honickel¹ · J. van Ryn² · HMH. Spronk³ · H. ten Cate³ · R. Rossaint¹ · O. Grottké¹

1. Klinik für Anästhesiologie, Universitätsklinikum der RWTH Aachen
2. CardioMetabolic Diseases Research, Boehringer Ingelheim GmbH & Co. KG, Biberach
3. Laboratory for Clinical Thrombosis and Haemostasis, Department of Internal Medicine, Cardiovascular Research Institute Maastricht, Maastricht University Medical Center, Maastricht (Niederlande)

Korrespondenz: mhonickel@ukaachen.de

Fragestellung

Die Antagonisierung der neuen Antikoagulantien (NOAC) im akuten Blutungsnotfall bzw. im Rahmen von Massivblutungen bei polytraumatisierten Patienten ist eine besondere klinische Herausforderung. Widersprüchliche Ergebnisse der Therapie mit Prothrombinkomplexkonzentrat (PPSB) zur Terminierung der antikoagulatorischen Wirkung von Dabigatran wurden publiziert [1,2,3]. Systematische prospektive Studien in relevanten Traumamodellen sind ausständig. Mit der vorliegenden Studie wurde die Effektivität eines PPSB-Präparates zur möglichen Reduktion eines massiven Blutverlusts nach Polytrauma bei Dabigatran-antikoagulierten Schweinen untersucht.

Methodik

Nach Genehmigung durch die zuständige Behörde wurde 24 männlichen Schweinen Dabigatranetexilat (30 mg/kg bid PO) über 3 Tage verabreicht. Am Versuchstag wurde den narkotisierten Tieren vor der Induktion der Traumata und chirurgischer Präparation zusätzlich Dabigatran infundiert, um supratherapeutische und konstante Plasmakonzentra-

Demgegenüber verbessert die Inhalation von BAY 60-6583 die AFC, auch das pulmonale Ödem und der beatmungsinduzierte Lungenschaden sowie die pulmonale Inflammation sind vermindert (Abb. 2).

Interpretation

Zusammenfassend weist die Studie auf die lungenprotektive Bedeutung des alveolarepithelialen Adora2b-Signalwegs hin, u.a. durch Erhöhung der alveolären Flüssigkeitsclearance. Die Inhalation von Adora2b-Agonisten könnte eine geeignete Therapieoption beim akuten Lungenschaden sein.

tionen zu erreichen. Fünfzehn Minuten nach der Induktion bilateraler Femurschaftfrakturen und einer standardisierten Leberverletzung erfolgte die randomisierte Applikation der Studienmedikation PPSB (PPSB: 25, 50 oder 100 IE/kg; $n=6$) oder einer kristalloiden Lösung (Placebo; $n=6$). Als primärer Endpunkt diente der posttraumatische Blutverlust. Zusätzlich wurden verschiedene Gerinnungsparameter (PT, aPTT, ACT, Thromboelastometrie u.a.) sowie die Dabigatrankonzentration mit dem Hemoclot®-Assay zu definierten Zeitpunkten über den Observationszeitraum (300 min) gemessen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweifacher Varianzanalyse (Mittelwert \pm Standardfehler).

Ergebnisse

Die plasmatische Dabigatrankonzentration war zwischen den Gruppen vor der Induktion der Traumata vergleichbar (Kontrolle: $514 \pm 56 \text{ ng}/\text{dl}$, PPSB 25: $556 \pm 57 \text{ ng}/\text{dl}$, PPSB 50: $536 \pm 80 \text{ ng}/\text{dl}$, PPSB 100: $752 \pm 95 \text{ ng}/\text{dl}$; $p > 0.05$). Die Infusion von Dabigatran führte zu einer Prolongierung der Gerinnungsbildungszeiten (CT: $615 \pm 50 \text{ sek}$; CFT: $423 \pm 67 \text{ sek}$) sowie zu einer Alterierung der PT ($19 \pm 2 \text{ sek}$). Die Alterierung der Gerinnungsparameter wurde durch den traumabedingten Blutverlust agraviert. Die verzögerte Initiierung der Blutgerinnung konnte durch die Therapie mit PPSB unmittelbar nach der Applikation dosisabhängig korrigiert werden. Die dosisabhängige Gerinnungsaktivierung nach PPSB-Applikation konnte anhand erhöhter TAT-Konzentrationen nachgewiesen werden. Allerdings war die Therapie mit 100 IE/kg PPSB mit einer sekundären Hyperfibrinolyse (D-Dimere: $> 150.000 \text{ ng}/\text{ml}$) assoziiert. Der posttraumatische Blutverlust war bei allen Gruppen nach 10 min vergleichbar ($794 \pm 10,6 \text{ ml}$). Im weiteren war der posttraumatische Gesamtblutverlust in der Kontrollgruppe am höchsten ($3774 \pm 257 \text{ mL}$). Die Mortalität in der Kontrollgruppe war 100% mit einer medianen Überlebenszeit von 106 min (65-146

Literatur

1. Eckle T, Grenz A, Laucher S, Eltzschig HK: A2B adenosine receptor signaling attenuates acute lung injury by enhancing alveolar fluid clearance in mice. *J Clin Invest* 2008;118: 3301-15
2. Schingnitz U, Hartmann K, Macmanus CF, Eckle T, Zug S, Colgan SP, Eltzschig HK: Signaling through the A2B adenosine receptor dampens endotoxin-induced acute lung injury. *J Immunol* 2010;184:5271-9
3. Eckle T, Fullbier L, Grenz A, Eltzschig HK: Usefulness of pressure-controlled ventilation at high inspiratory pressures to induce acute lung injury in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008;295:L718-24.

min). Demgegenüber konnte der Blutverlust durch die Therapie mit PPSB dosisabhängig signifikant reduziert werden (PPSB 25: $3679 \pm 319 \text{ mL}$, PPSB 50: $1767 \pm 55 \text{ mL}$; PPSB 100: $1784 \pm 103 \text{ mL}$). In der PPSB 25-Gruppe verstarben 83 % der Tiere vor Studienende. Alle Tiere der PPSB 50- und PPSB 100-Gruppe überlebten den Beobachtungszeitraum.

Interpretation

Die Ergebnisse dieser Studien zeigen, dass die frühzeitige Applikation von PPSB zur Behandlung einer Trauma- und Dabigatran-induzierten Blutung sinnvoll sein kann. Als Voraussetzung für eine ausreichende Antagonisierung der antikoagulatorischen Wirkung von Dabigatran im Sinne eines stöchiometrischen Überwiegens von Thrombin sind allerdings hohe plasmatische Konzentrationen von Prothrombin erforderlich. Im Rahmen der hämostatischen Therapie mit PPSB und der eingeschränkten Steuerbarkeit besteht allerdings die Gefahr einer erhöhten Gerinnungsaktivierung mit sekundärer Hyperfibrinolyse.

Interessenkonflikt

Diese Studie wurde gefördert von der Boehringer Ingelheim Pharma GmbH und Co. KG.

Literatur

1. Herrmann R, Thom J, Wood A, et al: Thrombin generation using the calibrated automated thrombinoscope to assess reversibility of dabigatran and rivaroxaban. *Thromb Haemost* 2014;111:989-95
2. Grottké O, van Ryn J, Spronk HM, et al: Prothrombin complex concentrate and a specific antidote to dabigatran are effective ex-vivo in reversing the effects of dabigatran in an anticoagulation/liver trauma experimental model. *Crit Care* 2014;18:R27
3. Eerenberg ES, Kamphuisen PW, Sijpkens MK et al: Reversal of rivaroxaban and dabigatran by prothrombin complex concentrate: a randomized, placebo-controlled, crossover study in healthy subjects. *Circulation* 2011;124:1573-9.

HIF2 α -abhängige Induktion von Amphiregulin vermittelt Kardio- protektion während muriner myo- kardialer Ischämie-Reperfusions

M. Köppen¹ · S.-W. Seo² · T. Eckle² · V. van der Heide¹ · S. Kreth¹ · H. K. Eltzschig²

1 Klinik für Anaesthesiologie, Ludwig-Maximilians-Universität München

2 Department of Anesthesiology, Organ Protection Program, University of Colorado, Anschutz Medical Campus, Aurora (USA)

Korrespondenz:

michael.koeppen@med.uni-muenchen.de

Fragestellung

Akute Myokardischämie verursacht durch den Abfall des Sauerstoffgehalts eine Stabilisierung des Transkriptionsfaktors Hypoxie-induzierter Faktor (HIF) [1]. Von HIF existieren zwei Isoformen: HIF1 α und HIF2 α . Während zahlreiche Studien die kardioprotektive Rolle von HIF1 α belegen, ist über die Rolle von HIF2 α nur wenig bekannt. In der vorliegenden Studie überprüften wir die Hypothese, dass auch die Stabilisierung von HIF2 α den Ischämie-Reperfusionschaden im Myokard vermindert.

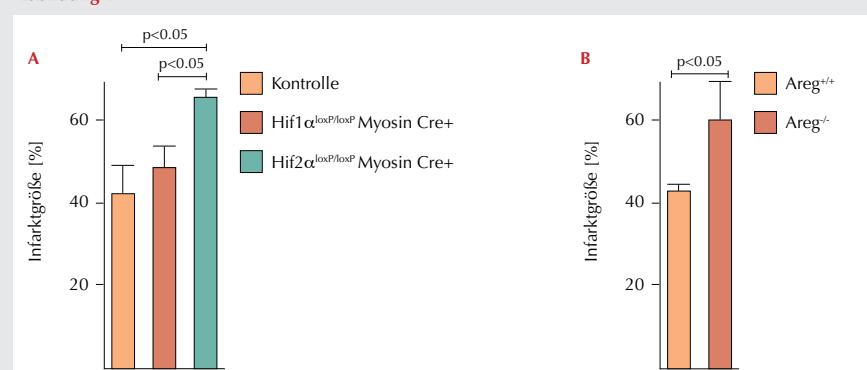
Methodik

Alle Tierversuche wurden durch die zuständigen Behörden genehmigt. Für die vorliegende Untersuchung stellten wir induzierbare, kardiomyozytäre HIF1 α - und HIF2 α -defiziente Mäuse her (MyosinCre/Hif1 α ^{loxP} und MyosinCre/Hif2 α ^{loxP}). Des Weiteren wurden Mäuse mit Deletion des epithelialen Wachstumsfaktors Amphiregulin AREG (Areg^{-/-}) untersucht. Die Tiere wurden einer myokardialen Ischämie-Reperfusion mit 60 min Okklusion der linken Koronararterie und 120 min Reperfusion unterzogen [2]. Die Versuchs- und die Kontrollgruppen waren hinsichtlich Alter, Geschlecht und Gewicht angeglichen. Relative transkriptionelle Änderungen wurden zum einen mittels Microarray zum anderen mit RT-PCR untersucht [3]. Änderungen auf Proteinebene wurden mittels Western Blot bzw. ELISA bestimmt. Daten wurden als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben. Unterschiede zwischen den Gruppen wurden entweder mittels t-Tests oder mittels ANOVA verglichen; ein p-Wert unter 0,05 wurde als statistisch signifikant angenommen.

Ergebnisse

Die Infarktareale der kardiomyozytären HIF2 α -defizienten Mäuse (66 \pm 3%) waren im direkten Vergleich mit den kardiomyozytären HIF1 α -defizienten Mäusen (49 \pm 5%) und den Kontrolltieren (42 \pm 7%) am größten (Abb. 1A; n=5; p<0,05). Gleichzeitig betragen

Abbildung 1



Infarktgrößen der verwendeten Genotypen.

Die Mäuse wurden 60 min Ischämie, gefolgt von 120 min Reperfusion unterzogen. (A) Vergleich der Infarktgrößen der HIF-defizienten Genotypen; (B) Infarktgrößen von Areg^{-/-} im Vergleich zu Areg^{+/+}

die Troponin-I-Werte im Serum der HIF2 α -defizienten Mäuse 265 \pm 51 ng/ml, die der Kontrollgruppe von 52 \pm 12 auf (n=5; p<0,05). Um spezifische HIF2 α -abhängige Gene zu identifizieren, die diesen kardioprotektiven Effekt vermittelten könnten, unterzogen wir daraufhin RNA von MyosinCre/Hif2 α ^{loxP}-Mäusen einem Microarray (n=4 pro Gruppe). Das am stärksten differentiell regulierte Gen war AREG. Nach akuter Myokardischämie nahm das AREG-Transkript in der RT-PCR bei Kontrolltieren 65 \pm 17-fach zu, bei MyosinCre/Hif2 α ^{loxP}-Mäusen 18 \pm 13-fach (p<0,001; n=5); dies zeigte sich auch auf Proteinebene. In vitro bewirkte Hypoxie (18 Stunden bei 1% Sauerstoff) in humanen Kardiomyozyten einen 4,8 \pm 1,5-fachen Anstieg des AREG-Transkriptes.

Dieser Anstieg fehlte in HIF2 α -defizienten Zellen (n=3; p<0,05). Die kardioprotektiven Eigenschaften von AREG untersuchten wir, indem Areg^{-/-}-Mäuse der akuten Myokardischämie unterzogen wurden: AREG-defiziente Tiere wiesen 60 \pm 10% große Infarktareale auf, Areg^{+/+}-Mäuse hatten Infarktgrößen von 44 \pm 2% (Abb. 1B; n=4; p<0,05). Die exogene Gabe von rekombinantem AREG verkleinerte die Infarktgrößen im Vergleich zu den mit Trägerlösung behandelten Tieren von 40 \pm 9 auf 18 \pm 4% (n=5, p<0,05). Auch war rekombinantes AREG in der Lage, die initial großen Infarktareale in kardiomyozytären HIF2 α -defizienten Mäusen von 61 \pm 4% auf 23 \pm 5% zu reduzieren (n=4; p<0,05). Umgekehrt vergrößerte die pharmakologische Blockade des AREG-Rezeptors Epithelial Growth Factor Receptor (EGFR) die Infarktgrößen von 49 \pm 9 auf 74 \pm 10% (n=4; p<0,05).

Interpretation

Die vorliegenden Untersuchungen weisen auf eine kardioprotektive Rolle von HIF2 α bei

myokardialer Ischämie-Reperfusions hin. Die kardioprotektive Wirkung scheint HIF2 α dabei in erheblichem Maße über die Induktion von AREG zu vermitteln sowohl in murinen als auch in humanen Zellen.

Literatur

- Koeppen M, Eckle T, Eltzschig HK: The hypoxia-inflammation link and potential drug targets. *Curr Opin Anaesthesiol* 2011
- 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;116:124557
- 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* 2013;6:76275.

Einfluss von zellfreier DNA auf den funktionellen und histologischen Schaden eines experimentellen Schädel-Hirn-Traumas bei Mäusen

T. J. Krämer · P. Hübener · B. Pöttker · K. Engelhard · C. Werner · S. C. Thal

Klinik für Anästhesiologie, Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Korrespondenz: kraemet@uni-mainz.de

Fragestellung

In mehreren Studien konnten prokoagulatorische Effekte [1] sowie eine erhöhte Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke (BHS) unter dem Einfluss erhöhter Konzentrationen von freien Nukleinsäuren im Plasma nachgewiesen werden [2]. Während der Primärschaden nach Schädel-Hirn-Trauma (SHT) keiner Therapie zugänglich ist, beschreibt der sekundäre Hirnschaden die Expansion des strukturellen Hirnschadens nach dem primären Trauma und entsteht durch Hirnschwellung, Gefäßverschlüsse, Immunreaktionen, exzessive Freisetzung exzitatorischer Neurotransmitter und weitere bisher nicht aufgeklärte pathophysiologische Mechanismen. Hierdurch gelangen verstärkt freie Nukleinsäuren in die Blutzirkulation. Die Menge an zellfreier DNA im Plasma konnte bei Patienten mit schwerem SHT bereits als prädiktiver Marker für eine erhöhte Mortalität identifiziert werden [3]. Die Beeinflussung der freien Nukleinsäure im Plasma könnte deshalb ein interessantes Therapieziel zur Beeinflussung des sekundären Hirnschadens darstellen. In der vorliegenden Studie wird der Einfluss einer Behandlung mit DNase nach einem experimentellen SHT untersucht. Hiermit soll die Plasmakonzentration zellfreier DNA minimiert werden. Das Ziel ist eine verbesserte motorische und sensorische Funktion sowie ein geringeres Läsionsvolumen aufgrund einer optimierten Gerinnung und Protektion der BHS.

Methodik

Nach Genehmigung des Landesuntersuchungsamtes Koblenz wird das Controlled-Cortical-Impact (CCI)-Modell für das SHT verwendet. Als Versuchstiere werden 10 Wochen alte männliche C57BL/6-Mäuse genutzt. Unter Allgemeinanästhesie mit Midazolam, Fentanyl und Medetomidin (intraperitoneal) wird der Schädel eröffnet und eine Hirnläsion durch Beschleunigung eines elektromagnetischen Bolzens in den rechten Kortex der Mäuse induziert. Die Tiere werden mit DNase (Dornase alpha, Pulmozyme®) intraperitoneal 30 Minuten und 12 Stunden nach dem Trauma behandelt. Es gibt 3 Gruppen: „Niedrigdosis“ DNase (2 x 50 µg, n=7), „Hochdosis“ DNase (2 x 450 µg, n=8) sowie eine „Vehikel“-Gruppe, welche nur Trägerlösung ohne Wirkstoff erhält (2 x 500 µl NaCl 0.9%, n=9). 24 Stunden nach Trauma wird eine funktionelle Testung mittels „Neuro-Deficit-Score“ und eine retroorbitale Blutentnahme zur Bestimmung der freien DNA durchgeführt sowie das Gehirn zur histologischen Bestimmung des Kontusionsvolumens entnommen. Die statistische Auswertung erfolgt mit einem Mann-Whitney-Rang-Summen-Test und ggf. Bonferroni-Holms-Korrektur.

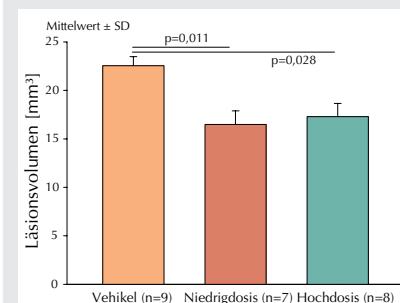
Ergebnisse

Bei der histologischen Bestimmung des Kontusionsvolumens stellt sich ein signifikant kleinerer Schaden der Niedrigdosisgruppe ($p<0,05$), sowie der Hochdosisgruppe ($p<0,05$) gegenüber der Vehikelgruppe dar (Niedrigdosis: $16,5 \pm 3,7 \text{ mm}^3$, Hochdosis: $17,3 \pm 3,9 \text{ mm}^3$, Vehikel: $22,5 \pm 2,9 \text{ mm}^3$, Abb. 1). Bei der funktionellen Testung kann kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Gruppen detektiert werden ($p>0,05$, Niedrigdosis: $4,6 \pm 1,6$ Punkte, Hochdosis: $5,2 \pm 2,3$ Punkte, Vehikel: $4,8 \pm 2,2$ Punkte).

Interpretation

Durch die Gabe von DNase kann effektiv der sekundäre Hirnschaden verhindert werden.

Abbildung 1



Läsionsvolumen 24 Stunden nach CCI.

Nach einem SHT kommt es zu einer posttraumatischen Hyperkoagulation. Die Behandlung könnte zu einer verminderten Thrombus-Formation führen und die Integrität der BHS stärken. Die Hochdosisgruppe schneidet bei den durchgeführten Tests nicht besser ab als die Niedrigdosisgruppe. Die gewählte niedrige Dosierung liegt damit bereits innerhalb der therapeutischen Breite des Wirkstoffes. Der geminderte strukturelle Schaden nach 24h lässt darauf schließen, dass eine Behandlung mit DNase eine therapeutische Option nach einem SHT darstellen könnte.

Literatur

1. Kannemeier C, Shibamiya A, Nakazawa F, Trusheim H, Ruppert C, Markart P, et al: Extracellular RNA constitutes a natural procoagulant cofactor in blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007 Apr 10;104(15):6388-93
2. Fischer S, Gerriets T, Wessels C, Walberer M, Kostin S, Stolz E, et al: Extracellular RNA mediates endothelial-cell permeability via vascular endothelial growth factor. *Blood* 2007;110:2457-2465
3. Macher H, Egea-Guerrero J, Revuelto-Rey J, Gordillo-Escobar E, Enamorado-Enamorado J, Boza A, et al: Role of early cell-free DNA levels decrease as a predictive marker of fatal outcome after severe traumatic brain injury. *Clin Chim Acta* 2012 Dec 24;414:12-7.

Hyperoxie induziert eine Steigerung der Barriere in einem humanen In-vitro-Modell des Lungenalveolarepithels

J. Küstermann¹ · D. Bauer¹ · A. Neuhoff¹ · N. Roewer¹ · R.M. Muellenbach¹ · W. Neuhaus^{1,2}
 1 Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie der Universität Würzburg
 2 Department für medizinische/pharmazeutische Chemie, Universität Wien (Österreich)

Korrespondenz: winfried.neuhaus@univie.ac.at

Fragestellung

Im Gegensatz zu Tierexperimenten gibt es beim Menschen gegenwärtig wenig Evidenz, dass Hyperoxie zur Verschlechterung oder Auslösung eines akuten Lungenversagens führt [1,2]. In der vorliegenden Studie haben wir den Einfluss von Hyperoxie (100% O₂-Sättigung) auf die funktionelle und molekulare Veränderung der Barrierefunktion eines humanen In-vitro-Modells des Alveolarepithels untersucht und das Potential einer Therapie der Hyperoxie-induzierten Veränderungen mit Dexamethason (DEX) überprüft.

Methodik

Es wurde ein Transwell-Zellkulturmödell basierend auf der humanen Zelllinie NCI-H441 verwendet. Dieses Modell zeichnet sich neben der Ausbildung einer dichten parazellulären Barriere durch das Vorhandensein von Zelltypen aus, die entweder Marker von Alveolar Typ I (AT-I)-Zellen wie Caveolin-1 (Cav-1) oder Marker von Alveolar Typ II (AT-II)-Zellen wie Surfactant Protein-B (SP-B) exprimieren [3]. Die Untersuchungen wurden in einer selbst konstruierten Hyperoxiekammer durchgeführt. Die Zellviabilität wurde mittels Zellproliferationstests (EZ4U) untersucht. Als Inflammationsmarker wurde Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP-1) auf mRNA-

Ebene mittels quantitativer PCR (qPCR) betrachtet. Als Maß für die parazelluläre Barriere des Modells wurde der transepitheliale elektrische Widerstand (TEER) gemessen und die Permeabilität von Fluoreszein bestimmt. Molekulare Untersuchungen von Tight-Junction-Proteinen (Claudin-1, -3, -4, -5, -7, -18, Occludin, ZO-1), AT-I- und -II-Markern (Cav-1, SP-B), Arzneistofftransportern (ABCC1, ABCC4, ABCG2) und MAP-Kinasen (ERK1/2) wurden mittels qPCR, Western Blotting sowie Immunfluoreszenzmikroskopie durchgeführt. DEX wurde in einer Konzentration von 100 nM eingesetzt. Alle Ergebnisse wurden auf die Kontrolle (21% O₂) ohne DEX bezogen und als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben. Signifikanz der Ergebnisse wurde bei p<0,05 (Student's t-Test) angenommen.

Ergebnisse

Die deutlichsten Unterschiede zwischen Normoxie und Hyperoxie wurden nach 48 Stunden Behandlung gemessen. Die Zellviabilität sank signifikant auf 70,46 ± 11,60% (n=24-30), die Expression des Inflammationsmarkers MCP-1 wurde auf das 2,15 ± 0,54-fache signifikant erhöht (Abb.1A, n=6). DEX-Zusatz hatte keinen Einfluss auf die Zellviabilität nach Hyperoxie, wogegen MCP-1 auf das 0,68 ± 0,31-fache herunterreguliert wurde. Hyperoxie erhöhte den TEER signifikant (160,69 ± 36,33%), wobei die Behandlung mit DEX den Anstieg unter Hyperoxie auf 135,21 ± 34,83% (n=6) abschwächte (Abb.1B). Die Fluoreszeinpermeabilität unter Hyperoxie nahm entsprechend dem gesteigerten TEER ab. Die Regulation von Cav-1 ergab keine signifikanten Unterschiede, SP-B zeigte die bereits bekannte, Dexamethason-abhängige Regulation ohne signifikanten Einfluss der Hyperoxie.

Die Analyse der Tight-Junction-Proteine zeigte, dass die Expression von Claudin-5 dem TEER- und Fluoreszeinpermeabilitätsverlauf

entsprach (Abb.1C). Die mRNA-Daten wurden durch Western Blotting und Immunfluoreszenzmikroskopie auf der Proteinebene bestätigt. Zusätzlich regulierte die Hyperoxiebehandlung die Arzneistofftransporter ABCC1 (DEX-abhängig) auf das 1,55-fache und ABCG2 (DEX-unabhängig) auf das 1,40-fache hinauf. Des Weiteren konnte der Zusatz von DEX die verstärkte Phosphorylierung von MAP-Kinasen (ERK1/2) – ähnlich wie die Expression von MCP-1 – reduzieren.

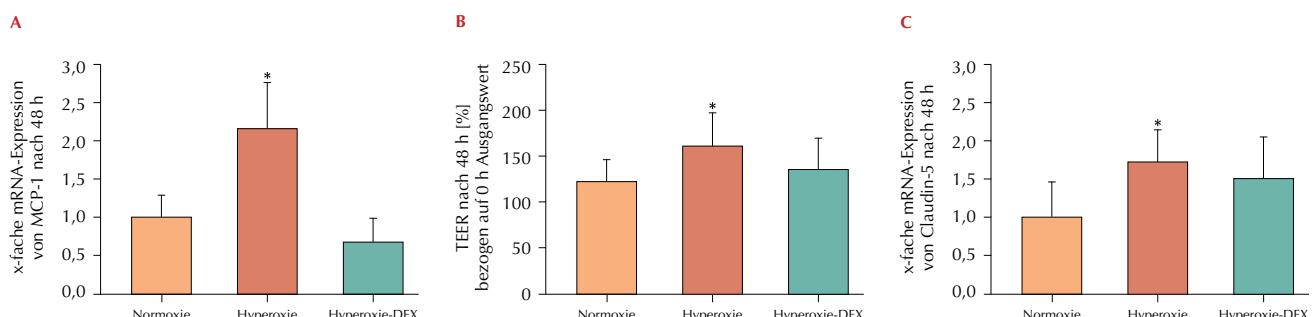
Interpretation

Es kam in unserer Studie erwartungsgemäß zu einer signifikanten Reduktion der Zellviabilität sowie zum Anstieg der Inflammation unter hyperoxischen Bedingungen. Für die zum ersten Mal gezeigte Steigerung der parazellulären Barriere scheint die verstärkte Expression von bestimmten Tight-Junction-Proteinen wie Claudin-5 verantwortlich zu sein. Dexamethason führt zu einer Hemmung der Inflammation und stabilisiert zudem die Barriere durch Blockierung der Hyperoxie-induzierten Effekte. Die möglichen pulmonalen Auswirkungen einer gesteigerten parazellulären Barriere und hochregulierter Arzneistofftransporter durch Hyperoxie müssen in weiteren Studien aufgeklärt werden.

Literatur

1. Pagano A, Barazzzone-Argiroffo C: Alveolar cell death in hyperoxia-induced lung injury. Ann N Y Acad Sci 2003;1010:405-16
2. Kallet RH, Matthay MA: Hyperoxic acute lung injury. Respir Care 2013;58:123-41
3. Neuhaus W, Samwer F, Kunzmann S, et al: Lung endothelial cells strengthen, but brain endothelial cells weaken barrier properties of a human alveolar epithelium cell culture model. Differentiation 2012;84:294-304.

Abbildung 1



Einfluss von 48h Hyperoxie auf MCP-1 Expression (A), TEER (B) und Claudin-5-Expression (C).

* p<0,05 vs. Normoxie.

TIMP-2 und IGFBP7 als Biomarker zur Früherkennung der akuten Nierenschädigung und der Erholung der Nierenfunktion nach herzchirurgischen Eingriffen

M. Meersch¹ · C. Schmidt¹ · H. Van Aken¹ ·

S. Martens² · J. Rossaint¹ · K. Singbartl³ ·

D. Görlich⁴ · J. Kellum⁵ · A. Zarbock¹

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

2 Klinik für Herzchirurgie, Universitätsklinikum Münster

3 Klinik für Anästhesiologie, Penn State College of Medicine, Pennsylvania (USA)

4 Institut für Biometrie und klinische Forschung, Universität Münster

5 Department of Critical Care Medicine, University of Pittsburgh (USA)

Korrespondenz: meersch@googlemail.com

Fragestellung

Die akute Nierenschädigung (AKI) ist eine häufige und schwerwiegende Komplikation nach herzchirurgischen Eingriffen [1]. Die Inzidenz ist besonders bei Patienten mit vorbestehender Nierenschädigung oder nach komplexeren kardiochirurgischen Eingriffen erhöht. Die Mortalitätsrate bei herzchirurgischen Patienten mit AKI beträgt bis zu 60%. Die KDIGO-Kriterien definieren das AKI über einen Anstieg des Serumkreatininwertes und/oder Abfall der Urinausscheidung. Nach herzchirurgischer Operation werden beide Parameter durch verschiedene Faktoren beeinflusst und sind daher wenig geeignet, um ein AKI in diesem Patientenkollektiv frühzeitig zu identifizieren. Die bisher verfügbaren Biomarker haben eine geringe Sensitivität und Spezifität und sind daher nicht für die frühzeitige Diagnose eines AKI nach herzchirurgischen Eingriffen geeignet [2]. In dieser Studie haben wir bei Hochrisikopatienten untersucht, ob die beiden Biomarker Tissue Inhibitor Metalloproteinases (TIMP-2) und Insulin-like Growth Factor Binding Protein (IGFBP7) im Urin die Entstehung eines AKI und die renale Erholung nach einem herzchirurgischen Eingriff vorhersagen können [3].

Methodik

Die Poweranalyse für eine Differenz von 1 Einheit [TIMP-2]*[IGFBP7] und einer Power von 90% ergab eine Stichprobengröße von 26 Patienten pro Gruppe. Es wurden insgesamt 321 herzchirurgische Patienten gescreent, davon konnten 52 mit einem hohen Risiko für die Entwicklung eines postoperativen AKI (Cleveland Score ≥ 6) eingeschlossen werden. Ausschlußkriterien waren 1.) Schwangerschaft, 2.) vorhergegangene Nierentransplantation, 3.) immunsuppressive Therapie. Zu definierten Zeitpunkten wurden die Konzentrationen

von TIMP-2*IGFBP7 (NephroCheck®-Test, As-
tute), NGAL sowie Kreatinin im Blut und Urin und das Urinvolumen bestimmt. Primäres Zielkriterium der Studie war die Erfassung der Inzidenz des AKI nach KDIGO-Kriterien. Zusätzlich untersuchten wir, ob der Verlauf der [TIMP-2]*[IGFBP7]-Konzentrationen im Urin eine Aussage über die Erholung der Nierenfunktion nach AKI zulässt. Die statistischen Analysen wurden mit Hilfe des t-Tests, des Mann-Whitney-U-Tests, des χ^2 -Test und des Fisher's-Exact-Tests durchgeführt. Ein p-Wert $\leq 0,05$ wurde als signifikant angenommen. Um den prädiktiven Wert der Biomarker zu ermitteln, wurden Receiver Operating Characteristic Curves (ROC) berechnet und die Area Under the ROC Curve (AUC) bestimmt. Für bestimmte [TIMP-2]*[IGFBP7]-Grenzwerte wurden die Sensitivitäten, die Spezifitäten, die positiv prädiktiven Werte und die negativ prädiktiven Werte bestimmt.

Ergebnisse

Von den insgesamt 52 eingeschlossenen Patienten konnten nur 50 Patienten analysiert werden, da ein Patient bereits intraoperativ verstarb und ein weiterer Patient aufgrund mangelnder Dokumentation ausgeschlossen werden musste. Die demographischen Daten der Patienten sind in Tabelle 1 dargestellt. 26 der 50 ausgewerteten Patienten (52%) entwickelten im postoperativen Verlauf ein akutes Nierenversagen. Jedoch konnte die Diagnose eines AKI, basierend auf dem Kreatininwert und/oder Urinproduktion, erst 1-3 Tage nach dem herzchirurgischen Eingriff gestellt wer-

den. Im Gegensatz hierzu konnten wir nachweisen, dass die [TIMP-2]*[IGFBP7]-Konzentration bei Patienten, die im weiteren Verlauf ein AKI entwickelten, bereits 4 Stunden nach der Operation anstieg. Bei den Patienten mit AKI stieg die [TIMP-2]*[IGFBP7]-Konzentration von 0,49 präoperativ auf 1,51 (vs. 0,57 ohne AKI) 4h nach Operation an. Die AUC für die maximale [TIMP-2]*[IGFBP7]-Konzentration betrug innerhalb der ersten 24 Stunden nach Operation 0,90. Für einen Cut-off-Wert von 0,5 betrug die Sensitivität 0,92, die Spezifität 0,81, der positiv prädiktive Wert 0,8 und der negativ prädiktive Wert 0,9. Durch den Verlauf der [TIMP-2]*[IGFBP7]-Konzentrationen konnte eine Aussage über die Erholung der Nierenfunktion getroffen werden.

Interpretation

Mit Hilfe der [TIMP-2]*[IGFBP7]-Konzentrationen im Urin lassen sich die Entwicklung eines AKI und die renale Erholung nach herzchirurgischem Eingriff vorhersagen.

Literatur

1. Wijeysundera D.N., et al: Derivation and validation of a simplified predictive index for renal replacement therapy after cardiac surgery. JAMA 2007;297(16):1801-9.
2. Mishra J., et al: Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery. Lancet 2005;365(9466):1231-8.
3. Kashani K., et al: Discovery and validation of cell cycle arrest biomarkers in human acute kidney injury. Crit Care 2013;17(1):R25.

Tabelle 1

Demographische Daten.

	Total (n=50)	AKI (n=26)	Non AKI (n=24)	p-Wert
Alter	71 \pm 12	70 \pm 12	72 \pm 11	0.534
Geschlecht				0.616
männlich [%]	33 (66)	18 (69.2)	15 (62.5)	
weiblich [%]	17 (34)	8 (30.8)	9 (37.5)	
Kreatinin präoperativ [mg/dl]	1.33 \pm 0.3	1.37 \pm 0.4	1.28 \pm 0.21	0.695
eGFR [ml/min per 1.73m ²]	51 \pm 11	50 \pm 14	53.8 \pm 12	0.494
Begleiterkrankungen				
Arterielle Hypertonie [%]	48 (96)	24 (92.3)	24 (100)	0.166
Herzinsuffizienz [%]	46 (92)	24 (92.3)	22 (91.7)	0.933
Diabetes [%]	20 (40)	12 (46.2)	8 (33.3)	0.355
COPD [%]	15 (30)	12 (46.2)	3 (12.5)	0.009
Chronische Niereninsuffizienz [%]	15 (30)	11 (42.3)	4 (16.7)	0.048
Frühere Herz-OP [%]	6 (12)	6 (23.1)	0 (0)	0.023
Linksventrikuläre EF <35% [%]	12 (22)	8 (30.8)	3 (12.5)	0.119
CPB Zeit [min]	140 \pm 60	149 \pm 74	129 \pm 38	0.818
X-Clamp [min]	98 \pm 50	110 \pm 63	85 \pm 26	0.358
APACHE an Tag 1	10 \pm 5	12 \pm 5	8 \pm 3	0.001
Intensivaufenthalt [Tage]	8 \pm 2	12 \pm 3	4 \pm 1	0.001
Krankenhausaufenthalt [Tage]	19 \pm 2	24 \pm 3	14 \pm 1	0.001

Prospektiv-randomisierte doppel-blind Studie zum Vergleich von Argatroban versus Lepirudin bei kritisch Kranken mit HIT-Verdacht (ALICIA-Studie)

T. Treschan¹ · M. Beiderlinden¹ · A. Greinacher² · D. Kindgen-Milles¹ · B. Pannen¹ · P. Kienbaum¹

1 Klinik für Anästhesiologie,
Universitätsklinikum Düsseldorf

2 Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin, Greifswald

Korrespondenz:

tanja.treschan@med.uni-duesseldorf.de

Fragestellung

Zahlreiche kritisch kranke Patienten mit dialysepflichtiger Niereninsuffizienz haben eine Thrombozytopenie. Bei Verdacht auf eine Heparin-induzierte Thrombozytopenie ist unklar, mit welchem direkten Thrombininhibitor eine therapeutische Antikoagulation erfolgen sollte. Wir testeten daher die Hypothese, dass eine kontinuierliche Dialyse unter Antikoagulation mit dem vorwiegend hepatisch eliminierten Argatroban effizienter und sicherer durchgeführt werden kann als mit dem bei Niereninsuffizienz kumulierenden Lepirudin.

Methodik

Nach positivem Votum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf (Nr. MO-LKP-310 vom 19.12.2008), Registrierung (ClinicalTrials.gov NCT00798525; EudraCT number 2006-003122-28) und mit schriftlichem Einverständnis wurden Patienten der interdisziplinären operativen Intensivstation mit HIT-Verdacht (Thrombozytenabfall $\geq 50\%$, 4 T-Score > 3 oder positiver HIT ELISA) prospektiv randomisiert der doppel-blinden therapeutischen Antikoagulation mit Lepirudin oder Argatroban zugeordnet (Ziel aPTT > 55 s). Die Konzentration des Lepirudins wurde bei Nieren- und die des Argatrobans bei Leberinsuffizienz individuell angepasst, so dass die initiale Infusionsrate medikamentenunabhängig bei jedem Patienten 0,05 ml/kg/h betrug. Der primäre Endpunkt wurde an einer Subpopulation niereninsuffizienter Patienten mit kontinuierlicher Dialyse als (mittlere) Laufzeit von maximal zwei konsekutiven Filtern gemessen. Beim gesamten Studienkollektiv wurden als sekundäre Endpunkte im Hinblick auf die Sicherheit der Anwendung die Inzidenz von Blutungen und thrombembolischen

Ereignissen sowie die Zeit bis zum Erreichen der Ziel-aPTT von 55–65 Sekunden (1,5-fache Erhöhung des Ausgangswertes) erhoben. Statistik: Bei erwarteter Filterlaufzeit von 30 ± 25 Stunden für Lepirudin und einer als klinisch relevant befundenen Verdopplung unter Argatroban wurde prospektiv eine Fallzahl von 15 dialysierten Patienten pro Gruppe berechnet ($\alpha=0.05$, $\beta=0.2$). Mittelwerte \pm Standardabweichung, t-Test für unabhängige Gruppen, $p<0.05$.

Ergebnisse

Über einen Zeitraum von 34 Monaten wurden insgesamt 5.285 Patienten der operativen Intensivstation gescreent. Patienteneinschluss und Gruppenzugehörigkeit sind in Abbildung 1 dargestellt. Die demographischen Daten und Vorerkrankungen der Patienten beider Gruppen unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Die Filterlaufzeiten während kontinuierlicher Dialyse in der Argatroban-Gruppe betragen 32 ± 25 Stunden, in der Lepirudin-Gruppe 27 ± 21 Stunden ($p=0.574$). Bei Argatroban-Patienten traten signifikant seltener Blutungen auf als bei Lepirudin-Patienten (12% versus 34%, $p=0.040$). Demgegenüber waren neue thrombembolische Ereignisse in beiden Gruppen gleichermaßen selten (Argatroban $n=3$ versus Lepirudin $n=2$, $p=0.639$). Die Ziel-aPTT von mindestens 55 Sekunden erreichten Patienten mit Argatroban nach 12 ± 16 Stunden und Patienten mit Lepirudin nach 8 ± 6 Stunden ($p=0.189$). Dabei war bei 9 Argatroban- und 4 Lepirudin Patienten die erste aPTT nach Beginn der Studienmedikation

on > 65 sec. ($p=0.213$). Bei 7 Lepirudin- und 1 Argatroban-Patienten traten die Blutungen in den ersten 24 Stunden nach Start der Studienmedikation auf ($p=0.029$). Bei 15 Patienten (23%), 10 in der Argatroban und 5 in der Lepirudin-Gruppe ($p=0.240$), wurde die HIT im HIPA-Test bestätigt.

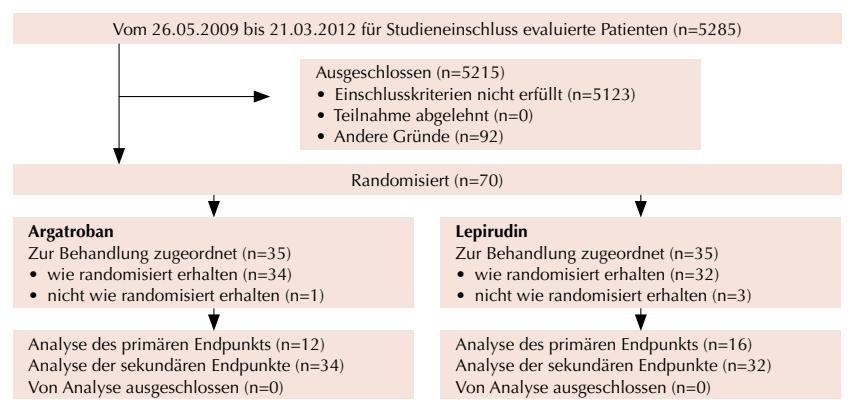
Interpretation

Dies ist die erste randomisierte doppel-blind Studie, die Effektivität und Sicherheit einer therapeutischen Antikoagulation mit zwei direkten Thrombininhibitoren vergleicht. Die Filterlaufzeiten der kontinuierlichen Hämodialyse unterscheiden sich nicht zwischen Argatroban und Lepirudin. Trotz vergleichbarer Effektivität traten unter Argatroban signifikant seltener Blutungen auf. Damit ist bei kritisch Kranken mit HIT-Verdacht das Argatroban dem Lepirudin in den bei uns verwendeten Dosierungen in Hinblick auf die Sicherheit der Anwendung überlegen.

Literatur

1. Franchini M: Heparin-induced thrombocytopenia: an update. *Thromb J* 2005;3:14
2. Dager WE, White RH: Use of lepirudin in patients with heparin-induced thrombocytopenia and renal failure requiring hemodialysis. *Ann Pharmacother* 2001;35:885-90
3. Lubenow N, Greinacher A: Management of patients with heparin-induced thrombocytopenia: focus on recombinant hirudin. *J Thromb Thrombolysis* 2000;10 Suppl1:47-57.

Abbildung 1



Flussdiagramm Studienprofil.

Einfluss der microRNA-1/BDNF-Interaktion auf die Expression von in Signalkaskaden des neuropathischen Schmerzes involvierten Proteinen

E. Neumann¹ · T. Brandenburger¹ · F. Barthel¹ · I. Bauer¹ · H. Hermanns¹ · J. Zhao² · R. Werdehausen¹

1 Klinik für Anästhesiologie, Universitätsklinikum Düsseldorf

2 Wolfson Institute for Biomedical Research, University College London (Großbritannien)

Korrespondenz:
elena.neumann@med.uni-duesseldorf.de

Fragestellung

Die microRNA-1 (miR-1) reguliert die Expression von brain-derived neurotrophic factor (BDNF) [1], Hitzeschockprotein 60 (Hsp60) und Connexin 43 (Cx43) [2]. Ob ein BDNF-Knockout im Sinne eines Feedback-Mechanismus miR-1-vermittelt auch Einfluss auf die Expression von Proteinen hat, ist bisher nicht bekannt. Hypothese der vorliegenden Studie war, dass eine Interaktion zwischen BDNF und miR-1 die Expression der in Signalkaskaden des neuropathischen Schmerzes involvierten Proteine Hsp60 und Cx43 modi-

fiziert. Da BDNF im Rahmen tierexperimentell induzierter neuropathischer Schmerzen im somatosensorischen System hochreguliert wird [3], wurde zusätzlich die Expression von miR-1 sowie von Hsp60 und Cx43 bei Ratten mit neuropathischen Schmerzen überprüft.

Methodik

Die Untersuchungen erfolgten mit Zustimmung der zuständigen Tierschutzbehörde. Die Expression von miR-1 und miR-124a (Kontrolle) wurde mittels quantitativer Real-Time-PCR (qPCR) in peripheren Nerven, Spinalganglion (DRG) und Rückenmark bei adulten homozygoten BDNF-Adv-Cre-ERT2 Knockout-Mäusen, die keine neuronale Degeneration aufwiesen (4), und bei geflochten Wildtyp-Mäusen 10 Tage nach Abschluss einer 5-tägigen Tamoxifen-Behandlung untersucht. Weiterhin wurden die durch miR-1 regulierten Proteine Hsp60 und Cx43 in allen drei Geweben mit Western Blot analysiert. Die Bestimmung von miR-1, Hsp60 und Cx43 erfolgte zusätzlich im Nervus ischiadicus der Ratte 10 bis 12 Tage nach Induktion von neuropathischen Schmerzen mittels operativer Nervenligatur (chronic constriction injury; CCI) oder nach Schein-OP.

Statistik: Mittelwert±Standardfehler; ANOVA und Bonferroni Post-hoc-Test oder t-Test (je nach Gruppenanzahl); Signifikanzniveau $\alpha=0,05$.

Ergebnisse

Bei BDNF-Knockout-Mäusen war die miR-1 im Spinalganglion im Vergleich zum Wildtyp herabreguliert ($0,47\pm0,11$; $n=9$; $p<0,05$; Abb. 1). Ein Einfluss auf die nicht mit BDNF interagierende miR-124a war nicht nachweisbar. Des Weiteren war die Expression von Hsp60 im Spinalganglion im Vergleich zum Wildtyp erhöht ($1,85\pm0,28$; $n=8$; $p<0,05$; Abb. 2), während die Cx43-Expression unbeeinflusst blieb. Im Rückenmark sowie in peripheren Nerven der transgenen Tiere konnten keine Unterschiede zum Wildtyp festgestellt werden. Bei Ratten führte eine CCI zu neuropathischen Schmerzen (mechanische Allodynie) im zeitlichen Verlauf ($n=6$; $p<0,001$; Abb. 3). An der Ligaturstelle des Nervus ischiadicus kam es nach CCI ebenfalls zu einer Herabregulation von miR-1 ($0,13\pm0,33$; $n=6$; $p<0,05$; Abb. 4) und einer Induktion der Expression von Hsp60 ($1,70\pm0,16$; $n=11$; $p<0,01$; Abb. 5) sowie Cx43 ($5,38\pm0,87$; $n=10$; $p<0,001$; Abb. 6) im Vergleich zu scheinoperierten Tieren.

Abbildung 1 - 7

Abb. 1

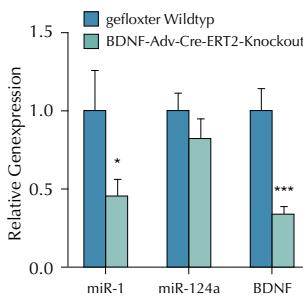


Abb. 2

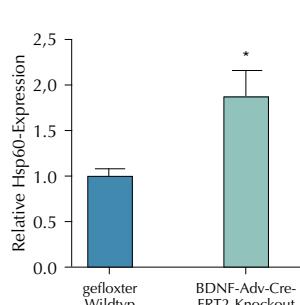


Abb. 3

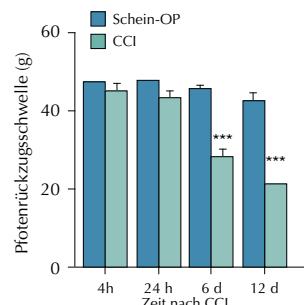


Abb. 4

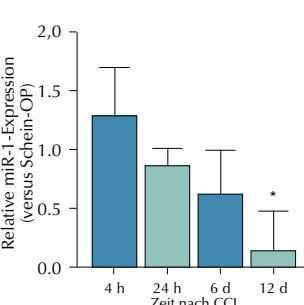


Abb. 5

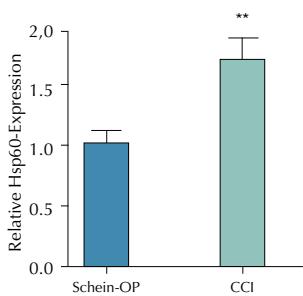


Abb. 6

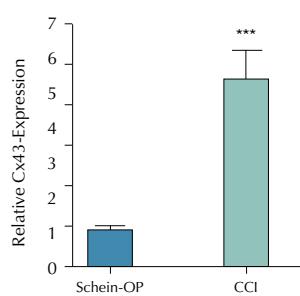
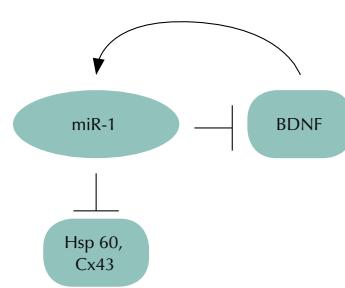


Abb. 7



Genexpression von miR-1, miR-124a und BDNF (Abb. 1; $n=9$) und Proteinexpression von Hsp60 (Abb. 2; $n=8$) im Spinalganglion von BDNF-Adv-Cre-ERT2-Knockout-Mäusen und geflochten Wildtyp-Kontrollen; Entwicklung mechanischer Allodynie (Abb. 3; $n=6$) nach CCI und Genexpression von miR-1 (Abb. 4; $n=6$) sowie Proteinexpression von Hsp60 (Abb. 5; $n=11$) und Cx43 (Abb. 6; $n=10$) im N. ischiadicus der Ratte zum angegebenen Zeitpunkt bzw. 10-12 Tage nach CCI; * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; Abb. 7: Schematische Darstellung der vermuteten miR-1/BDNF-Interaktion.

Interpretation

Die Herabregulation der miR-1-Expression im induzierbaren BDNF-Knockout geht mit einer Steigerung der Expression des ihr nachgeschalteten Hsp60 im Spinalganglion einher. Es ergibt sich ein bisher unbekannter Feedback-Mechanismus (Abb. 7) zwischen manipuliertem Zielprotein und regulierender microRNA, der andere Proteine beeinflussen

kann und damit den Phänotyp Zielprotein-unabhängig verändern könnte. Nach CCI kommt es im ligierten Nerven ebenfalls zu einer Reduktion der miR-1-Expression und zu einer Induktion von Hsp60 sowie Cx43. Daraus stellt die miR-1 ein interessantes Ziel für eine therapeutische Intervention zur Behandlung neuropathischer Schmerzen dar.

Literatur

1. Lewis BP, Shih I, Jones-Rhoades MW et al: Cell 2003;115:787-98
2. Anderson C, Catoe H, Werner R: Nucleic Acids Res 2006;34:5863-71
3. Ha SO, Kim JK, Hong HS, et al: Neuroscience 2001;107:301-9
4. Lau J, Minett MS, Zhao J, et al: Mol Pain 2011;7:100.

OxPAPC als endogener Agonist von Transient Receptor Potential A1 und V1 bei Entzündung und Schmerz

B. Oehler¹ · R. Mayer¹ · J. Schiller³ · K. Kistner⁴ · N. Roewer¹ · P. Reeh¹ · R. Blum² · A. Brack¹ · H. Rittner¹

1 Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie, Universitätsklinikum Würzburg

2 Institut für klinische Neurobiologie, Universitätsklinikum Würzburg

3 Institut für Medizinische Physik und Biophysik, Universität Leipzig

4 Institut für Physiologie und Pathophysiologie, Universität Erlangen

Korrespondenz: Oehler_B@ukw.de

Fragestellung

Bei der Entzündung reagiert 1-Palmitoyl-2-Arachidonoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin (PAPC), ein strukturbildendes Phospholipid von Zellmembranen und Lipoproteinen, mit reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), die von Phagozyten freigesetzt werden. Das entstandene oxidierte PAPC (OxPAPC) enthält sowohl fragmentierte, niedermolekulare als auch oxygenierte, hochmolekulare Fettsäuren. Chemisch reaktive Metabolite, die während Entzündungsprozessen durch Lipidperoxidation entstehen, können Transient Receptor Potential (TRP)-Kanäle vom Ankyrin- (TRPA1) und Vanilloid-Typ (TRPV1) auf Nozizeptoren aktivieren [1,2]. Intraplantare Injektion von OxPAPC führt bei Schmerzverhaltenstests an Ratten zu früher mechanischer und verzögterer thermischer Hyperalgesie. In unserer Studie untersuchen wir, welche Metabolite nach Injektion von komplettem Freund's Adjuvant (CFA) in vivo entstehen und über welche Kanäle OxPAPC-induzierte Hyperalgesie im Entzündungsschmerz vermittelt wird.

Methodik

Nach Injektion von CFA in die Hinterpfote von männlichen Wistar-Ratten wurde nach 1-6 h Pflotengewebe entnommen und Lipide extrahiert. Mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie wurden die Proben bezüglich PAPC sowie oxidativ veränderter Metabolite analysiert. Bei Schmerzverhaltenstests wurden

nach lokaler Applikation von OxPAPC in die Hinterpfote von Ratten mechanische Hyperalgesie nach Randall-Selitto und thermische Hyperalgesie nach Hargreaves gemessen. Um die gezielte Aktivierung peptiderger Nozizeptoren nach Inkubation in OxPAPC zu charakterisieren, wurde die Freisetzung von calcitonin gene-related peptide (CGRP) aus der Pfoten Haut von Wildtyp- sowie TRPA1- bzw. TRPV1-Knock-out-Mäusen quantifiziert. Mittels Ganzzell-Patch-Clamp-Ableitungen an HEK293-Zellen, die stabil mit TRPA1 transfiziert sind, wurde der Strom gemessen, der nach Aktivierung der Zellen mit OxPAPC sowie nach Präinkubation in TRPA1-Kanalblockern fließt. OxPAPC sowie TRP-Kanalblocker wurden an transfizierten HEK-Zellen und Hinterwurzelganglienzellen (DRGs) von Ratten und Mäusen in Fura-2/AM-gestützten Einzelzellkalziummessungen verifiziert.

Statistisch wurden die Daten mittels ANOVA mit Messwiederholungen bzw. Mann-Whitney-U-Test mit OriginPro 9.0 ausgewertet. Die Regierung von Unterfranken genehmigte die Tierversuche.

Ergebnisse

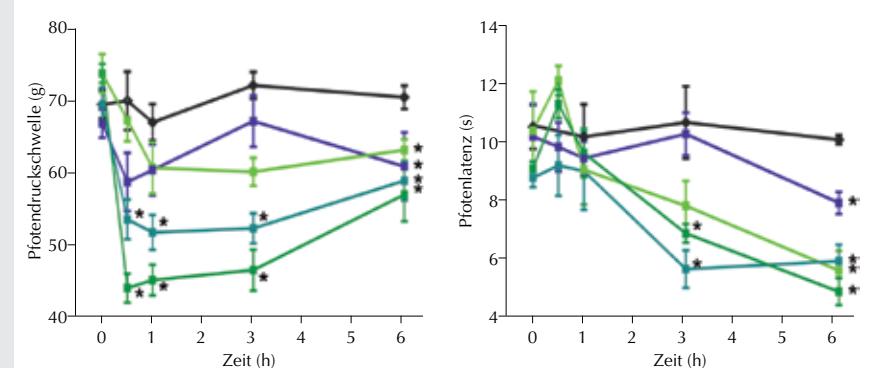
Neben PAPC, das auch in unbehandeltem Pflotengewebe von Ratten nachweisbar ist, ent-

stehen während CFA-induzierter Entzündung vorwiegend niedermolekulare, oxidierte Metabolite von PAPC. In Schmerzverhaltenstests hemmen TRPA1-Blocker (HC-030031) mechanische, aber nicht thermische OxPAPC-induzierte Hyperalgesie. Der TRPV1-Blocker (BCTC) inhibiert thermische OxPAPC-induzierte Hyperalgesie (Abb. 1). CGRP wird dosisabhängig mehr aus Pfoten Haut als aus DRGs freigesetzt (Abb. 2). Bei TRPA1- und TRPV1-ko-Mäusen ist die Sekretion von CGRP deutlich reduziert. In Patch-Clamp-Experimenten ruft OxPAPC in HEK_{TRPA1}-Zellen einen großen Strom hervor, der durch Vorinkubation der Zellen in Ruthenium Rot, einem unspezifischen TRP-Kanalblocker, gehemmt wird. In Einzelzellkalziummessungen steigt nach OxPAPC intrazellulär die Kalziumkonzentration in HEK_{TRPA1}-Zellen (Abb. 3) sowie Hinterwurzelganglien an. Durch Vorinkubation und durch akute Zugabe von HC-030031 wird die Aktivierung gehemmt.

Interpretation

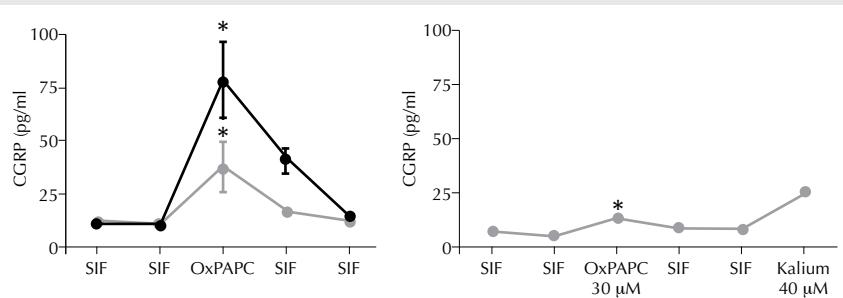
Durch das in entzündetem Gewebe entstehende OxPAPC werden die für die Transduktion inflammatorischer Schmerzen wichtigen Chemosensoren TRPA1 und TRPV1 aktiviert, die verschiedene Schmerzqualitäten hervor-

Abbildung 1



Schmerzschwellenmessungen: (A) OxPAPC reduziert umgehend dosisabhängig (100, 200, 500 µg; hell- bis dunkelgrün) mechanische Schmerzschwellen. Nichttoxiertes PAPC (blau) hat geringe Effekte, NaCl (schwarz) als Kontrolle. (B) OxPAPC induziert dosisunabhängig thermische Hyperalgesie im zeitlichen Verlauf. $n = 8$, Mittelwert \pm S.D., RM-ANOVA, Kruskal-Wallis post hoc, * $p < 0,05$.

Abbildung 2



CGRP-Freisetzung: (A) Nach Inkubation der Pfotenhaut von C57/BL6-Mäusen mit OxPAPC (grau: 30 µM, schwarz: 100 µM) wird CGRP dosisabhängig freigesetzt. * SIF(basal) vs. OxPAPC.

(B) In TRPA1/TRPV1-Doppel-Knockout-Mäusen bleibt die oxPAPC-induzierte Freisetzung von CGRP aus. * WT vs. TRPA1/TRPV1-Doppel-KO. n=8, Mittelwert±S.D., Mann-Whitney-U-Test, * p < 0,05.

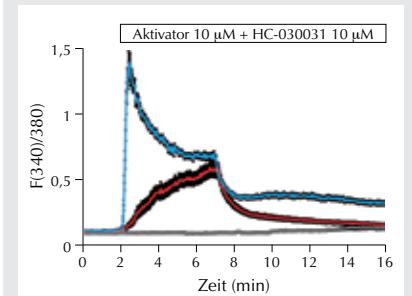
rufen. Die reaktiven Gruppen von OxPAPC könnten durch Michael-Adduktion Cysteinreste oxidieren und dadurch TRPA1 aktivieren. Auch durch strukturelle Veränderungen der Zellmembran könnten TRPA1 und TRPV1 von OxPAPC – wie bei oxidiertem Linolensäure postuliert – aktiviert werden. OxPAPC ist ein neuer Metabolit, der ein möglicherweise interessantes Target für die Therapie von Entzündungsschmerzen darstellt.

Gefördert durch das IZKF Würzburg (Z-2/43, N-261).

Literatur

1. Andersson D.A, et al: Transient receptor potential A1 is a sensory receptor for multiple products of oxidative stress. *J Neurosci* 2008;28:2485
2. Ruparel S, et al: The cytochrome P450 inhibitor, ketoconazole, inhibits oxidized linoleic acid metabolite-mediated peripheral inflammatory pain. *Mol Pain* 2012;8:73.

Abbildung 3



Calciumimaging: OxPAPC (rot) und AITC (blau) erhöhen intrazellulär Kalzium in HEK_{TRPA1}-Zellen, das durch HC-030031 gehemmt wird. Die Vorinkubation der Zellen in 10 µM HC-030031 (grau) blockiert die Aktivierung durch OxPAPC (n=50, Mittelwert±SEM).

S. pneumoniae inhibiert die purinerge Signaltransduktion in Alveolarepithelzellen durch direkte Inaktivierung des Purinrezeptors P2Y₂

C. Olotu · B. Koch · T. Kieffmann · A. Mecklenburg · R. Kieffmann · A.E. Goetz
Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie,
Universität Hamburg

Korrespondenz: c.olotu@uke.de

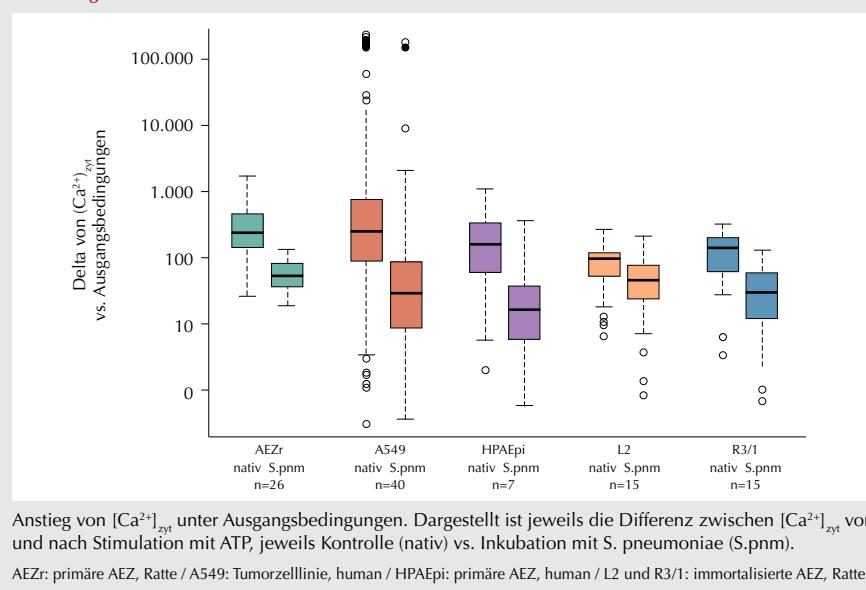
Fragestellung

Wir konnten bereits zeigen, dass S. pneumoniae, der häufigste Erreger der ambulant erworbenen Pneumonie, die zytosolische Calciumfreisetzung nach Aktivierung des Purinrezeptors P2Y₂ durch ATP in Alveolarepithelzellen (AEZ) unterdrückt [1]. Die purinerge Calciumantwort spielt bei der Regulation von Surfactantproduktion und Flüssigkeitsreabsorption eine wichtige Rolle, Prozesse, die im Rahmen von Pneumonien gestört sind. Mit Hilfe einer P2Y₂-Mutante mit deletierten Phosphorylierungsstellen untersuchten wir die Möglichkeit einer Bakterien-induzierten P2Y₂-Phosphorylierung, die in vivo eine Voraussetzung für die Inaktivierung und Internalisierung des Rezeptors ist [2].

Methodik

Mittels gezielter Denovo-Mutagenesen wurde ein GFP-P2Y₂-Rezeptorkonstrukt (GFP-P2Y₂-AAA) mit deletierten Phosphorylierungsstellen geschaffen (S243A, T344A, S356A) [3]. Die Zelllinien A549 (AEZ Typ II, humane Tumorzelle) und HPAEpiC (primäre humane AEZ, P2Y-knockdown-Phänotyp) wurden unter Standard-Zellkulturbedingungen kultiviert. Zellen wurden mit GFP-P2Y₂-Wildtyp (GFP-P2Y₂-WT) oder GFP-P2Y₂-AAA transzisiert und anschließend mit 100CFU/Zelle S. pneumoniae D39Δcps für 2h inkubiert. Die Bestimmung der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration ($[Ca^{2+}]_{zyt}$) in AEZ erfolgte danach mittels Fura-2AM (5 μM) und ratio imaging, die Stimulation des P2Y₂ fand mit 100 μM ATP statt. Die Rezeptorlokalisierung wurde am Laser-Spinning-Mikroskop unter Zellkulturbedingungen über 2-3h durchgeführt, dabei wurde das Auftreten von GFP-P2Y₂-haltigen Strukturen (Vesikel) im Zytosol über die Zeit gemessen. Die transzistierten Zellen wurden nach 30 min Ruhephase unter dem Mikroskop mit 100 CFU/Zelle S. pneumoniae versetzt; in den Kontrollgruppen wurde entsprechend ATP, HEPES-Puffer oder Pneumokokkenmedium hinzugegeben. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels T-Tests, ANOVA und linearer Regression in R® 3.0.1, Angabe von MW±Standardabweichung. Bei nicht-normalverteilten Daten ($[Ca^{2+}]_{zyt}$ -Messungen) sind Median und 0,25/0,75-Quartile

Abbildung 1



angegeben. Das Signifikanzniveau beträgt $p < 0,01$.

Ergebnisse

Die Stimulation mit ATP führte bei GFP-P2Y₂-WT- bzw. GFP-P2Y₂-AAA-transzistierten HPAEpiC zu einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_{zyt}$ um 158,1nM (1.Quartil/3.Quartil: 59,5/325,6nM) bzw. 138,2nM (24,7/309,6nM) gegenüber Ausgangsbedingungen. Nach vorheriger Inkubation mit S. pneumoniae war die ATP-induzierte Ca²⁺-Antwort in beiden Gruppen reduziert, bei GFP-P2Y₂-AAA jedoch in deutlich geringerem Ausmaß (GFP-P2Y₂-WT 26,7nM (0/25,1nM), GFP-P2Y₂-AAA 73,9nM (10,7/238,8nM)).

Unter dem Laser-Spinning-Mikroskop wurde nach ATP-Stimulation von GFP-P2Y₂-WT-transzistierten Zellen eine Vesikelzunahme von $2,3 \pm 1,8$ auf $19,5 \pm 4,7$ über 2h im Zytosol registriert. Im Gegensatz dazu blieb die Anzahl der Vesikel bei GFP-P2Y₂-AAA im gleichen Zeitraum unverändert ($1,5 \pm 1,5$ auf $1,6 \pm 1,8$). Nach vorhergehender Inkubation mit S. pneumoniae nahm die Anzahl der Vesikel bei GFP-P2Y₂-WT über 2h von $1,8 \pm 1,9$ auf $14,4 \pm 4,6$ zu, bei GFP-P2Y₂-AAA stieg sie von 2 ± 2 auf $18,6 \pm 5,4$. In Kontrollgruppen blieb die Anzahl der zytosolischen Vesikel über 2h unverändert niedrig (1 ± 1 vs. $1 \pm 0,9$).

Interpretation

Die transzistierten GFP-P2Y₂-Konstrukte vermitteln nach Stimulation mit ATP einen Anstieg von $[Ca^{2+}]_{zyt}$ und verhalten sich damit analog zum endogenen P2Y₂-Rezeptor. Nach Inkubation mit S. pneumoniae ist die ATP-induzierte Ca²⁺-Antwort bei Wildtyp-P2Y₂,

nicht jedoch bei seinem mutierten Pendant, deutlich abgeschwächt. Die Phosphorylierung des Rezeptors spielt bei der Inhibition der Ca²⁺-Antwort durch S. pneumoniae demnach eine Rolle. Da die Phosphorylierung des Rezeptors in vivo eine condicio sine qua non für dessen Internalisierung ist, wurde die Relokalisation von GFP-P2Y₂ nach ATP in Echtzeit untersucht. Es kommt dabei zu einer Internalisierung des Wildtyprezeptors, nicht aber der P2Y₂-AAA-Mutante. Während der Inkubation mit S. pneumoniae konnte jedoch an beiden Rezeptorvarianten eine Internalisierung beobachtet werden. Durch Kontakt mit dem Bakterium kommt es in AEZ demnach zu einer Rezeptordesensitivierung, die ähnlich wie bei Agonistenkontakt mit einer Internalisierung einhergeht. Die Phosphorylierung des Rezeptors scheint jedoch an anderen Stellen als bei der ATP-vermittelten Internalisierung zu erfolgen. Inwiefern P2Y₂ durch S. pneumoniae modifiziert wird und welche Auswirkungen dies auf Downstream-Effekte wie Surfactantsekretion und Flüssigkeitsreabsorption in AEZ hat, ist Gegenstand weiterer Untersuchungen.

Literatur

- Olotu C, et al: S. pneumoniae inhibiert Pneumolysin-abhängig purinerge Calcium-Signaltransduktionswege in Alveolarepithelzellen. Anästh Intensivmed 2011;7:460-507
- Lefkowitz RJ: G protein-coupled receptors. J Biol Chem 1998;273:18677-18680
- Flores RV, et. al: Agonist-induced phosphorylation and desensitization of the P2Y₂ nucleotide receptor. Mol Cell Biochem 2005;280(1-2):35-45.

Der AQP5-A(-1364)C-Promotorpolymorphismus und die AQP5-Expression beeinflussen die Letalität bei LPS-induzierter Inflammation und die Migration von Immunzellen

K. Rump^{2,3} · A. von Busch³ · L. Bergmann^{2,3} · A. Menon⁴ · S. Schäfer² · W. Siffert¹ · J. Peters² · M. Adamzik^{2,3}

1 Institut für Pharmakogenetik, Universität Duisburg-Essen

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

3 Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie, Universitätsklinikum Knappschaftskrankenhaus Bochum-Langendreer, Bochum

4 Department of Molecular Genetics, Biochemistry, and Microbiology, University of Cincinnati (USA)

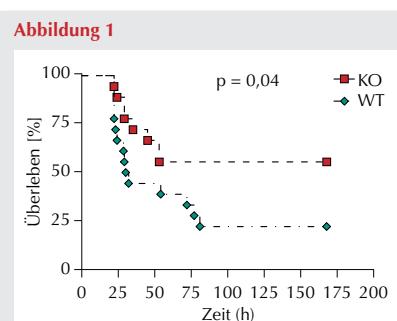
Korrespondenz: katharina.k.rump@rub.de

Fragestellung

Die große interindividuelle Variabilität des Krankheitsverlaufs bei schwerer Sepsis lässt sich durch klassische Risikofaktoren nicht vollständig erklären, vielmehr scheinen auch genetische Faktoren Krankheitsverlauf und Letalität zu beeinflussen. Da der funktionelle Aquaporin5 (AQP5) A(-1364) C-Promotorpolymorphismus mit der 30-Tage-Letalität bei schwerer Sepsis assoziiert ist [1], scheint AQP5 ein Schlüsselprotein bei der schweren Sepsis zu sein. Ein möglicher Mechanismus, über den dieser Promotorpolymorphismus die Sepsis beeinflusst, könnte der Einfluss von AQP5 auf die Migration von Immunzellen sein [2]. Deshalb wurden folgende Hypothesen getestet: 1) AQP5-Knockout(KO)-Mäuse zeigen eine unterschiedliche Letalität bei LPS-induzierter Inflammation als Wildtyp(WT)-Mäuse; 2) AQP5-überexprimierte Immunzellen zeigen ein verändertes Migrationsverhalten im Vergleich zu nativen Zellen; 3) der AQP5 A(-1364)C-Promotorpolymorphismus ist mit verändertem Migrationsverhalten neutrophiler Granulozyten assoziiert.

Methode und Ergebnisse

1) Nach Genehmigung durch die Tierschutzkommission wurde bei je 18 WT(C57/BL6)-Mäusen und AQP5-KO-Mäusen (C57/BL6-AQP5-KO, zur Verfügung gestellt von A.G. Menon, Cincinnati, USA [3]), durch Lipopolysaccharid (LPS, 20 mg/kg i.p. E. coli 0111:B4, Sigma) eine Inflammation ausgelöst und der Verlauf für 168 h beobachtet. AQP5-KO-Mäuse zeigten in der Kaplan-Meier-Analyse im Vergleich zu WT-Mäusen eine verringerte Letalität (WT: 78%, KO: 45%; p=0,04; Abb. 1).



N-Formylmethionyl-Leucyl-Phenylalanin-Stimulation (Sigma) im Vergleich zu C-Allelträgern (p<0,01; Abb. 2 b). Die Auswertung der Migrationsassays erfolgte mittels ungepaarten T-Tests.

Interpretation

Wie unsere Experimente an Mäusen und Zelllinien zeigen, ist AQP5 ein Schlüsselprotein bei LPS-induzierter Inflammation. Die AQP5-Expression beeinflusst offenbar die Migration von Immunzellen, und auch die Migration neutrophiler Granulozyten ist mit dem AQP5 A(-1364)C-Promotorpolymorphismus assoziiert. Das genotypabhängige zelluläre Migrationsverhalten könnte so die Abhängigkeit der Letalität bei Sepsis vom AQP5 A(-1364) C-Promotorpolymorphismus erklären.

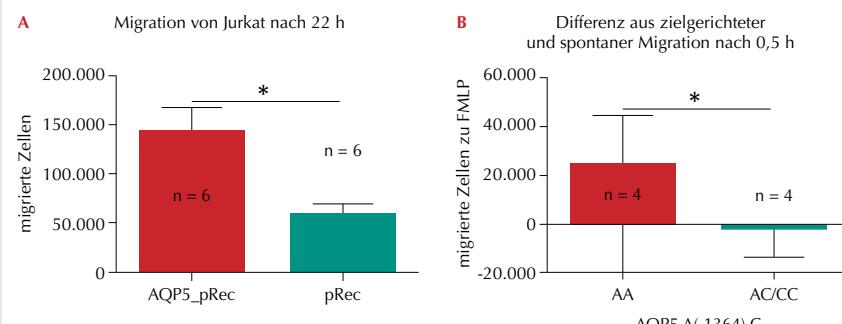
Literatur

- Adamzik M, Frey UH, Mohlenkamp S, Scherag A, Waydhas C, Marggraf G, et al: Aquaporin 5 gene promoter-1364A/C polymorphism associated with 30-day survival in severe sepsis. Anesthesiol 2011;04;114(1528-1175; 0003-3022; 4):912-7
- Papadopoulos MC, Saadoun S, Verkman AS: Aquaporins and cell migration. Pflugers Arch 2008 07;456(0031-6768; 0031-6768; 4): 693-700
- Krane CM, Melvin JE, Nguyen HV, Richardson L, Towne JE, Doetschman T, et al: Salivary acinar cells from aquaporin 5-deficient mice have decreased membrane water permeability and altered cell volume regulation. J Biol Chem 2001;06/29;276(0021-9258; 0021-9258; 26):23413-20

2) Eine Lymphozyten-Zelllinie (Jurkat) wurde mit einem AQP5-Expressionsplasmid (AQP5_pReceiver) oder einem Kontrollplasmid (pReceiver) mittels Elektroporation und anschließender Geneticin-Selektion stabil transfiziert. Die AQP5-Überexpression wurde durch Real-Time PCR (CT-Wert-Erhöhung um 12 Zyklen) und Western Blot (>3-fach verstärkte Proteinexpression) bestätigt und die Migration mittels Insert-Methode und durchflusszytometrischer Zählung (MUSE Count & Viability Kit) quantifiziert. AQP5-überexprimierte Zellen zeigten im Vergleich zu Kontrollzellen eine verstärkte Migration unter Stimulation mit dem Chemokin SDF-1 α (Prospec). Nach 22 h war die Migration AQP5-überexprimierter Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen zweifach erhöht (p = 0,01; Abb. 2a).

3) Neutrophile Granulozyten wurden durch Dichtegradientenzentrifugation aus dem Blut gesunder Probanden isoliert. Im Migrationsassay mittels Insert-Methode zeigten neutrophile Granulozyten von AA-Genotypträgern eine frühere und mehr als doppelt so stark ausgeprägte, zielgerichtete Migration unter

Abbildung 2



Migration AQP5-überexprimierter lymphozytärer (Jurkat) Zellen und Kontrollzellen (A) sowie Migration humaner neutrophiler Granulozyten in Abhängigkeit vom AQP5 A(-1364)C-Promotorpolymorphismus (B).

Hemmung der Wirkung von Prostaglandin E2 durch Komplexierung mit methylierten Beta-Cyclodextrinen zur Behandlung von entzündungsbedingten Schmerzen bei Ratten

R.-S. Sauer¹ · J.-A. Broscheit¹ · T. Sohajda² · A. Brack¹ · H. L. Rittner¹ · N. Roewer¹

1 Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie, Universitätsklinikum Würzburg

2 Cyclolab R&D Ltd., Budapest (Ungarn)

Korrespondenz: sauer_R@ukw.de

Fragestellung

Prostaglandin (PG) E der Serie 2 (PGE₂) ist ein Mediator, der als Reaktion des Körpers auf eine Entzündung gebildet wird und über eine Aktivierung der Nozizeptoren zur Vermittlung von Schmerzreizen führt. Ziel einer Reihe von Wirkstoffen ist die Hemmung der PG-Synthese durch Hemmung der Cyclooxygenase. Diese unspezifische Hemmung führt einerseits zu Senkung der PGE₂-vermittelten Schmerzreize, bedingt andererseits eine Reihe von z.T. schwerwiegenden Nebenreaktionen durch Hemmung anderer PG-Derivate. PGE₂ kann spezifisch durch eine Gruppe von cyclischen Oligosacchariden, den methylierten β-Cyclodextrinen, komplexiert und damit möglicherweise inaktiviert werden. Ziel dieser Studie war es daher, ein solches Cyclodextrin zu identifizieren und dessen Wirkung am Modell der mit Freund's Complete Adjuvant (CFA)-entzündete Hinterpfote an Ratten zu untersuchen.

Methodik

Zunächst wurde die Affinität methylierter Cyclodextrine zu PGE₂ mit Hilfe der Kapillarelektrophorese bestimmt. RAMEB – ein

Razemat von methylierten β-Cyclodextrinen unterschiedlichen Substitutionsgrades – wurde so selektiert und anschließend nach Substitutionsgrad mit der HPLC-Technik in 3 Fraktionen aufgetrennt. Der Substitutionsgrad wurde mit der NMR-Methode bestimmt und die Stabilität der Komplexe von PGE₂ mit den 3 Fraktionen durch die Kapillarelektrophorese gemessen. Alle Untersuchungen an männlichen Wistar-Ratten zur Wirkung der selektierten Cyclodextrine wurden von der Regierung von Unterfranken genehmigt. Ratten wurden intraplantar (i.pl.) mit PGE₂ oder CFA injiziert. Nach 1 h bzw. 4 d wurden RAMEB oder RAMEB-Fraktionen lokal (i.pl.) oder systemisch (i.v.) injiziert und mechanische (Randall-Sellito-Test) sowie thermische (Hargreaves Test) nozizeptive Schwellen gemessen bzw. Ptotengewebe für PGE₂ oder PGD₂ ELISA entnommen.

Ergebnisse

Intraplantare und intravenöse Gabe von RAMEB verringert mechanische und thermische Hyperalgesie bei Ratten mit CFA-Entzündung (Abb. 1A) sowie bei intraplantarer PGE₂-Injektion (Abb. 1B). Der Cox-2-Hemmer Parecoxib im Vergleich als Standard reduziert ebenfalls dosisabhängig im gleichen Ausmaß Hyperalgesie bei Ratten mit CFA-Entzündung. RAMEB-Fraktionen FM und FL (Abb. 1C), aber nicht FH verringern bei lokaler oder systemischer Gabe mechanische und thermische Hyperalgesie sowie die Bildung von PGE2 in Ratten mit entzündeten Pfoten. RAMEB und RAMEB FL reduzieren in gleichem Ausmaß signifikant die CFA-induzierte Bildung von PGE₂ (Abb. 1 D) und seinen Metaboliten, aber nicht die Bildung von PGD₂. Die Affinität von RAMEB FL ist signifikant höher (580 ± 5 [1/M]) als die von RAMEB (360 ± 6 [1/M]).

Interpretation

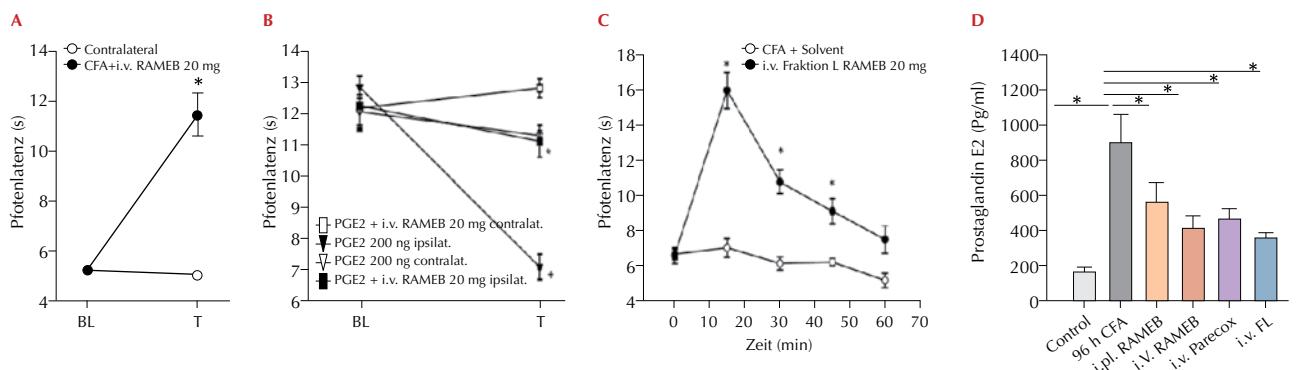
RAMEB FL bindet PGE₂ besser als RAMEB selbst. Beide, RAMEB und RAMEB FL, wirken sowohl bei systemischer als auch lokaler Gabe analgetisch bei CFA-Entzündung oder PGE₂-induzierter Hyperalgesie. Beide verringern signifikant die PGE₂, nicht PGD₂-Konzentration im Gewebe. Hierüber könnten sich neue Möglichkeiten zur Behandlung der entzündlichen Schmerzen eröffnen.

Gefördert durch das BMBF (Lipotrans).

Literatur

1. Szejtli J: Cyclodextrin Technology. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 1988
2. Uekama K, et al.: Utilization of cyclodextrin complexation for separation of E, A, and B prostaglandins by ion-exchange liquid chromatography. J Pharmaceut Sci 1977; 66:706-10
3. Loftson T, Dūchene D: Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. Int J Pharm 2007;329:1-11
4. Zhang Y, et al: Inhibition of cyclooxygenase-2 rapidly reverses inflammatory hyperalgesia and prostaglandin E2 production. J Pharm Exp Ther 1997;283:1069-75.

Abbildung 1



Thermische nozizeptive Schwellen sowie Gehalt an PGE₂ im Ptotengewebe 4 d nach intraplantarer CFA oder 1 h nach PGE₂ intraplantar in Wistar-Ratten nach intravenöser bzw. intraplantarer Gabe von RAMEB, Parecoxib, oder RAMEB-Fraktion L. *p < 0,05. Die Daten werden als Rohdaten Mittelwerte ± SEM dargestellt (n = 6, Two-way Repeated Measurement ANOVA, Student-Newman-Keuls).

Der NF κ B1-Promotorpolymorphismus -94ins/delATTG beeinflusst die Wirkung von Hydrocortison bei schwerer Sepsis

S.T. Schäfer^{1,2} · S. Gessner¹ · K. Rump¹ · U. Frey¹ · W. Siffert³ · J. Fandrey² · J. Peters¹ · M. Adamzik¹

1 Klinik für Anästhesiologie & Intensivmedizin

2 Institut für Physiologie und

3 Institut für Pharmakogenetik

Universität Duisburg-Essen und
Universitätsklinikum Essen

Korrespondenz: simon.schaefer@uni-due.de

Preisträger des DGAI-Forschungsstipendiums der Fresenius-Stiftung 2014

Fragestellung

Trotz einer Vielzahl von Studien bleibt unklar, ob Hydrocortison (HC) die Prognose von Patienten mit schwerer Sepsis beeinflusst. Während einerseits eine Reduktion der Letalität aufgezeigt wurde [1], zeigte eine Corticoid-Gabe in vielen Studien keinen Vorteil, so dass die aktuellen „Surviving Sepsis Campaign“ Empfehlungen für die Gabe von Corticosteroiden beim septischen Schock nur Evidenzgrad 2C ausweisen [2]. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass der Polymorphismus -94ins/delATTG im Promotor von NF κ B1, dem Schlüsselregulator der inflammatorischen Genregulation, ein unabhängiger Prädiktor für die 30 Tage-Letalität bei Sepsis ist und das Deletionsallel (ID/DD) im Vergleich zum homozygoten Insertionsgenotyp (II) mit einer gesteigerten

NF κ B-Kerntranslokation nach Lipopolysaccharid-(LPS)-Inkubation in vitro assoziiert ist [3]. Da HC den Transkriptionsfaktor NF κ B inhibiert, könnte vorgenannter Polymorphismus Einfluss auch auf die HC-Wirkung bei schwerer Sepsis haben. Wir testeten die Thesen, dass HC 1) die NF κ B-Kerntranslokation monozytärer Zellen genotypabhängig hemmt und 2) der Einfluss einer HC-Therapie auf die Letalität von Patienten mit schwerer Sepsis vom NF κ B1-Promotor (-94ins/delATTG)-Genotyp abhängt.

Methodik

Nach Genehmigung durch die Ethikkommission wurden 100 gesunde Blutspender sowie 160 Patienten mit schwerer Sepsis mit und ohne HC-Therapie (aufgrund Entscheidung des klinisch verantwortlichen Arztes) auf das Vorliegen des NF κ B1-Polymorphismus -94ins/delATTG genotypisiert (Pyrosequenzierung). Monozytäre Zellen genotypisierter Blutspender (II-Genotyp: n=5; DD-Genotyp n=6) wurden isoliert, mit (10-5 M) bzw. ohne HC für eine Stunde mit LPS (10 μ g ml⁻¹) inkubiert und die NF κ B-Kerntranslokation analysiert (Immunfluoreszenz). Im nächsten Schritt analysierten wir retrospektiv die 30-Tage-Letalität von 160 Patienten mit schwerer Sepsis aus einer laufenden prospektiven Beobachtungsstudie in Abhängigkeit vom NF κ B1-Genotyp (II vs. ID/DD) und HC-Therapie. Statistik: Mittelwerte \pm Standardabweichung, Mann-Whitney-Test, Ein-Weg-ANOVA mit Post-hoc-Student's T-Test, p<0,05/n, Kaplan-Meier-Analyse (Log-Rank-Test); multivariate Cox-Regression.

Ergebnisse

Hydrocortison hemmt die NF κ B-Kerntranslokation monozytärer Zellen nach LPS-Inkubation nur beim II-Genotyp (25% NF κ B-positive Zellkerne \pm 11), nicht jedoch beim DD Genotyp (51% NF κ B-positive Zellkerne \pm 15, p<0,0001, Abb. 1). Nicht unterschiedlich war hingegen der Prozentsatz nuklear NF κ B-positiver Zellen bei LPS-unstimulierten (II 12% \pm 2 vs. DD 15% \pm 4, p=n.s.) sowie alleinig mit HC (II 12% \pm 2 vs. DD 14% \pm 3, p=n.s.)-inkubierten monozytären Zellen.

102 von 160 Patienten mit schwerer Sepsis erhielten HC auf Entscheidung des klinisch verantwortlichen Arztes. Der DD-Genotyp wies unter Hydrocortison-Therapie eine mehr als doppelt so hohe Letalität (58,3% von 60 Patienten, p<0,0001, Abb. 2) im Vergleich zum DD-Genotyp ohne HC auf (17,6% von 34 Patienten). Die Letalität beim II-Genotyp betrug unter HC 23,8% (von 42 Patienten) bzw. 26% ohne HC (von 24 Patienten). Der Schweregrad der Erkrankung, gemessen anhand des SAPS II bei Aufnahme auf die Intensivstation, war indes zwischen den Gruppen nicht unterschiedlich (alle p=n.s.). Bei einer multivariaten Cox-Regression mit Einschluss bekannter klassischer Risikofaktoren für die Letalität bei schwerer Sepsis (u.a. Alter, Geschlecht, SAPS II und C-reaktives Protein) zeigte sich die Hydrocortison-Therapie beim DD-Genotyp als unabhängiger Prädiktor für die 30-Tage-Letalität (Hazard Ratio: 3,7; 95% Konfidenzintervall 1,69-8,14; p<0,001).

Abbildung 1 und 2

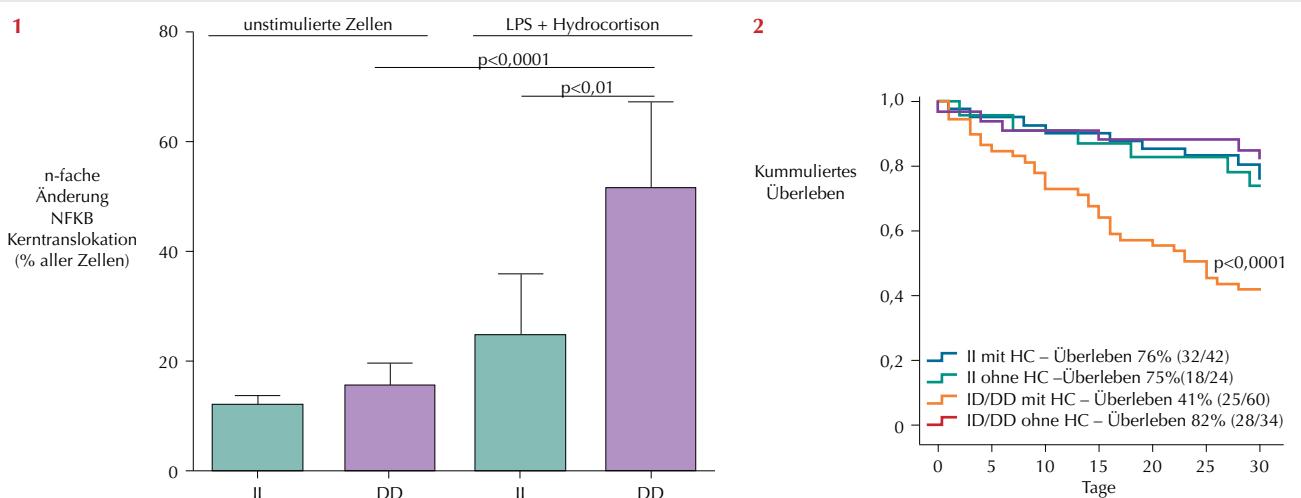


Abb. 1: Hydrocortison vermag beim Deletionsgenotyp (DD) die Lipopolysaccharid (LPS)-induzierte NF κ B-Kerntranslokation in monozytären Zellen im Vergleich zum Insertionsgenotyp (II) nicht zu hemmen; Deletionsallelträger weisen also nach Hydrocortison und LPS-Inkubation eine persistierend hohe NF κ B-Kerntranslokation auf.

Abb. 2: Eine Hydrocortisontherapie (HC) ist bei Deletionsallelträgern (ID/DD) mit einer erhöhten Letalität bei schwerer Sepsis im Vergleich zum DD-Genotyp ohne HC-Therapie sowie dem Insertionsgenotyp (II) mit und ohne HC assoziiert, p<0,0001.

Interpretation

Hydrocortison bewirkt somit bei Deletionsallelträgern des NF κ B1-Promotorpolymorphismus (-94ins/delATTG) in vitro keine Hemmung der NF κ B-Kerntranslokation, wobei gleich die Kerntranslokation des proinflammatorischen Transkriptionsfaktors NF κ B unter LPS-Stimulation bei Deletionsallelträgern im Vergleich zum Insertionstyp erhöht ist [3].

Bei Deletionsallelträgern mit schwerer Sepsis ist also eine Hydrocortisontherapie mit einer doppelt so hohen Letalität assoziiert sowie unabhängiger Prädiktor für die 30-Tage-Letalität.

Unsere molekulargenetischen und klinischen Daten könnten somit die heterogenen Ergebnisse hinsichtlich des Stellenwertes einer Corticoidtherapie bei Sepsis als genotypbedingt auflösen, möglicherweise weil Hydrocortison bei Deletionsallelträgern die ohnehin gesteigerte [3] Inflammationsreaktion nicht zu hemmen vermag.

Literatur

1. Annane D, Sebille V, Charpentier C: Effect of treatment with low doses of hydrocortisone and fludrocortisone on mortality in patients with septic shock. *JAMA* 2002;288:862-71

2. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A: Surviving Sepsis Campaign Guidelines Committee including The Pediatric Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Intensive Care Med* 2013;39:165-228
3. Adamzik M, Schäfer ST, Frey UH: The NF κ B1-Promoter Polymorphism (-94ins/delATTG) Alters Nuclear Translocation of NF κ B1 in Monocytes after Lipopolysaccharide Stimulation and Is Associated with Increased Mortality in Sepsis. *Anesthesiology* 2013;118:123-133.

Endogen-freigesetzte mitochondriale DNA supprimiert das adaptive Immunsystem

S.T. Schäfer^{1,2} · M. Adamzik¹ · L. Franken⁴ · S. Frede^{2,3} · J. Walden¹ · N. Schönborn¹ · A. Engler¹ · J. Fandrey² · A. M. Westendorf⁵ · J. Peters¹ · A. Limmer⁴

1 Klinik für Anästhesiologie & Intensivmedizin
2 Institut für Physiologie

Universität Duisburg-Essen

3 Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin

4 Institut für molekulare Medizin und experimentelle Immunologie
Universität Bonn

5 Institut für medizinische Mikrobiologie,
Universitätsklinikum Essen

Korrespondenz: simon.schaefer@uni-due.de

Fragestellung

Systemische Bakteriämie und spezifische bakterielle Strukturen (wie LPS oder mikrobielle DNA: CpG-DNA) als Auslöser einer Sepsis sind anerkannt [1]. Dennoch wird häufig eine Immunparalyse im Gefolge einer Sepsis beobachtet, ohne dass noch Erreger nachgewiesen werden können. Dies mag teilweise auf einer unzulänglichen Diagnostik beruhen, jedoch könnten auch endogene Substanzen die Immunantwort supprimieren, ohne dass zeitgleich eine Bakteriämie vorläge. So können Bakterien sowie bakterielle Bestandteile eine Immunparalyse auslösen [1]. Polytransfundierte weisen erhöhte Serumkonzentrationen mitochondrialer DNA (mtDNA) auf [2] und diese vermag neutrophile Granulozyten in vitro TLR9-abhängig zu stimulieren [2]. Wir testeten nun die These, dass endogene Toll-Like-Rezeptor-Liganden (TLR-L) wie mtDNA eine Immunparalyse auslösen können.

Methodik

Zunächst wurde nach Genehmigung durch die Tierschutzbehörde an Wildtyp (WT)- und TLR9-Knock-out (KO)-Mäusen geprüft, ob mtDNA (analog mikrobieller CpG-DNA) zu einer Suppression zytotoxischer T-Zellen führt und dies über eine Erkennung durch TLR9 erfolgt. Dazu wurde ein adenovirales Modell verwendet [1]. Zur Identifikation suppressiver Mechanismen nutzten wir nachfolgende Methodenpalette: FACS-Analyse CD8⁺ dendritischer Zellen (DC), funktionelle Antigenkreuzpräsentationsmessung von DC (IL2, Interferon γ), histologische Analyse der Milzstruktur sowie Messung der Kynureninkonzentration im Serum als Marker der immunsuppressiven Indolaminaktivität. Um eine Analogie zu Patienten mit Sepsis herzustellen, schlossen wir nach Genehmigung durch die Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen 110 Patienten mit Sepsis sowie 55 gesunde Blutspender in eine prospektive Beobachtungsstudie ein und bestimmten mtDNA- (ATPase 6, D-Loop; real-time PCR) und Kynurenin-Serumkonzentrationen (HPLC). Statistik: Mittelwerte \pm SD; Mann-Whitney-Test; Ein-Weg-ANOVA mit Post-hoc-Student's t-Test; p <0,05/n.

Ergebnisse

Bei Patienten mit Sepsis (n=107; bei 3 Patienten Rückzug der Studieneinwilligung) war die mtDNA-Serumkonzentration im Vergleich zu Blutspendern erhöht (ATPase 6: 64-fach \pm 84; D-Loop1: 79-fach \pm 83; p <0,0001). Versuche in WT- und TLR9-KO-Mäusen zeigten, dass CpG-DNA (p <0,0001) und mtDNA (p <0,001), nicht jedoch genomische DNA (eukDNA; p =ns), die adaptive T-Zellantwort um 90% supprimierte (Abb. 1A). Da dieser Effekt bei TLR9-KO-Mäusen gänzlich aufgehoben war, ist TLR9 als zentraler Mittler

der mtDNA-induzierten Abnahme der zytotoxischen T-Zellaktivität anzusehen. Ferner konnten wir eine Reihe dieser Immunsuppression zu Grunde liegenden Mechanismen aufzeigen. So führten mtDNA und CpG-DNA zu einer veränderten Milzmorphologie (Splenomegalie, veränderte Mikroarchitektur). Funktionell war in Folge von mtDNA und CpG-DNA die Antigenkreuzpräsentationsfähigkeit reduziert (IL2 und Interferon γ ; WT-Mäuse: CpG vs. Kontrolle, p <0,0001; mtDNA vs. Kontrolle, p <0,0001; hingegen TLR9 KO: CpG und mtDNA vs. Kontrolle; p =ns). Insbesondere war die für die Induktion CD8-vermittelter T-Zellantworten essentielle Population der CD8⁺DEC205⁺ DC bei WT-Mäusen (CpG vs. Kontrolle p <0,0001; mtDNA vs. Kontrolle p <0,0001) im Vergleich zu TLR9-KO-Mäusen (alle p =ns) drastisch reduziert (Abb. 1B). Darüber hinaus war nach mtDNA und CpG-DNA-Injektion die Kynurenin-Serumkonzentration bei WT-Mäusen signifikant erhöht (Kontrolle: 1,1 μ M \pm 0,2; CpG: 7,8 μ M \pm 1; mtDNA: 7,8 μ M \pm 1,2, p <0,0001 vs. Kontrolle; Abb. 1C). Analog zu mtDNA-behandelten Mäusen war die Kynurenin-Serumkonzentration bei septischen Patienten gegenüber Blutspendern ebenfalls stark erhöht (11,8 μ M \pm 12,2 vs. 2,7 μ M \pm 2,6; p <0,0001).

Interpretation

Mitochondriale DNA supprimiert also TLR9-abhängig die adaptive Immunantwort bei Mäusen und vermag eine Immunparalyse auszulösen, zudem ist die mtDNA-Serumkonzentration bei septischen Patienten erhöht. Da ein Teil der Mechanismen, die wir bei Mäusen beobachtet haben, ein Korrelat beim Menschen hat, scheint eine Übertragung unserer Ergebnisse auf den Menschen möglich. So wurde von Hotchkiss [3] beschrieben, dass septische Patienten neben Splenomegalie und

Abbildung 1

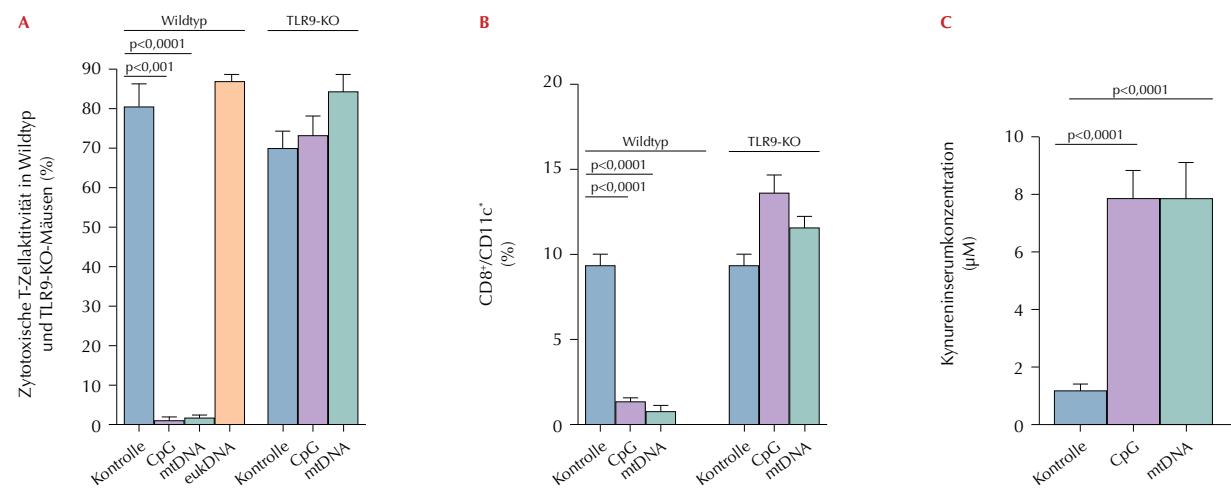


Abb. 1A: Zytotoxische T-Zellaktivität in Wildtyp- und TLR9-KO-Mäusen: mtDNA und CpG führen zu einer 90%igen Abnahme der zytotoxischen T-Zellaktivität in Wildtyp-, jedoch nicht in TLR9-KO-Mäusen. Genomische DNA (eukDNA) hat keinen immunsuppressiven Effekt (n=8).

Abb. 1B: Anteil CD8+ dendritischer Zellen (DC): mtDNA und CpG führen zu einer 80%igen Abnahme des Anteils CD8+ DC in Wildtyp-, nicht jedoch in TLR9-KO-Mäusen (n=8).

Abb. 1C: Kynureninserumkonzentration in Wildtyp-Mäusen: CpG und mtDNA führen zu einer Zunahme der Kynureninserumkonzentration (n=8).

zerstörter Milz-Mikroarchitektur eine drastische Deletion von Immunzellen aufweisen, wenngleich mtDNA als Auslöser bisher unbekannt war. Ferner konnten wir zeigen, dass mtDNA offenbar die Indolamin-2,3-Dioxygenase induziert (Erhöhung der Kynurenin-Serumkonzentration) und die für die Antigenkreuzpräsentation relevanten CD8+DEC205+ DC bei Wildtyp-Mäusen massiv reduziert sind. Unsere Ergebnisse sprechen dafür, dass a) das septische Krankheitsbild neben Bakterien auch durch endogene TLR-Liganden induziert bzw. prolongiert wird und b) mitochondriale DNA eine Immunparalyse induzieren kann.

Literatur

1. Schwandt T, Schumak B, Gielen GH: Expression of type I interferon by splenic macrophages suppresses adaptive immunity during sepsis. *EMBO* 2011;31:201-13
2. Zhang Q, Raoof M, Chen Y: Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature* 2010;464:104-7
3. Hotchkiss RS, Karl IE: The pathophysiology and treatment of sepsis. *NEJM* 2003;348:138-150.

Zirkulierende mitochondriale DNA – Ursache des postoperativen systemischen inflammatorischen Response-Syndroms?

S.T. Schäfer¹ · S. Frede^{2,3} · L. Cox¹ · M. Rabeling¹ · A. M. Westendorf⁴ · A. Engler¹ · M. Adamzik¹ · J. Fandrey² · J. Peters¹

1 Klinik für Anästhesiologie & Intensivmedizin

2 und Institut für Physiologie

Universität Duisburg-Essen

3 Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin, Universität Bonn

4 Institut für medizinische Mikrobiologie, Universitätsklinikum Essen

Korrespondenz: simon.schaefer@uni-due.de

Fragestellung

Die Ursachen des postoperativen systemischen inflammatorischen Response-Syndroms (SIRS) sind unklar [1]. Da mitochondriale DNA (mtDNA) bei Polytraumatisierten in der Zirkulation nachweisbar wird und in vitro immunstimulatorisch auf neutrophile Granulozyten [2] sowie myeloische Zellen [3] wirkt, könnte eine Freisetzung endogener Toll-Like-Rezeptor-Liganden eine Ursache von SIRS sein. Es ist jedoch unbekannt, ob Operationstraumata überhaupt zu einer Freisetzung von mtDNA in die Zirkulation führen und ob diese in vivo Einfluss auf die inflammatorische Genregulation hat. Wir testeten die Thesen, dass mtDNA 1) bei abdominalchirurgischen Operationen in der Zirkulation nachzuweisen ist und 2) HIF-1 α postoperativ induziert ist.

Methodik

Nach Genehmigung durch die Ethikkommission wurde die Serumkonzentration freier

mtDNA (D-Loop, ATPase 6) bei 91 abdominalchirurgischen Patienten 24h postoperativ bestimmt sowie die leukozytäre mRNA-Expression von HIF-1 α und des für die Zelladhäsion verantwortlichen HIF-Zielgens (CD11b) im Vergleich zu 53 gesunden Blutspendern analysiert. Auch erfolgten bei 11 dieser abdominalchirurgischen Patienten Blutentnahmen im Zeitverlauf, nämlich vor Narkoseeinleitung sowie vor Hautschnitt, Hautnaht sowie am postoperativen Tag 1, 3 und 7. Statistik: Mittelwerte \pm SD; Mann-Whitney-U-Test; Ein-Weg-ANOVA für wiederholte Messungen mit Post hoc-t-Test, $p=0,05/n$; Spearman-Korrelation.

Ergebnisse

Nach Bauchoperationen war die freie mtDNA-Serumkonzentration am 1. postoperativen Tag 9,2-fach (D-Loop) bzw. 13,9-fach (ATPase 6) erhöht, HIF-1 α in zirkulierenden Leukozyten jedoch supprimiert (0,6-fach \pm 0,85, $p<0,0001$). Postoperative Patienten wiesen am ersten postoperativen Tag im Vergleich zu Blutspendern eine erhöhte Leukozytenkonzentration (11,4 $\text{nl}^{-1}\pm 4$ vs. 6,3 $\pm 1,5$; $p<0,0001$), Temperatur (37,2°C $\pm 0,8$ vs. 36,7°C $\pm 0,2$; $p<0,01$), Herzfrequenz (87 $\text{min}^{-1}\pm 18$ vs. 72 $\text{min}^{-1}\pm 9$; $p<0,0001$) sowie erniedrigten diastolischen Blutdruck (63 mmHg ± 12 vs. 81 mmHg ± 9 ; $p<0,0001$) unter einer Noradrenalindosierung von im Mittel 0,28 mg $\text{h}^{-1}\pm 0,8$ auf. Auch war die Interleukin-6-Serumkonzentration bei postoperativen Patienten (184 pg $\text{ml}^{-1}\pm 19$) im Vergleich zu gesunden Blutspendern (17 pg $\text{ml}^{-1}\pm 45$) ca. 10-fach erhöht ($p<0,0001$). Die leukozytäre HIF-1 α -mRNA-Expression 24h postoperativ korrelierte invers mit dem Simplified Acute Physiology Score II (SAPS II, $p<0,0001$). Im Zeitverlauf war die mitochondriale D-Loop-Serumkonzentration vor

Hautnaht im Vergleich zur Narkoseeinleitung 2,57-fach $\pm 1,7$ ($p<0,01$; Abb. 1) erhöht, die ATPase-6-Serumkonzentration 2,54-fach $\pm 2,0$ ($p<0,01$) und die HIF-1 α -Expression in zirkulierenden Leukozyten induziert (2,3-fach $\pm 2,2$ vs. vor Narkoseeinleitung; $p<0,001$). Bereits am ersten postoperativen Tag fiel die HIF-1 α -mRNA-Expression ab (0,72 $\pm 0,25$, $p=0,002$ vs. Hautnaht; $p=n.s.$ vs. vor Narkoseeinleitung; Abb. 2). Das nachgeschaltete, für die Zelladhäsion verantwortliche HIF-1-Zielgen das β -Integrin CD11b folgte der HIF-1 α -Expression und war bei Hautnaht noch 3,1-fach $\pm 3,9$ ($p<0,0001$), am postoperativen Tag 1 nur noch 2,7-fach $\pm 3,1$ ($p<0,01$) erhöht.

Interpretation

Bauchoperationen evozieren das Auftreten von mtDNA in der Zirkulation. Dies wirkt auf monozytäre Zellen immunstimulatorisch und induziert kurzfristig HIF-1 α , den Schlüsselregulator der hypoxisch-inflammatorischen Genregulation. Somit könnte zirkulierende mtDNA am Auftreten eines postoperativen SIRS beteiligt sein.

Literatur

1. Balk R.A: Systemic inflammatory response syndrome (SIRS) Where did it come from and is it still relevant today? Virulence 2013;5:1-7
2. Zhang Q, Raoof M, Chen Y: Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. Nature 2010;464:104-7
3. Schäfer S.T, Adamzik M, Frede S: Toll-like-Rezeptor-Liganden supprimieren die Immunantwort bei Sepsis: In-vitro-Versuche, Experimente an TLR-9-Knockout-Mäusen und klinische Daten. Anästh Intensivmed 2013;54:364.

Abbildung 1 und 2

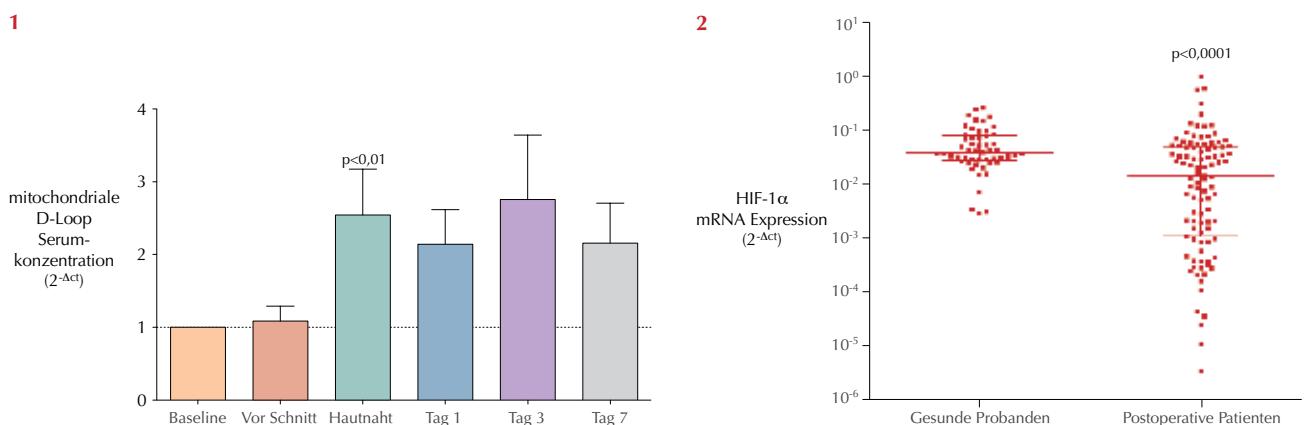


Abb. 1: Mitochondriale D-Loop-Serumkonzentration bei abdominalchirurgischen Patienten: Bauchoperationen führen zum Auftreten mitochondrialer DNA in der Zirkulation. Bereits bei Hautnaht ist die D-Loop-Serumkonzentration stark erhöht ($p<0,01$).

Abb. 2: mRNA-Expression des Hypoxie-induzierbaren Faktors-1 α (HIF-1 α) bei postoperativen Patienten im Vergleich zu gesunden Blutspendern: Die leukozytäre HIF-1 α -mRNA-Expression ist am ersten postoperativen Tag im Vergleich zu gesunden Probanden um 40% reduziert ($p<0,0001$).

Isofluran verstärkt den neuronalen Zellschaden in vitro und in vivo durch Aktivierung von p75^{NTR} und NF-κB

N. Schallner¹ · F. Ulbrich¹ · H. Engelstädt¹ · J. Biermann² · V. Auwärter³ · U. Göbel¹

1 Anästhesiologische Universitätsklinik
2 Universitätsaugenklinik und

3 Institut für Rechtsmedizin
Universitätsklinikum Freiburg

Korrespondenz: nschalln@bidmc.harvard.edu

Fragestellung

Isofluran kann sowohl protektiv als auch schädigend auf neuronale Zellen wirken [1,2]. Die Aktivierung des p75-Neurotrophin-Rezeptors (p75^{NTR}) mit folgender NF-κB-Aktivierung induziert Apoptose in neuronalen Zellen [3]. Wir stellen aus diesem Grund die Hypothese auf, dass die volatilen Anästhetika Iso-, Sevo- und Desfluran den Zelltod in durch Hypoxie vorgesägten neuronalen Zellen in vitro und in vivo durch Aktivierung von p75^{NTR} und NF-κB signifikant verstärken.

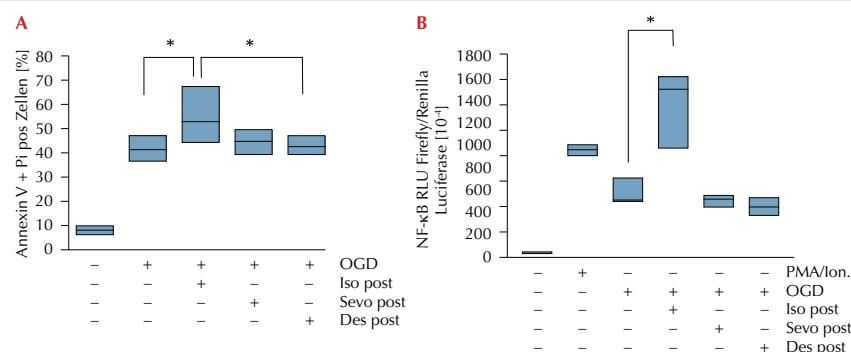
Methodik

Der neuronale Zelltod von SH-SY5Y-Zellen wurde in vitro durch Sauerstoff-Glukose-Entzug (OGD, oxygen-glucose deprivation, 16h) induziert. Iso-, Sevo oder Desfluran (1,2 MAC, 2h), wurde entweder vor oder nach OGD appliziert. Die Anästhesiegas-Konzentrationen im Zellmedium wurden mittels Gaschromatographie gemessen. Die Zellschädigung wurde mittels Durchfluss-Zytometrie (Annexin V/Propidium Jodid (AV/PI)) und Bestimmung der LDH-Konzentration im Zellüberstand quantifiziert. Mittels Western Blot, DNA-Bindungs-ELISA und Luziferase-Assay wurde die NF-κB-Aktivierung analysiert. Die Rolle von p75^{NTR} wurde durch pharmakologische Inhibition (p75^{NTR}-Inhibitor TAT-pep5) und siRNA-knockdown analysiert. Um den Effekt von Isofluran auf den neuronalen Zelltod in vivo zu untersuchen, wurde bei Sprague-Dawley-Ratten (n=6 pro Gruppe) nach Genehmigung durch das Regierungspräsidium eine transiente (1h) retinale Ischämie mit Reperfusion (IRI) induziert. Es folgte eine Isofluran-Inhalation (1,2 MAC für 2h). Sieben Tage nach der Ischämie erfolgte die Quantifizierung der retinalen Ganglienzell (RGC)-Dichte. Daten werden graphisch als Median ±max/min und im Text als Median [25./75. Perzentile] dargestellt. Der statistische Vergleich erfolgte für die In-vitro-Daten mittels One-way-ANOVA mit Post-hoc-Holm-Sidak-Test. Die In-vivo-Daten wurden mittels Two-way-ANOVA verglichen. Ein p<0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

Ergebnisse

Die Applikation von Isofluran, aber nicht von Sevo- oder Desfluran, nach OGD-Schädigung

Abbildung 1

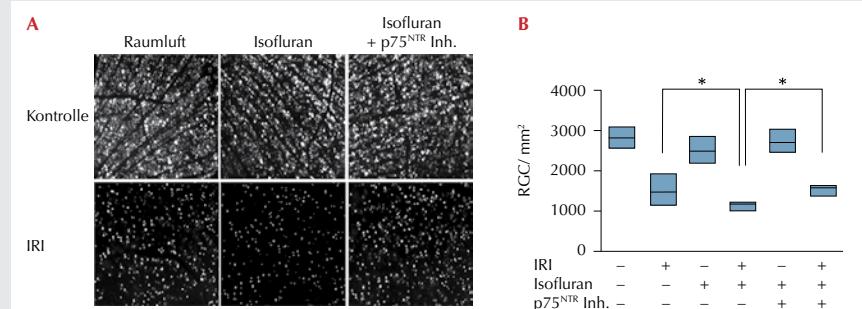


Einfluss volatiler Anästhetika auf den OGD-induzierten neuronalen Zelltod und die NF-κB-Aktivität.

A: Durchfluss-Zytometrie nach AV/PI-Färbung (% AV/PI positiver Zellen, n=8, Median ±max/min, * = p<0,05 OGD vs. OGD+Iso und OGD+Iso vs. OGD+Des).

B: Relative Lumineszenz-Einheiten (RLU) in neuronalen Zellen nach Luziferase-Vektor-Transfektion mit NF-κB response element (n=6, Median ±max/min, * = p<0,05 OGD vs. OGD +Iso).

Abbildung 2



Einfluss von inhalativ applizierten Isofluran auf die RGC-Dichte nach IRI in vivo.

A: Repräsentative Flachpräparat-Bilder von Fluorogold-markierten RGC 7 Tage nach IRI und Isofluran-Exposition ± p75^{NTR}-Inhibition.

B: Quantifizierung der RGC-Dichte (Zellen/mm², n=6, Median ±max/min, * = p<0,05 IRI vs. IRI+Iso und IRI+Iso vs. IRI+Iso+p75^{NTR}-Inhibitor).

verstärkte den Zellschaden (Abb. 1A; AV/PI positive Zellen: OGD 41,1% [39,0/43,3] vs. OGD+Iso 48,5 [46,4/63,4], p<0,05; LDH, relative Veränderung vs. OGD: Iso 1,8 [1,7/2,0] vs. Sevo 1,1 [1,1/1,2] und Des 1,1 [1,1/1,2], p<0,05). Isofluran-Applikation nach OGD induzierte die NF-κB-DNA-Bindung und transkriptionelle Aktivität (Abb. 1B; relative Lumineszenz-Einheiten: OGD 500 [499/637] vs. OGD+Iso 1578 [1363/1643], p<0,05). Die pharmakologische Inhibition und der siRNA-knockdown von p75^{NTR} verhinderten die Verstärkung der neuronalen Zellschädigung durch Isofluran (AV/PI-positive Zellen; p75^{NTR} siRNA: OGD 42,2% [40,0/45,3] vs. OGD+Iso 44,9 [44,2/46,6], n.s.). Die Isofluran-Applikation in vivo (Abb. 2A+B) erhöhte den RGC-Verlust nach IRI (IRI 1479 RGC/mm² [1311/1697] vs. IRI+Iso 1170 [1093/1211], p<0,05). Die schädigenden

Effekte von Isofluran wurden durch p75^{NTR}-Inhibition komplett aufgehoben (IRI+Iso+TAT-pep5 1577 RGC/mm² [1436/1624] vs. IRI+Iso 1170 [1093/1211], p<0,05).

Interpretation

Isofluran, nicht aber Sevofluran und Desfluran, verstärkt den neuronalen Zellschaden in vorgesägten Neuronen durch eine Aktivierung von p75^{NTR} und NF-κB. Diese Ergebnisse könnten in Zukunft die Wahl des volatilen Anästhetikums bei Patienten mit neuronaler Vorschädigung oder Risikofaktoren hierfür beeinflussen.

Literatur

- Lee JJ, et al: Anesthesiology 2008;108:1055-62
- Wei H, et al: Anesthesiology 2008;108:251-60
- Bai Y, et al: Neurosci Res 2008;62:9-14.

Netrin-1 fördert die hepatische Regeneration nach Ischämie-Reperfusions schaden

P.M. Schlegel · D. Köhler · A. Körner · H. Frohnmeier · V. Mirakaj

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

Korrespondenz:

Martin.Schlegel@uni-tuebingen.de

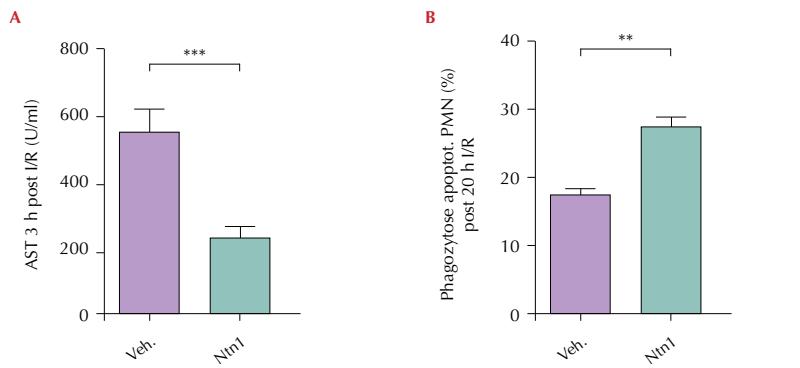
Fragestellung

Eine akute Entzündungsreaktion, die durch ein Gewebetrauma oder durch eine mikrobielle Invasion bedingt sein kann, gliedert sich in eine Früh- und eine Spätphase [1]. Die initiale Phase ist durch die Extravasation und Infiltration neutrophiler Granulozyten (PMN) in das betroffene Gewebsareal gekennzeichnet, während die späte Phase, die sogenannte Resolutionsphase, durch die Reduktion der PMN, die Rekrutierung von Monozyten und deren Differenzierung zu Makrophagen, sowie durch die Phagozytose apoptotischer PMN charakterisiert ist. Diese Prozesse werden durch Chemokine, Zytokine und Lipidmediatoren gesteuert [1,2]. Neuere Arbeiten konnten eine wichtige Rolle des Neuronalen Guidance-Proteins Netrin-1 während der Frühphase der akuten Entzündungsreaktion zeigen [3]. Die Rolle von Netrin-1 im Rahmen des hepatischen Ischämie-Reperfusions schadens ist bisher nicht bekannt.

Methodik

Die Tierversuchsgenehmigung des zuständigen Regierungspräsidiums lag vor. In vitro wurde die Expression von Netrin-1 nach Stimulation mit TNF- α in humanen PMN und Makrophagen mittels mRNA-Analyse und Immunhistochemie bestimmt. Zudem wurde die Phagozytose apoptotischer PMN nach Stimulation mit Netrin-1 untersucht. In vivo wurde in einem etablierten murinen Modell der hepatischen Ischämie-Reperfusion (I/R) durch Ligatur der A. hepatica sinistra für 30min bei WT Ntn1 $^{+/+}$ (\pm 1 μ g Netrin-1 i.v. Injektion) und bei Ntn1 $^{/-/-}$ -Mäusen die Rekrutierung und Differenzierung immunmodulatorischer und pro-resolutionärer Zellen im hepatischen Gewebe mittels Durchfluszytometrie (FACS) evaluiert. Zusätzlich wurde der hepatische Schaden durch die Bestimmung der Laktatdehydrogenase (LDH), Aspartat- (AST), und Alanin-Aminotransferase (ALT) im Serum eruiert. Des Weiteren wurden im Gewebe die Konzentrationen von TNF- α , Interleukin-1 β , Interleukin-6 und keratinocyte-derived chemokine (KC) mittels ELISA sowie die Phagozytose apoptotischer PMN mittels FACS-Analyse bestimmt. Die Daten wurden mittels Student's t-Test und ANOVA ausgewertet.

Abbildung 1



Rolle von Ntn1 in der Leber nach I/R:

A) Netrin-1 verminderte signifikant AST-Wert 3 h nach I/R

B) Netrin-1 erhöht die Phagozytose apoptotischer PMN in vivo 20 h nach I/R (n=6, **p<0.01, ***p<0.001).

Ergebnisse

In vitro konnte sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene eine Reduktion der Expression von Netrin-1 nach TNF- α -Stimulation in PMN und Makrophagen nachgewiesen werden. Die Stimulation mit Netrin-1 führte zu einem signifikanten Anstieg der Phagozytose apoptotischer PMN durch Makrophagen im Phagozytose-Assay. In vivo zeigte sich in der Frühphase der Entzündungsreaktion (3h nach Reperfusion) bei Ntn1 $^{+/+}$ -Mäusen verglichen mit WT-Mäusen ein signifikant stärkerer Schaden nach Leber I/R (U/ml; Ntn1 $^{+/+}$: LDH 253,8 \pm 15,2; ALT 116,2 \pm 20,46; AST 3629 \pm 267,5; vs. Ntn1 $^{+/+}$: LDH 356,9 \pm 34,7; ALT 200,8 \pm 14,06; AST 6099 \pm 689,5; p<0,05; p<0,01; n=6). Dies war mit einer Reduktion der MPO-Aktivität und einer reduzierten Infiltration neutrophiler Granulozyten assoziiert. Des Weiteren waren die pro-inflammatoryen Zytokinspiegel bei Ntn1 $^{+/+}$ -Mäusen signifikant erhöht. Die Injektion von Netrin-1 bei WT-Mäusen führte zu einer signifikanten Reduktion der Serumenzyme (LDH, ALT und AST) (Abb. 1A) nach I/R und war sowohl mit einer signifikanten Reduktion der MPO-Aktivität, einer reduzierten Infiltration neutrophiler Granulozyten als auch einer signifikanten Reduktion der pro-inflammatoryen Zytokinkonzentrationen assoziiert. In der Spätphase der Entzündungsreaktion (20h nach Reperfusion) zeigte sich bei den Ntn1 $^{+/+}$ -Mäusen eine verminderte Auflösung des hepatischen Schadens nach I/R. Diese stellte sich in einem signifikanten Anstieg der pro-inflammatoryen Monozyten (Ly6C $^{\text{hi}}$ (%); Ntn1 $^{+/+}$: 9,4 \pm 1,2 vs. Ntn1 $^{+/+}$: 14,1 \pm 2,4, p<0,05; n=6) sowie einer signifikanten Verminderung der Phagozytose apoptotischer PMN dar. Die Injektion von Netrin-1 führte bei WT-Mäusen zu einem signifikanten Anstieg der

anti-inflammatoryen Monozyten (Ly6C $^{\text{low}}$ (%); Vehikel: 13,7 \pm 2,0 vs. Ntn1: 27,5 \pm 1,4; p<0,01; n=6) und zu einem signifikanten Anstieg der Phagozytose apoptotischer PMN (%; Vehikel: 17,5 \pm 0,9 vs. Ntn1: 27,6 \pm 1,2; p<0,01; n=6; Abb. 1B).

Interpretation

Netrin-1 reduziert in der initialen Phase der Entzündungsreaktion die Infiltration neutrophiler Granulozyten, die Serumleberenzyme sowie die Expression der pro-inflammatoryen Zytokine. Netrin-1 erhöht in der Spätphase die Expression der anti-inflammatoryen Monozyten sowie die Phagozytose apoptotischer PMN. Netrin-1 besitzt somit sowohl anti-inflammatoryische als auch pro-resolutionäre Funktionen während des durch Ischämie-Reperfusion induzierten hepatischen Schadens.

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: Resolvins and Protectins in Inflammation Resolution. *Chem Rev* 2011;Oct12;111(10):5922-43
3. Mirakaj V, Laucher S, Mielke C, Morote-Garcia JC, Unerl KE, Rosenberger P: Netrin-1 dampens Pulmonary Inflammation during Acute Lung Injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;Apr15;181(8):815-24.

Lungenprotektive PEEP-Einstellung während intraoperativer Beatmung: mit Standardwerten oder auf Basis der Atemmechanikanalyse?

J. Spaeth · S. Wirth · M. Baur · H. Bürkle · S. Schumann

Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin, Universitätsklinikum Freiburg

Korrespondenz:

johannes.spaeth@uniklinik-freiburg.de

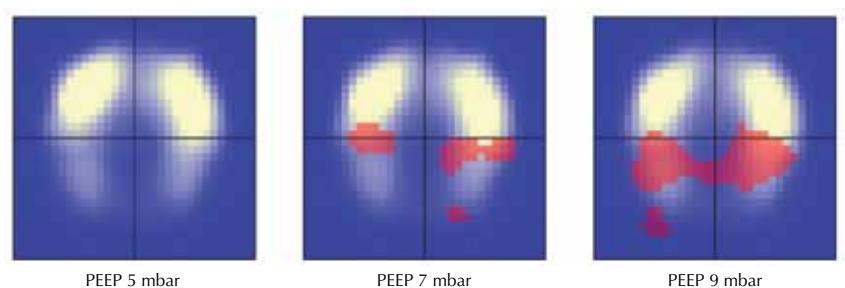
Fragestellung

Die Anwendung einer lungenprotektiven Beatmungsstrategie mit einem positiv-endexpiratorischen Druck (PEEP) kann bei abdominalchirurgischen Eingriffen postoperative pulmonale Komplikationen reduzieren [1]. Dabei wird eine an empirisch ermittelten Standardwerten orientierte PEEP-Einstellung vorgenommen, die nicht an objektiven Messwerten ausgerichtet ist. Die vorliegende Arbeit überprüft die Hypothese, dass bei einer intraoperativen, volumenkontrollierten Beatmung (VCV) lungengesunder Erwachsener ein auf der Basis einer atemmechanischen Analyse eingestellter PEEP einem empirisch eingestellten PEEP überlegen ist.

Methodik

Nach Votum der Ethikkommission der Universität Freiburg wurden im Rahmen einer (1) Beobachtungsstudie (n=34) und einer (2) Interventionsstudie (n=26) insgesamt 60 lungengesunde Patienten bei elektiven Operationen (ohne Pneumoperitoneum) mit VCV untersucht. Anhand der kontinuierlich aufgezeichneten respiratorischen Größen Atemwegsdruck (P_{aw}), Fluss (V') und Volumen (V) wurde die intratidale Volumen-abhängige Compliance $C(V)$ mittels 'gliding'-Slice-Methode berechnet [2]. Primärer Endpunkt der Beobachtungsstudie war die atemmechanische Analyse des empirisch eingestellten PEEP anhand der intratidalen Compliance-Volumen-Kurven, die in 6 Formkategorien [3] klassifiziert wurden: Kategorie (1) horizontales Compliance-Profil: optimale PEEP-Einstellung, (2) ansteigendes Profil: intratidale Derekrutierung, (3) ansteigendes Profil mit

Abbildung 1



Profil quantitativer EIT-Bildauswertung, Mittelwert von 26 Patienten für die PEEP-Stufen 5, 7 und 9 mbar unter VCV. Rote Pixel: $p < 0,05$ im Vergleich zu PEEP 5 mbar.

Übergang in horizontalen Verlauf, (4) horizontales Profil mit Übergang in abfallenden Verlauf, (5) abfallendes Profil: Überdehnung, (6) ansteigendes Profil mit Übergang in horizontalen und abfallenden Verlauf.

In der anschließenden Interventionsstudie erfolgte eine schrittweise Anhebung des PEEP-Niveaus von 5 auf 7 und 9 mbar. Am Ende jedes Beatmungsintervalls von 20 min Dauer wurden die lokalen Ventilationsverhältnisse mittels Elektroimpedanz-Tomographie (EIT) über einen Zeitraum von 5 min gemessen. Primärer Endpunkt war der bildpunktweise Vergleich der intratidalen Impedanzänderung zwischen den PEEP-Stufen mittels t-Test (Signifikanzwert $p < 0,05$, Bonferroni-Korrektur für 1024 Vergleiche).

Ergebnisse

Die demographischen Daten beider Untersuchungskollektive waren in Bezug auf Alter und Body-Mass-Index (BMI) vergleichbar. In der Beobachtungsgruppe (Alter 21-73 Jahre, Median 51 Jahre, BMI $26,4 \pm 4,9 \text{ kg/m}^2$) zeigte sich innerhalb der ersten 120 min ein Abfall der mittleren Compliance um 10% im Vergleich zum Ausgangswert unmittelbar nach endotrachealer Intubation. Die Volumen-abhängige Compliance wurde in 1232 Zeitabschnitten von jeweils 5 min Dauer (mittlere Compliance = 61 ml/mbar ; 40-86 ml/mbar) erfasst und kategorisiert. Kategorie 2 (intratidale Derekrutierung-Atelektasen) trat bei höherem PEEP signifikant weniger häufig auf (Tab. 1).

In der Interventionsuntersuchung (Alter 18-86 Jahre, Median 49 Jahre, BMI $26,6 \pm 5,3 \text{ kg/m}^2$) zeigte der Vergleich der EIT-Darstellungen (Auflösung: 32 x 32 Pixel) unter schrittweiser PEEP-Erhöhung eine Zunahme der intratidalen Impedanzänderung in den dorsalen Lungenarealen (PEEP = 7 mbar: +8,3%; PEEP = 9 mbar: +18,2%; t : $p < 0,001$ relativ zur intratidalen Impedanzänderung bei PEEP = 5 mbar).

Interpretation

Die Ergebnisse zeigen, dass der empirisch eingestellte PEEP während intraoperativer Beatmung niedriger war als der auf Basis der Patienten-individuellen Atemmechanikanalyse identifizierte optimale PEEP und dass die Atelektasenhäufigkeit bereits durch eine geringe PEEP-Erhöhung reduziert werden konnte. Die Einstellung der intraoperativen Beatmung lungengesunder Erwachsener auf Basis der Analyse der intratidalen $C(V)$ -Kurven bietet die methodische Voraussetzung – aus atemmechanischer Sicht – den optimalen PEEP einzustellen und dadurch die Beatmung lungenprotektiv zu gestalten.

Literatur

1. Futier E: N Engl J Med 2013;369:428-37
2. Schumann S: Physiol Meas 2009;30:1341-56
3. Mols G: Intensive Care Med 1999;25:1084-91.

Tabelle 1

Häufigkeiten des Auftretens der Formkategorien aus 1232 Zeitabschnitten bei 34 konsekutiven Patienten unter VCV bei elektivem Eingriff. * = $p < 0,001$ im Vergleich zu PEEP < 5,5 mbar.

Formkategorie	1	2	3	4	5	6
Gesamt (n = 1232)	90 (7,3%)	163 (13,2%)	975 (79,1%)	0	0	4 (0,3%)
PEEP < 5,5 mbar (n = 726)	31 (4,2%)	135 (18,6%)	558 (76,9%)	0	0	2 (0,3%)
PEEP > 5,5 mbar (n = 506)	59 (11,7%)	28 (5,5%)*	417 (82,4%)	0	0	2 (0,4%)

Differentielle Genexpression unter protektiver Beatmung mit variablen Tidalvolumina bei lungengesunden, akut und chronifiziert lungen-geschädigten Ratten

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

Pulmonary Engineering Group,
Klinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie,
TU Dresden

Korrespondenz:
peter.spieth@uniklinikum-dresden.de

Fragestellung

Der Einsatz protektiver Beatmungsstrategien stellt einen Therapiestandard in der Behandlung der akuten Lungenschädigung dar und gewinnt auch für die Beatmung nicht geschädigter Lungen zunehmend an Bedeutung. Die Anwendung variabler Tidalvolumina kann diese protektiven Effekte noch verbessern [1], allerdings sind die molekularen Mechanismen hierfür bisher nicht untersucht. In dieser Studie wurden erstmalig durch transkriptomweite Analyse der RNA-Expression die molekularen Auswirkungen von protektiver Beatmung an gesunden sowie lungengeschädigten Ratten untersucht. Wir untersuchten die Hypothese, dass sich die Genexpression unter protektiver mechanischer Beatmung zwischen konventioneller und variabler Beatmung unterscheidet.

Methodik

Für die Versuche wurden nach behördlicher Genehmigung insgesamt 64 männliche Sprague-Dawley-Ratten (250-350g) verwendet. Die intraperitoneale Induktion und kontinuierliche intravenöse Aufrechterhaltung der Narkose erfolgte mit Ketamin/Midazolam, die Muskelrelaxation mit Atracurium. Neben lungengesunden Ratten erfolgte bei jeweils 8 Tieren pro Gruppe die Induktion einer Lungenschädigung durch intratracheale Instillation von 0,2N Salzsäure (1,2 ml/kg akute Schädigung, 0,5 ml/kg chronifizierte Schädigung). Die lungengesunden und akut geschädigten Tiere wurden unmittelbar, die Tiere mit chronifizierter Schädigung 14 Tage nach Salzsäureinstillation randomisiert für 4h mit konventioneller oder variabler volumenkontrollierter Beatmung behandelt. Die Beatmungseinstellungen waren: FIO_2 0,35; PEEP 5 cmH₂O; Atemfrequenz 80/min; Tidalvolumen 6 ml/kg; unter variabler Beatmung mittleres

Tabelle 1
Ergebnisse der transkriptomweiten RNA-Sequenzierung.

Lungengesund				Akute Lungenschädigung				Chronifizierte Lungenschädigung			
USP50	+3,7	HFE2	-6,2	SNORA40	+5,0	D3ZTT9	-3,4	MYH7	+8,8	CTR2	-4,9
SLC5A2	+3,0	ACTN2	-4,7	SLC26A3	+5,0	UCMA	-2,8	MYH6	+7,7	FOSL1	-4,6
SLC10A1	+2,9	DGKB	-4,5	D4A241	+4,4	CRABP1	-2,6	MB	+7,5	CELA2A	-4,0
MOG	+2,6	MYH6	-4,5	PROKR2	+4,2	SMPX	-2,5	CSRP3	+6,3	LHX9	-3,4
STEAP1	+2,6	MYH7	-4,4	U2	+3,9	PAX9	-2,3	ACTN2	+5,8	JUND	-3,1

Tidalvolumen 6 ml/kg, Variationskoeffizient des Tidalvolumens 30%. Jeweils acht nicht-beatmete Tiere ohne bzw. mit chronifizierter Schädigung dienten als Kontrolltiere. Die transkriptomweite RNA-Expressionsanalyse erfolgte mittels next generation sequencing (Hiseq 2000, Illumina). Die False-Discovery-Rate wurde auf <10% festgelegt und mittels Benjamini-Hochberg-Korrektur adjustiert. Die Berechnung der differentiellen Genexpression erfolgte mittels DESeq R Software, die Identifikation zentraler Signalwege durch Ingenuity Pathway Analysis (Qiagen).

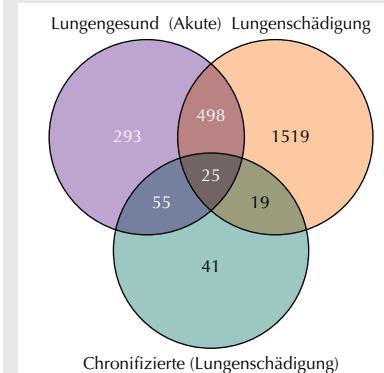
Ergebnisse

Unter der Anwendung variabler Beatmung zeigte sich in den drei Versuchsarmen eine signifikante Verbesserung von Gasaustausch und Lungenmechanik. Die histologische Analyse sowie die molekularbiologischen Untersuchungen klassischer Entzündungsmediatoren ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen den Therapiegruppen. Zwischen konventioneller und variabler Beatmung wurden jeweils 871 (lungengesund), 2061 (akute Schädigung) und 140 (chronifizierte Schädigung) differentiell exprimierte Gene identifiziert. 25 Gene waren unabhängig davon zwischen konventionell und variabel beatmeten Tieren in allen drei Versuchsarmen differentiell exprimiert. Statistisch überrepräsentiert waren hierbei Gene des Sonic-Hedgehog- und des Notch-Signalwegs. Tabelle 1 zeigt die wichtigsten Ergebnisse der transkriptomweiten RNA-Sequenzierung; Abbildung 1 ein Venn-Diagramm mit der Verteilung der differentiell exprimierten Gene in den drei Studienarmen.

Interpretation

Insbesondere im Rahmen der akuten Lungenschädigung konnte eine Vielzahl differentiell exprimierter Gene zwischen konventioneller und variabler Beatmung beobachtet wer-

Abbildung 1



Venn-Diagramm mit der Anzahl differentiell exprimierter Gene im Vergleich zwischen konventioneller und variabler Beatmung. Unabhängig vom Studienarm waren 25 Gene zwischen den Beatmungsstrategien differentiell reguliert. Innerhalb dieser Gruppe sind Gene des Sonic-Hedgehog- und des Notch-Signalwegs überrepräsentiert.

den. Die im Rahmen der Ingenuity Pathway Analysis gefundene Überrepräsentation des Sonic-Hedgehog- und des Notch-Signalwegs unter Beatmung mit variablen Tidalvolumina ist von besonderem Interesse, da diese beiden Signalwege bereits mit idiopathischer Lungenfibrose bzw. COPD, nicht jedoch mit beatmungsassoziierten Lungenschädigungen in Verbindung gebracht wurden. In zukünftigen Studien sollte die biologische Signifikanz dieser Signalwege für die Entstehung der beatmungsassoziierten Lungenschädigung sowie Mechanismen der Beatmung mit variablen Tidalvolumina näher untersucht werden.

Literatur

1. Spieth PM, et al: Am J Respir Crit Care Med 2009 Apr 15;179(8):684-93.

Die Bedeutung klinisch relevanter Cyclooxygenase-1- und -2-Inhibitoren im Rahmen der Kardioprotektion durch Anästhetika-induzierte Postkonditionierung

J. Stumpner · A. Frank · M. Balz · N. Roewer · T. Smul

Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie, Universitätsklinikum Würzburg

Korrespondenz: Stumpner_J@ukw.de

Fragestellung

Die Gabe volatiler Anästhetika in der frühen Reperfusionsphase nach myokardialer Ischämie (Anästhetika-induzierte Postkonditionierung, APOST) zeigt in der experimentellen Situation reproduzierbar protektive Effekte im Sinne einer ausgeprägten Reduktion der Herzinfarktgröße [1]. In klinischen Studien sind diese Ergebnisse bislang nur eingeschränkt nachvollziehbar [2]. Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz liegt in der patienteneigenen Dauermedikation. Hemmstoffe der Cyclooxygenasen (COX)-1 und -2 sind weit verbreitete Analgetika und Antiphlogistika. Der COX-2-Inhibitor Celecoxib hebt die Anästhetika-induzierte Präkonditionierung [3] gegen Myokardinfarkt auf. Wir testeten daher die Hypothese, dass die APOST durch klinisch relevante Hemmstoffe der COX-1 und -2 aufgehoben wird.

Methodik

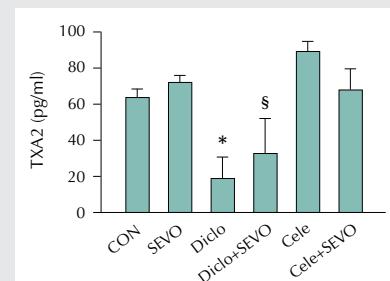
Nach Genehmigung durch die zuständige Behörde wurden männliche C57BL/6-Mäuse (n=56) mit Pentobarbital narkotisiert, intubiert, druckkontrolliert beatmet und zur kontinuierlichen Messung von Herzfrequenz und mittlerem arteriellem Blutdruck instrumentiert. Nach einer linksseitigen Thorakotomie wurde der LAD umschlungen. Alle Tiere wurden einer 45-minütigen Koronararterienokklusion (CAO) und einer dreistündigen Reperfusionsphase unterzogen. Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten keine zusätzliche Intervention. Sevofluran wurde in einer Konzentration von 1 MAC (3,3 Vol-%) für 18 Minuten appliziert, beginnend 3 Minuten vor Beginn der Reperfusion. Sevofluran wurde alleine oder

in Kombination mit dem COX-1-prävalenten Inhibitor Diclofenac (1 µg/g intraperitoneal) oder dem COX-2-prävalenten Inhibitor Celecoxib (100 µg/g intraperitoneal) verabreicht. Infarktgröße (IS) und Risikoareal (AAR) wurden mittels TTC- bzw. Evans-Blau-Färbung demarkiert und gravitoplanimetrisch bestimmt. In zusätzlichen Untersuchungen wurde Myokardgewebe 15 Minuten nach Beginn der Reperfusion entnommen und die Konzentration von Thromboxan A2 (TX-A2) mittels eines spezifischen Assays bestimmt. Die Daten wurden statistisch mittels Ein- bzw. Zwei-Wege-ANOVA und Post hoc-Duncan's-Test analysiert und sind als Mittelwert±SEM angegeben, $p<0,05$.

Ergebnisse

Die IS betrug $42\pm3\%$ in der Kontrollgruppe (CON; n=8 pro Gruppe). Sevofluran reduzierte die IS auf $15\pm2\%$ ($p<0,05$ vs. CON). COX-1-Blockade mittels Diclofenac reduzierte die IS ebenfalls ($18\pm4\%$, $p<0,05$ vs. CON) und beeinflusste die Sevofluran-APOST nicht ($25\pm9\%$, $p<0,05$ vs. CON). Der COX-2-Hemmstoff Celecoxib alleine führte zu einer signifikanten IS-Reduktion verglichen mit CON ($13\pm1\%$, $p<0,05$ vs. CON) und zeigte keinen Effekt auf die Sevofluran-APOST ($19\pm6\%$, $p<0,05$ vs. CON). Die Konzentration von TX-A2 war nach Gabe von Diclofenac signifikant gegenüber der Kontrollgruppe reduziert. Diclofenac in Kombination mit Sevofluran führte zu einer signifi-

Abbildung 2



Thromboxan-A2-Konzentration in pg/ml. TXA2 = Thromboxan-A2. Angegeben sind Mittelwert±SEM. * $p<0,05$ vs. CON. § $p<0,05$ vs. SEVO.

kanten Reduktion der TX-A2-Konzentration verglichen mit Sevofluran alleine.

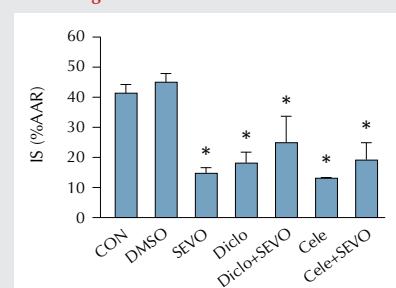
Interpretation

Die Sevofluran-APOST reduzierte die IS bei Mäusen *in vivo*. Sowohl COX-1- als auch COX-2-Blockade per se zeigten kardioprotektive Effekte vergleichbar der Sevofluran-APOST. Eine direkte Beeinflussung der Sevofluran-APOST durch die COX-Inhibitoren Diclofenac und Celecoxib kann auf Grundlage der vorliegenden Versuchsergebnisse nicht sicher ausgeschlossen werden. Inwieweit diese Ergebnisse in die klinische Situation übertragbar sind, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

Literatur

1. Stumpner J, Lange M, Beck A, et al: Desflurane-induced post-conditioning against myocardial infarction is mediated by calcium-activated potassium channels: role of the mitochondrial permeability transition pore. *Br J Anaesth* 2012;108:594-601
2. De Hert SG, Van der Linden PJ, Cromheecke S, et al: 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
3. Alcindor D, Krolkowski JG, Pagel PS, et al: Cyclooxygenase-2 mediates ischemic, anesthetic, and pharmacologic preconditioning *in vivo*. *Anesthesiology* 2004;100:547-54.

Abbildung 1



Infarktgröße als Prozentwert des Risikoareals (IS/AAR). Angegeben sind Mittelwert±SEM.

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

Die genetische Defizienz von Angiotensin-II-Typ-2-Rezeptoren bewirkt erst mit zeitlicher Verzögerung nach experimentellem Schädel-Hirn-Trauma eine Vergrößerung des Hirnschadens

R. Timaru-Kast¹ · S. P. Coronel-Castello^{1,2} ·

C. Götz¹ · T. Krämer¹ · A. Sebastiani¹ ·

K. Engelhard^{1,2} · S. C. Thal¹

1 Klinik für Anästhesiologie,

2 Focus Program Translational Neuroscience (FTN)

Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Korrespondenz: timaruka@uni-mainz.de

Fragestellung

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die Hemmung des Angiotensin-II-Typ-1-Rezeptors (AT1) das neurologische Defizit und den sekundären Hirnschaden nach experimentellem Schädel-Hirn-Trauma (SHT) reduziert [1]. Neben einer direkten Hemmung der AT1-vermittelten Vasokonstriktion und Inflammation könnte dieser Effekt über eine verstärkte Aktivierung von Angiotensin-II-Typ-2-Rezeptoren (AT2) durch Angiotensin II vermittelt sein. Durch Blockade von AT1 wirkt Angiotensin II vermehrt an AT2 [2]. In den ersten Tagen nach Insult kommt es zudem zu einer perikontusionellen Heraufregulierung von AT2 [1,2]. Die Wirkung von Angiotensin II an AT2 könnte über antiinflammatorische, vasodilatative und neuroregenerative Effekte somit zur protektiven Potenz von AT1-Inhibitoren beitragen [2,3]. In der vorliegenden Studie wurde deshalb der Stellenwert von AT2 für den sekundären Hirnschaden nach SHT untersucht.

Methodik

Nach Zustimmung der Tierschutzausschüsse wurden im ersten Studienabschnitt männliche AT2-defiziente (AT2^{-/-})- und Wildtyp (WT)-Geschwisterzwerge (C57Bl6-Mäuse) unter Anästhesie einer kontrollierten kortikalen Kontusion mittels pneumatisch beschleunigten Stempels unterzogen (controlled cortical impact: CCI). Im zweiten Studienabschnitt wurden randomisiert männlichen Wildtyp-Mäusen der hochselektiven AT2 Agonist Compound 21 (C21) in niedriger (ND, 0,03 mg/kg) oder hoher Dosierung (HD 0,1 mg/kg) bzw. Vehikel (Veh., NaCl 0,9%) 30 min nach CCI und dann täglich intraperitoneal verabreicht. In beiden Studienabschnitten wurden die Tiere vor SHT und nach SHT anhand des modifizierten Neurological Severity Scores (NSS) neurologisch untersucht (0-15 Punkte). Im ersten Studienabschnitt wurde 24 Stunden und 5 Tage nach CCI, im zweiten Abschnitt

5 Tage nach Insult das zerebrale Kontusionsvolumen in Nissl-gefärbten Kryo-Schnitten bestimmt. Statistik: Mann-Whitney-Rangsummentest für paarweise Vergleiche und Korrektur nach Bonferroni bei Mehrfachtesten, $p<0,05$.

Ergebnisse

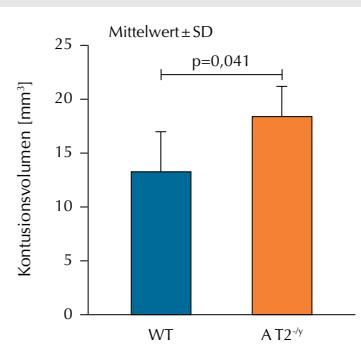
Durch das CCI konnte eine neurologische Beeinträchtigung der Mäuse in allen Gruppen ausgelöst werden ($p<0,05$ vor- vs. nach CCI). Der NSS der Tiere und der Gewichtsverlust zeigten in beiden Versuchsabschnitten keinen Unterschied zwischen den Gruppen (AT2^{-/-}

vs. WT; und ND vs. HD vs. Veh.) in den ersten 5 Tagen nach SHT. Das CCI führte zu einem Untergang von Hirngewebe, histologisch jedoch ohne Unterschied im Schadensvolumen nach 24 Stunden zwischen AT2-defizienten und WT-Tieren (AT2^{-/-}: 40,5±4,2 mm³; WT: 39,2±7,7 mm³). Nach 5 Tagen zeigte sich ein signifikant größeres Kontusionsvolumen bei AT2-defizienten Tieren im Vergleich zu WT-Mäusen (AT2^{-/-}: 18,4±2,8; WT: 13,2±3,8 mm³; $p<0,05$; Abb.1). Der Vergleich der Kontusionsvolumina von ND, HD oder Veh. ergab keine Unterschiede (12,7±2,5, 12,3±3,0 und 13,8±2,4 mm³; Abb. 2).

Interpretation

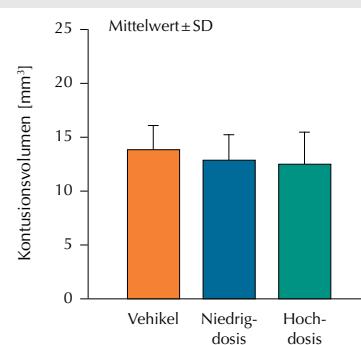
Während eine AT1-Blockade bereits nach 24 Stunden zu einer signifikanten Reduktion von neurologischem Defizit und Hirnschaden führt [1], zeigen AT2-defiziente Tiere zu diesem Zeitpunkt keinen Unterschied zum WT. Dieses deutet auf eine untergeordnete Rolle von AT2 in der Frühphase nach SHT hin (24 h). Im Gegensatz dazu kommt es bei AT2-defizienten Tieren nach fünf Tagen zu einem größeren Hirnschaden. Da AT2 im gesunden adulten Gehirn nur sehr gering exprimiert wird und auf einen Insult hin erst heraufreguliert wird [1,3], lässt dies auf den Stellenwert von AT2 als neuroprotektiven Faktor schließen, der reparative Prozesse im Gehirn reguliert [3]. Ferner führt im Gegensatz zur AT1-Inhibition eine selektive AT2-Aktivierung zu keiner Reduzierung des Hirnschadens 5 Tage nach SHT. Möglicherweise hat eine exogene AT2-Stimulation keinen zusätzlichen Effekt zur endogenen Angiotensin-II-Wirkung. Die vorliegenden Ergebnisse deuten deshalb darauf hin, dass die neuroprotektive Wirkung einer AT1-Inhibition nur bedingt durch eine verstärkte Aktivierung von AT2 erklärt werden kann. Darüber hinaus sind protektive Effekte einer AT2-Aktivierung möglicherweise bei gleichzeitiger AT1-Inhibition an späteren Zeitpunkten nach SHT noch zu untersuchen.

Abbildung 1



Das Kontusionsvolumen 5 Tage nach SHT in Wildtyp (WT)- und AT2-defizienten Mäusen (AT2^{-/-}), gemessen in Nissl-gefärbten Hirnschnitten. Der Vergleich der Kontusionsvolumina offenbart eine deutliche Reduktion des Hirnschadens in WT-Mäusen gegenüber AT2-defizienten Tieren ($p<0,05$).

Abbildung 2



Das Kontusionsvolumen 5 Tage nach SHT in C57Bl6-Mäusen, die den AT2 Agonisten Compound 21 entweder in niedriger, hoher Dosierung (0,03 mg/kg bzw. 0,1 mg/kg) oder die Vehikellösung erhielten. Die Quantifikation erfolgte in Nissl-gefärbten Hirnschnitten. Der Vergleich der Kontusionsvolumina ergab keine Unterschiede.

Literatur

1. Timaru-Kast R, et al: Crit Care Med 2012;40(3):935-944
2. Li J, et al: FASEB J 2005;19(6):617-619
3. Mogi M, et al: Hypertension 2006;48(1): 141-148.

Sevofluran verbessert die Überlebensrate im murinen Sepsismodell über einen Leptin-abhängigen Mechanismus

J. Tschöp¹ · D. Siegl² · N. Huber³ · M. Radeva⁴ · J. Waschke⁴ · P. Conzen¹ · U. Pohl² · T. Annecke¹

1 Klinik für Anaesthesiologie der LMU, München
2 Walter-Brendel-Zentrum für experimentelle Medizin der LMU, München
3 Klinik für Allgemein und Viszeralchirurgie, Universitätsklinikum Ulm
4 Anatomische Anstalt der LMU, München

Korrespondenz:

Johannes.Tschoep@med.uni-muenchen.de

Fragestellung

Das volatile Anästhetikum Sevofluran wirkt immunmodulatorisch und stabilisiert die endotheliale Barriere unter Verwendung unterschiedlicher Signalwege [1]. Das adipozytäre Hormon Leptin reguliert ebenfalls die Immunantwort und beeinflusst den Verlauf einer Sepsis positiv [2]. Unklar ist, ob Sevofluran auch über den Leptinsignalweg agiert und hierdurch ein Teil seiner immunmodulatorischen Wirkung zu erklären ist. Ziel unserer Studie war es, in einem murinen Sepsismodell die Hypothese zu testen, dass Sevofluran über einen Leptin-abhängigen Mechanismus zu einer Stabilisierung der endothelialen Doppelbarriere (Glykokalyx und Endothelzellschicht) beiträgt und so das Überleben in der Sepsis verbessert.

Methodik

Nach Genehmigung durch die Regierung von Oberbayern wurde an C57Bl/6-Mäusen mittels zökaler Ligatur und Punktions (CLP) eine Sepsis induziert. Eine Gruppe erhielt für den Eingriff Sevofluran (4 Vol.%, 40 min, n=80), die Kontrollgruppe Pentobarbital (50 mg/g KG; ip., n=80). Zielparameter waren das Überleben und die Körpertemperatur. Der

Einfluss von Sevofluran auf Leptin, inflammatorische Zytokine und Abbauprodukte der endothelialen Glykokalyx (Hyaluronsäure, Syndecan-1) wurde im Serum (ELISA) sowie die GTPase Rac in der Lunge bestimmt (GLISA). Sepsis-bedingte Organschädigungen und der spezifische Nachweis des Leptin-induzierbaren Rac wurden histologisch und immunhistologisch in der Lunge quantifiziert. Die Leptin-abhängige Wirkung von Sevofluran auf das Überleben wurde mittels Leptin-defizienten Mäusen (n=10), eine direkte Sevofluran-Wirkung auf die Leptinausschüttung in vitro an Adipozyten untersucht. Die Daten sind angegeben als MW ± SEM. Überlebensraten wurden mittels Log-Rank-Test, die übrigen Zielparameter mittels ANOVA und Post-hoc-Bonferroni-Testung analysiert (* p<0,05).

Ergebnisse

Sevofluran steigerte die 10-Tages-Überlebensrate auf 50% (n=10; p=0,004) im Vergleich zu 6,7% in der Kontrollgruppe (n=15), verbunden mit einer höheren mittleren Überlebenszeit (173,1 ± 24,4 vs. 79,0 ± 10,8 h; p<0,001). Im Gegensatz zur Sevofluran-Gruppe fiel die Körpertemperatur in der Kontrollgruppe in den ersten 4 Tagen nach CLP von 37,5 ± 0,2 auf 28,6 ± 3,1°C ab (n=5-15; p<0,01). In der Sevoflurangruppe waren im Vergleich zur Kontrollgruppe die systemischen Leptinspiegel sowie IL-1β und IL-10 erhöht (n=13-15/Gruppe, p<0,05), die IL-6-Werte (Peritoneale Lavage) dagegen reduziert (n=13-15/Gruppe; p<0,05). Die Kontrollgruppe entwickelte in der Lunge nach 24 h eine höhere wet/dry Ratio (n=5; p<0,05) sowie vermehrte histologische Lungenschädigungen im Vergleich zur Sevofluran-Gruppe (n=5). Unterschiede der Sheddingparameter Syndecan-1 und Hyaluronsäure (n=10-19/Gruppe; p<0,05) konnten die Vorteile von Sevofluran nicht erklären. Allerdings war die

Rac-Aktivierung in der Lunge der Sevoflurangruppe (n=4-5/Gruppe; p<0,01) nach 6 h und 24 h höher als in der Kontrollgruppe (n=3-6/Gruppe). Histologisch fand sich in der Sevoflurangruppe eine vermehrte Rac1-Expression in einer spezifischen Rac1-Färbung der pulmonalen Endothelzellschicht. In den Leptin-defizienten (ob/ob)-Mäusen kam es trotz Sevofluran zu einer 100% Letalität (n=5), erniedrigter Überlebenszeit (40,0 ± 8,4 h; n=5) und einer Hypothermie (p<0,01). In vitro steigerte Sevofluran die Leptinausschüttung aus murinen Adipozytenkulturen konzentrationsabhängig.

Interpretation

Sevofluran verbessert im Modell der murinen Sepsis die Immunantwort und Überlebensrate und stabilisiert die Endothelzellschicht vermutlich durch eine vermehrte Rac-Aktivierung. Dagegen zeigen sich keine wesentlichen Effekte auf die Glykokalyx. Sevofluran führt sowohl in vivo als auch in vitro zu einer gesteigerten Leptinfreisetzung. Zusammen mit ausbleibenden positiven Sevofluran-Effekten in den Leptin-defizienten Tieren legt dies einen Leptin-abhängigen Mechanismus der Sevofluranwirkung nahe.

Literatur

1. Herrmann IK, Castellon M, Schwartz DE, Hasler M, Urner M, Hu G, et al: Volatile anesthetics improve survival after cecal ligation and puncture. Anesthesiology 2013;119:901-6
2. Tschöp J, Nogueiras R, Haas-Lockie S, Kasten KR, Castañeda TR, Huber N, et al: CNS leptin action modulates immune response and survival in sepsis. J Neurosci 2010; 30:6036-47.

Tabelle 1

Daten der C57Bl/6-Mäuse		nach CLP					
		6h		24h		48h	
		Sevofluran	Kontrolle	Sevofluran	Kontrolle	Sevofluran	Kontrolle
Leptin (S) [ng/ml]	2.7 ± 0.2	6.0 ± 0.5 * #	4.0 ± 0.5	5.1 ± 0.7 *	2.3 ± 0.5	2.9 ± 0.6 *	1.5 ± 0.5
IL-1β (S) [ng/ml]	20.0 ± 2.6	37.9 ± 2.2 * #	28.8 ± 2.0	32.1 ± 2.0 *	20.1 ± 1.3	26.1 ± 0.8	20.5 ± 1.8
IL-10 (S) [ng/ml]	3.6 ± 0.5	12.5 ± 0.9 * #	7.4 ± 0.9 #	9.1 ± 1.1 *	4.6 ± 0.5	5.3 ± 0.7	5.2 ± 0.5
IL-6 (PL) [ng/ml]	0.2 ± 0.1	3.0 ± 0.7	4.4 ± 0.9	1.1 ± 0.1	2.8 ± 0.4	1.4 ± 0.3 *	5.9 ± 1.5
Syndecan-1 (S) [ng/ml]	73.8 ± 10.6	141.6 ± 8.8 #	118.6 ± 5.5 #	121.5 ± 9.7	122.7 ± 4.4	89.6 ± 7.4 *	129.9 ± 15.4
Hyaluronsäure (S) [µg/ml]	1.3 ± 0.1	5.8 ± 1.6	3.8 ± 0.9	11.7 ± 1.2	10.8 ± 1.4	15.2 ± 3.8	12.8 ± 3.1
Rac-Aktivierung (L) [%]	88.1 ± 8.7	120.7 ± 7.3 * #	42.4 ± 5.4	91.6 ± 4.8 *	67.1 ± 3.3		
Wet/Dry Ratio	4.4 ± 0.1	5.0 ± 0.1 #	5.1 ± 0.1	4.5 ± 0.1 *	4.9 ± 0.1		

S = Serum. PL = Peritoneale Lavage. L = Lunge; * p<0,05 im Vergleich zur Kontrolle; # p<0,05 im Vergleich zu vor CLP.

Inhalativ appliziertes Argon wirkt protektiv auf retinale Ganglienzellen der Ratte durch die Induktion der mitogenaktivierten Proteinkinase ERK 1/2

F. Ulbrich¹ · J. Biermann² · W. Lagrèze² · M. Coburn³ · T. Loop¹ · U. Goebel¹

1 Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin, Freiburg

2 Universitäts-Augenklinik, Freiburg

3 Klinik für Anästhesiologie, Aachen

Korrespondenz:

felix.ulbrich@uniklinik-freiburg.de

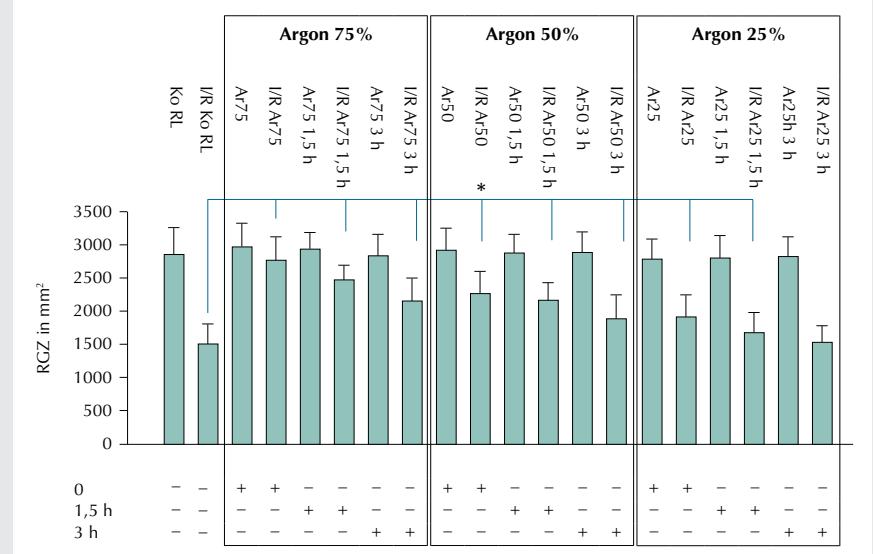
Fragestellung

Eine Präkonditionierung mit dem Edelgas Argon vermittelt sowohl bei hypoxischen als auch bei ischämischen Schädigungen neuroprotektive Wirkungen [1]. Die Inhalation von Argon [50 Vol%] reduziert den neuronalen Zellschaden nach einer zerebralen Ischämie und verbessert möglicherweise die neurologische Funktion [2]. Die Aktivierung der extrazellulär regulierten Kinase (ERK 1/2) in vitro erklärt einen Teil des protektiven Effektes [3]. Der molekulare Mechanismus der Argon-vermittelten Neuroprotektion ist in vivo nicht untersucht. Wir haben die Hypothese aufgestellt, dass die neuroprotektive Wirkung von Argon in vivo nach einem Ischämie-Reperfusion (I/R)-Schaden über eine Aktivierung der mitogen-aktivierten Proteinkinase ERK 1/2 induziert wird.

Methodik

Nach Genehmigung des Regierungspräsi-

Abbildung 1



Quantifizierung FG-markierter RGZ pro mm² (n=8 pro Gruppe; Mittelwert ± Standardabweichung, *=<0.05 I/R vs. I/R Ar75%, 1,5 h Ar75%, 3 h Ar75%, Ar50%, 1,5 h Ar50%, 3 h Ar50%, Ar25% und 1,5 h Ar25%).

diums wurde bei Sprague-Dawley-Ratten (n=8) ein I/R-Schaden durch Erhöhung des intraokularen Drucks auf 120 mmHg für 1 h induziert. Nach der Ischämie wurde Argon dosis- und zeitabhängig inhalativ appliziert (Dosierung: 25 Vol%, 50 Vol%, 75 Vol% Argon mit je 21 Vol% Sauerstoff und Rest Stickstoff; Zeitpunkte: unmittelbar, 1,5 h und 3 h nach Ischämie). Nach 24 h erfolgte die Enukleation und Aufarbeitung retinaler Gewebeproben für die Analyse der RNA- und

Protein-Expression von Bcl-2, Caspase-3, Hämoxigenase-1, Hitzeschockprotein- (HSP) 90 und der Phosphorylierung des nukleären Transkriptionsfaktors NF-κB sowie der mitogen-aktivierten Proteinkinasen (p38 und ERK). Die Dichte der retinalen Ganglienzellen (RGZ) wurde nach vorheriger retrograder in vivo Fluorogold-Anfärbung (FG) sieben Tage nach dem I/R-Schaden mittels Fluoreszenz-Mikroskopie quantifiziert. Die In-vivo-Inhibition von ERK 1/2 erfolgte mit dem spezifi-

Tabelle 1

Relative mRNA-Expression in I/R-geschädigtem retinalem Gewebe gegenüber Kontrollgewebe (kontralaterales Auge) nach Applikation von Raumluft, Argon 75 Vol% (Ar75) oder Argon 50 Vol% (Ar50). Zeitpunkt der Exposition unmittelbar nach Ischämie 0 h, 1,5 h oder 3 h. Mittelwert ± Standardabweichung, n=8; *p<0.05 I/R vs. I/R Argon 75 Vol% und I/R vs. I/R Argon 50 Vol%.

	Casp-3			Bcl-2			HO-1			Hsp-90			NF-κB		
	0	1,5	3	0	1,5	3	0	1,5	3	0	1,5	3	0	1,5	3
I/R RL	1,9±0,46			1,9±0,41			5,2±2,02			1,6±0,65			1,6±0,40		
I/R Ar75%	1,1±0,36*	1,3±0,47*	1,6±0,38*	1,2±0,39*	1,3±0,33*	1,4±0,25*	1,2±0,66*	2,9±1,45	3,6±2,63	1,0±0,28*	0,9±0,12*	1,2±0,39*	1,0±0,32*	1,1±0,31*	1,2±0,32*
I/R Ar50%	1,5±0,41	1,6±0,42	1,7±0,56	1,3±0,57	1,4±0,28	1,7±0,72	3,2±1,64	3,1±0,83	3,8±1,04	1,3±0,26	1,28±0,21	1,3±0,34	1,2±0,20	1,2±0,60	1,4±0,44

Tabelle 2

Relative Protein-Expression in I/R-geschädigtem retinalem Gewebe gegenüber Kontrollgewebe (kontralaterales Auge) nach Applikation von Raumluft, Argon 75 Vol% (Ar75) und Argon 50 Vol% (Ar50). Zeitpunkt der Exposition unmittelbar nach Ischämie 0 h, 1,5 h oder 3 h. Densitometrische Western-Blot-Analyse; Mittelwert ± Standardabweichung, n=8; *p<0.05 I/R vs. I/R Argon 75 Vol% und I/R vs. I/R Argon 50 Vol%.

	cleaved Caspase-3			phospho-NF-κB			phospho-p38			phospho-ERK 1/2		
	0	1,5	3	0	1,5	3	0	1,5	3	0	1,5	3
I/R RL	1,2±0,11			0,9±0,05			0,7±0,47			1,0±0,09		
I/R Ar75%	0,9±0,13*	1,0±0,10*	1,2±0,09	0,7±0,04*	0,8±0,15*	0,9±0,07	1,4±0,30*	1,1±0,46	1,0±0,18	1,5±0,09*	1,3±0,13*	1,2±0,08*
I/R Ar50%	1,0±0,14	1,0±0,27	1,1±0,10	0,9±0,11	0,9±0,11	0,9±0,12	1,3±0,22*	0,9±0,25	1,0±0,32	1,36±0,18*	1,2±0,16	1,1±0,15

schen Inhibitor PD98059. Die Messwerte wurden statistisch durch eine Varianzanalyse (ANOVA mit Post-hoc-SNK-Test) verglichen (Signifikanzniveau $p<0.05$; Mittelwerte \pm Standardabweichung).

Ergebnisse

Inhalatives Argon reduziert zeit- und dosisabhängig die Abnahme der Ischämie-induzierten RGZ-Dichte (Abb. 1). Der größte Unterschied wurde bei Argon 75 Vol% unmittelbar nach Ischämie beobachtet (Abb. 2). Argon (75 Vol%) hemmt die Expression von Bcl-2, die Aktivierung der Hämoxigenase-1 und HSP-90 signifikant (Tab. 1). Argon 50 und 75 Vol% unterdrücken die Caspase-3-mRNA-Expression und -Spaltung und in-

duziert die Phosphorylierung von p38 und ERK 1/2 (Tab. 2). Die Inhalation von Argon 75 Vol% hemmt die Phosphorylierung und DNA-Bindung von NF-κB. Die Inhibition von ERK 1/2 mit PD98059 vor der Ischämie reduzierte die ERK 1/2-Phosphorylierung sowie die protektive Wirkung signifikant (Abb. 3, 4).

Interpretation

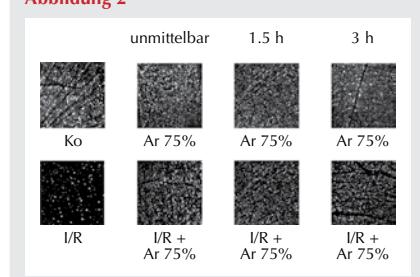
Die Inhalation mit Argon nach einer retinalen Ischämie wirkt protektiv auf retinale Ganglien-

zellen. Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die mitogen-aktivierte Proteinkinase ERK 1/2 an dieser protektiven Wirkung beteiligt ist.

Literatur

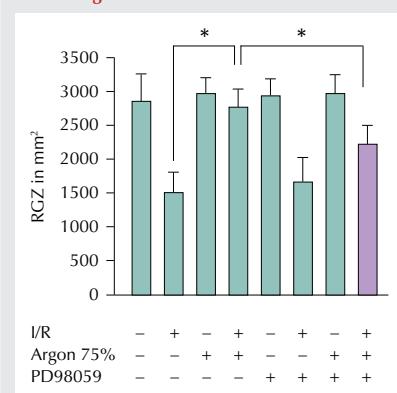
- Zhuang L, et al: Crit Care Med 2012;40:1724-30
- Ryang YM, et al: Crit Care Med 2011;39:1448-53
- Fahlenkamp A, et al: Eur J Pharmacol 2012; 674:104-111.

Abbildung 2



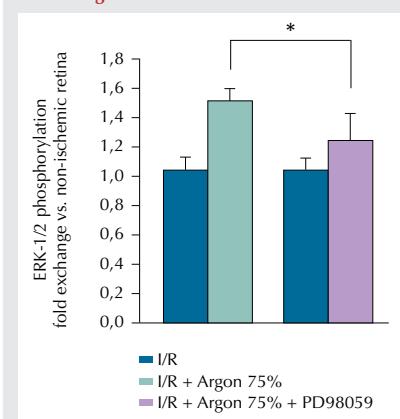
Repräsentative Einzelaufnahmen der FG-markierten RGZ ($0,04 \text{ mm}^2$).

Abbildung 3



Quantifizierung FG-markierter RGZ pro mm^2 ($n=8$ pro Gruppe; Mittelwert \pm Standardabweichung, $*=p<0.05$ I/R vs. I/R + Ar75% und I/R + Ar75% vs. I/R + Ar75% + PD98059).

Abbildung 4



ERK 1/2-Phosphorylierung; densitometrische Western-Blot-Analyse. $*=p<0.05$ I/R + Ar75% vs. I/R + Ar75% + PD98059.

Procalcitonin unterdrückt endotheliale Gefäßneubildungsprozesse und moduliert die vaskuläre Barrierefunktion in vitro

C. M. E. Van Aken¹ · A. Butschkau² ·
G. E. F. Nöldge-Schomburg¹ · B. Vollmar² ·
J. P. Roesner¹ · N.-M. Wagner¹

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

Fragestellung

Procalcitonin (PCT) ist ein Entzündungsparameter, welcher zur Frühdiagnose und Verlaufsbeurteilung einer Sepsis bestimmt wird. Auch das metabolische Syndrom, gekennzeichnet durch Adipositas und Insulinresistenz, ist mit einer chronischen Entzündungsreaktion und damit leicht erhöhten Plasma-PCT-Spiegeln assoziiert [1]. Bei Sepsis korrelieren hohe PCT-Spiegel mit dem Schweregrad der Erkrankung, eine Neutralisierung von endogenem PCT ist im Tiermodell mit verbesserten Überlebenschancen assoziiert [2,3]. Unklar ist jedoch, ob PCT einen direkten Einfluss auf das Endothel ausüben und somit einen Beitrag zur Dysfunktion der vaskulären Barriere bei Sepsis oder der erhöhten Inzidenz von Gefäßkrankungen im Rahmen des metabolischen Syndroms haben könnte. Wir untersuchten daher den Effekt von PCT auf endotheliale Barrierefunktionen und regenerative Gefäßneubildungsprozesse (Angiogenese) in vitro.

Methodik

Humane Endothelzellen aus der Nabelschnurvene wurden mit PCT-Konzentrationen von 1 pg/ml bis 100 ng/ml behandelt und deren angiogene Potenz zur Kapillarbildung und Migration im Matrigel-Angiogenese- bzw. Scratch-Modell in vitro analysiert. Verglichen wurden die Effekte von PCT dabei mit 10 ng/ml Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNFalpha) bzw. 10 ng/ml Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). Durchflusszytometrisch wurde der Einfluss von PCT auf das endotheliale Expressionsprofil von angiogenen Rezeptoren und inflammatorischen Adhäsionsmolekülen sowie die PCT-vermittelte Induktion von Apoptose und Nekrose evaluiert. Im Western Blot wurde die Aktivierung der angiogenen Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) ERK und AKT sowie die Expression des Be-

standteils von endothelialen Interzellularkontakten, VE-Cadherin untersucht. Mittels Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)-markierter Dextranmoleküle und Inkubation von PCT mit endothelialen Monolayern in Inserts mit einer Porengröße von 1 µm wurde die Wirkung auf die Integrität der endothelialen Barriere ermittelt (Permeabilitäts-Modell). MW ± SEM, One-Way-ANOVA/Bonferroni.

Ergebnisse

PCT zeigte sowohl ab einer für das metabolische Syndrom (20 pg/ml) sowie für leichte entzündliche (100 pg/ml) und septische Situationen (1 und 100 ng/ml) typische Konzentrationen einer anti-angiogenen Wirkung und unterdrückte sowohl die spontane ($P<0,001$ vs. Kontrolle; je $n=5$; Abb. 1) als auch die VEGF-induzierte Kapillarbildung ($P<0,05$; $n=5$) und Migration ($P<0,05$; $n=5$). Dieser supprimierende Effekt war mit dem von TNF-alpha vergleichbar. 24-stündige Inkubation mit hohen PCT-Konzentrationen (100 ng/ml) induzierte Apoptose und Nekrose in Endothelzellen (je $P<0,05$; $n=4$), während sich keine Veränderungen in der Expression des VEGF- oder des CXCR4-Rezeptors zeigten. PCT interferierte nicht mit der VEGF-induzierten MAPK-Aktivierung und veränderte per se nicht das Aktivierungsniveau (Phosphorylierung) von ERK und AKT. Fluoreszenzmessungen im Permeabilitätsmodell zeigten nach 6-stündiger Inkubation eine erhöhte Leckage des endothelialen Monolayers unter 100 pg/ml PCT ($P<0,05$; $n=5$). Im Western Blot ließ sich zudem unter PCT-Stimulation mit 100 ng/ml eine verminderte Expression von VE-

Cadherin vergleichbar zur Wirkung von TNF-alpha detektieren ($P<0,05$; $n=4$, Abb. 2A, B). Die Expression der entzündlichen Adhäsionsmoleküle ICAM und VCAM wurde durch PCT jedoch nicht verändert.

Interpretation

Die anti-angiogene Wirkung von PCT ist schon bei niedrigen Konzentrationen, wie beim metabolischen Syndrom zu beobachten, nachweisbar. Dies könnte auf einen direkten Beitrag von PCT zum erhöhten Risiko für die Entstehung von Gefäßkrankheiten bei Adipositas und Diabetes Mellitus Typ II hinweisen. Der Effekt von PCT auf die vaskuläre Barrierefunktion könnte zu Flüssigkeitsverschiebungen nach extravasal und der damit assoziierten Ödembildung bei SIRS und Sepsis beitragen. Insgesamt könnte PCT somit zu einem möglichen therapeutischen Ziel für den Erhalt der vaskulären Homöostase bei chronischen sowie akuten entzündlichen Reaktionen werden.

Literatur

1. Abbasi A, Corpeleijn E, Postmus D: Plasma procalcitonin is associated with obesity, insulin resistance, and the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:E26-E31
2. Schuetz P, Albrich W, Mueller B: Procalcitonin for diagnosis of infection and guide to antibiotic decisions: past, present and future. *BMC Medicine* 2011;9:107
3. Nylen ES, Whang KT, Snider RH: Mortality is increased by procalcitonin and decreased by an antiserum reactive to procalcitonin in experimental sepsis. *Crit Care Med* 1998; 26:1001-1006.

Abbildung 1 und 2

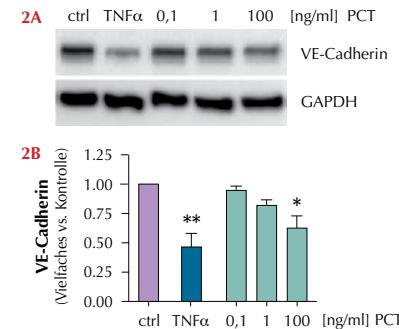
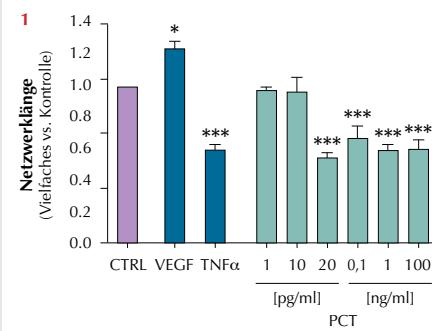


Abb. 1: Kumulative Netzwerklänge nach Stimulation mit VEGF, TNF-alpha und PCT im Matrigel-Angiogenese-Modell. * $P<0,05$ und *** $P<0,001$; $n=5$. Anti-angiogene Effekte von PCT zeigten sich ab 20 pg/ml.

Abb. 2A: Western Blot nach 24-stündiger Stimulation.

Abb. 2B: Quantitative Zusammenfassung von $n=4$ unabhängigen Experimenten. * $P<0,05$ und ** $P<0,01$.

microRNAs beeinflussen die T-Zell-Antwort bei humaner Sepsis

V. van der Heide · P. Möhne · S. Schütz · J. Briegel · S. Kreth

Klinik für Anaesthesiologie der Universität München

Korrespondenz:
verena.heide@med.uni-muenchen.de

Fragestellung

T-Lymphozyten spielen eine zentrale Rolle bei der Entstehung und Aufrechterhaltung inflammatorischer Prozesse, wie z.B. der Sepsis [1]. Der starke Einfluss von microRNAs (miRs) auf die Funktionen von T-Zellen konnte in aktuellen Studien belegt werden, ist jedoch für das Krankheitsbild der Sepsis bislang kaum untersucht [2]. Die vorliegende Studie fokussiert darauf, spezifische Veränderungen im miR-Expressionsprofil von T-Zellen septischer Patienten zu identifizieren und zu untersuchen, inwieweit dies zu Sepsis-spezifischen Alterationen der T-Zellantwort beitragen kann.

Methodik

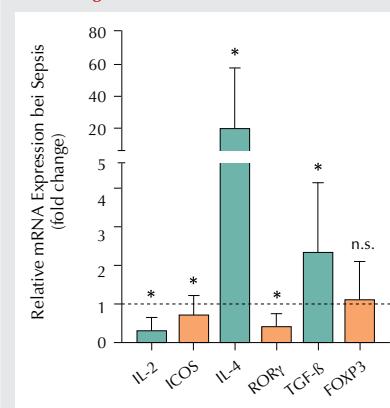
Aus primären T-Zellen (gewonnen durch magnetische Zellseparation) von Patienten mit Sepsis bis max. 48 h nach klinischer Diagnosestellung sowie von gesunden Probanden (Ethikvotum und Einverständnis lagen vor) wurde RNA extrahiert und revers transkribiert. Die Expression T-Zell-spezifischer Zytokine, Co-Stimulatoren, Co-Inhibitoren und Mastertranskriptionsfaktoren wurde mittels quantitativer real-time PCR bestimmt. Die differentielle Expression von miRs wurde durch Microarray-Technik untersucht (n=7, Exiqon LNA probes) und für stark differentiell exprimierten miRs zusätzlich mittels spezifischer TaqMan-Assays validiert (weitere n=10). Zur Ermittlung möglicher Funktionen dieser miRs wurden die jeweiligen synthetischen Vorläufer-miRs (pre-miRs) bzw. Kontroll-miR in T-Zellen gesunder Spender transfiziert (Eletroporation, n=15) und Rezeptor-vermittelt aktiviert (CD3/CD28 Microbeads). Nach Inkubation über 48 h wurde RNA extrahiert, revers transkribiert, und die Expressionsraten von Zytokinen, Co-Stimulatoren und Co-In-

hibitoren sowie Mastertranskriptionsfaktoren wurden mittels quantitativer real-time PCR bestimmt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test bzw. Mann-Whitney-U-Test.

Ergebnisse

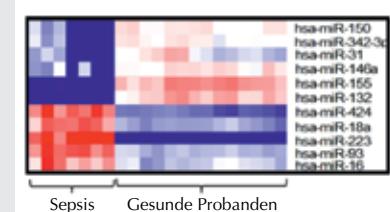
Das Genexpressionsmuster von T-Zellen septischer Patienten wies bereits im frühen Stadium der Erkrankung Charakteristika einer Immunparalyse auf (Abb. 1): Erhöhte Expressionswerte fanden sich für IL-4, dem Leitzytokin der Th2-Antwort, und für TGF-β, dem Markerzytokin für regulatorische T-Zellen; demgegenüber war die Expression des für pro-inflammatorische Th17-Zellen spezifischen Transkriptionsfaktors RORγ signifikant erniedrigt. Zudem waren das pro-proliferative Zytokin IL-2 sowie der T-Zell Co-Stimulator ICOS signifikant vermindert exprimiert. In einer miR-Microarrayanalyse fanden sich in T-Zellen von Sepsis-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden 11 miRs mit deutlich erniedriger bzw. erhöhter Expression (Abb. 2), welche sich in der Validierung mittels TaqMan-Assays bestätigte. Transfektionsexperimente mit primären T-Zellen gesunder Spender mit den jeweiligen pre-miRs zeigten, dass 4 dieser miRs zur Entwicklung der gefundenen Genexpressionsalterationen bei

Abbildung 1



In T-Zellen bei Sepsis (n=24-30) im Vergleich zu gesunden Probanden (n=20, gestrichelte Linie) differentiell exprimierte Zytokine, Transkriptionsfaktoren und Aktivierungsmarker; *p<0.05.

Abbildung 2



Ausschnitt aus der Heat-Map einer microRNA-Microarrayanalyse von T-Zellen von Patienten mit Sepsis (n=7) vs. gesunde Probanden (n=7, Duplikate).

Sepsis beitragen: miR-16 führte zu einer verminderten Expression von ICOS und RORγ (-32% bzw. -49%, p<0,05) sowie zu einer erhöhten Expression von TGF-β (+35%, p<0,05); miR-93 reduzierte die IL-2-Expression (-28%, p<0,05). Die Transfektion von miR-424 verringerte ebenfalls die Expression von ICOS (-48%, p<0,05), während die Transfektion der bei Sepsis herabregulierten miR-31 zu einer signifikanten IL-4-Verminderung führte (-18%, p<0,05); zudem ist bekannt, dass miR-31 den Treg-Transkriptionsfaktor FoxP3 reguliert [3], d.h. die miR-31-Veränderungen bei Sepsis tragen zur erhöhten Expression von IL-4 und FoxP3 bei.

Interpretation

Das Genexpressionsmuster von T-Zellen von Sepsis-Patienten weist auf eine frühe Immunparalyse hin, zu deren Ausprägung differenziell exprimierte miRs beitragen. Die gefundenen miRs könnten sich als Biomarker zur Diagnose einer Immunparalyse eignen.

Literatur

- Hotchkiss RS, Karl IE: The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 2003;348:138-150
- Hoefig KP, Heissmeyer V: MicroRNAs grow up in the immune system. *Curr Opin Immunol* 2008;20:281-7
- Rouas R, Fayyad-Kazan H, El Zein N, et al: Human natural Treg microRNA signature: role of microRNA-31 and microRNA-21 in FOXP3 expression. *Eur J Immunol* 2009;39:1608-18.

Melatonin verbessert die regionale Mikrozirkulation und erhält die Barrierefunktion des Gastrointestinal-Traktes während milder Hämorrhagie bei Hunden

C. Vollmer¹ · A. Mathes¹ · A. Weber² · F. Barthel¹ · C. Beck¹ · I. Bauer¹ · O. Picker¹

1 Klinik für Anästhesiologie, Universitätsklinikum Düsseldorf

2 Institut für die Biochemie der Pflanzen, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Korrespondenz:

christian.vollmer@med.uni-duesseldorf.de

Fragestellung

Melatonin verbessert nach einem hämorrhagischen Schock sowohl die Perfusion als auch die Organfunktion der Leber [1]. Gleichzeitig gibt es Hinweise, dass Melatonin auch im Gastrointestinal-Trakt produziert wird und dort protektive Effekte aufweist [2]. Unklar ist allerdings, ob Melatonin auch die Perfusion des Gastrointestinal-Traktes verbessert und inwieweit dies die Oxygenierung und die Barrierefunktion beeinflusst. Ziel dieser Untersuchung war es daher zu überprüfen, welchen Einfluss Melatonin auf die mikrozirkulatorische Perfusion und Hämoglobinogenierung (μHbO_2) der oralen und gastralen Mukosa unter physiologischen Bedingungen, im Rahmen einer milden Hämorrhagie sowie nach Retransfusion hat. Zusätzlich wurde der Effekt von Melatonin auf die intestinale Barrierefunktion mittels Xylose-Absorption bestimmt [3].

Methodik

Nach Genehmigung durch die zuständige Behörde wurden die Experimente an fünf anästhesierten, beatmeten Foxhounds in wiederholter, randomisierter Reihenfolge (4 Gruppen, n=5 pro Gruppe) durchgeführt. Die Tiere erhielten intravenös 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Melatonin und in der Kontrollgruppe die Vehikel-Lösung (Ethanol 5%). In weiteren Gruppen wurde nach Injektion von Melatonin oder Vehikel-Lösung eine milde Hämorrhagie (20% des Blutvolumens, 60 min) induziert, gefolgt von der Retransfusion des entnommenen Blutes. Die orale und gastrale μHbO_2 , Flussrate (pflow) und -geschwindigkeit (pvelo) wurden mittels Reflexionsspektrofotometrie bzw. Laser-Doppler (O_2C , LEA Medizintechnik, Gießen) erfasst und kontinuierlich aufgezeichnet. Die intestinale Barrierefunktion wurde über die Xylose-Absorption ins Plasma bestimmt (Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (GC/MS)). Systemische hämodynamische Parameter wurden mittels transpulmonaler Thermodilution (PiCCO 4.2 non US, Pulsion Medical Systems, München) ermittelt. Die Daten sind angegeben als Mittelwert \pm Standardfehler, 2-way ANOVA+Bonferroni für multiple Vergleiche, ein $p < 0,05$ wurde als signifikant angesehen.

Ergebnisse

Melatonin alleine zeigte keinen Einfluss auf μHbO_2 , pflow und Xylose-Plasmaspiegel bei unveränderten hämodynamischen Parametern. Dagegen fiel unter Hämorrhagie der gastrale pflow nach Melatoningabe signifikant geringer ab ($-19 \pm 9 \text{ aU}$) als in der Kon-

trollgruppe ($-43 \pm 10 \text{ aU}$; $p = 0,02$), während die μHbO_2 und der orale pflow ohne Unterschied zwischen den Gruppen abfielen. Der verbesserte gastrale pflow ist auf eine erhöhte pvelo unter Melatonin zurückzuführen (15 ± 1 vs. $12 \pm 0 \text{ aU}$; $p = 0,0025$). Auch während der Retransfusion führte Melatonin zu einem verbesserten pflow (23 ± 8 vs. $-6 \pm 7 \text{ aU}$; $p = 0,0033$) und pvelo (18 ± 1 vs. $15 \pm 1 \text{ aU}$; $p = 0,0006$). Gleichzeitig stieg der Xylose-Plasmaspiegel unter Hämorrhagie in der Kontrollgruppe von 8 ± 1 auf $13 \pm 2 \text{ AUC}$, während er nach vorheriger Melatoningabe unverändert blieb (von 6 ± 1 auf $8 \pm 2 \text{ AUC}$; $p = 0,015$ vs. Kontrollgruppe). Unter Hämorrhagie führte Melatonin zu einer leichten Reduktion des systemischen Gefäßwiderstands (34 ± 3 vs. $37 \pm 2 \text{ mmHg} \cdot \text{min/l}$ in der Kontrollgruppe; $p = 0,0014$). Das Herzzeitvolumen (HZV) und das systemische Sauerstoffangebot (DO_2) waren unter Hämorrhagie in beiden Gruppen ohne signifikante Unterschiede gleichermaßen reduziert.

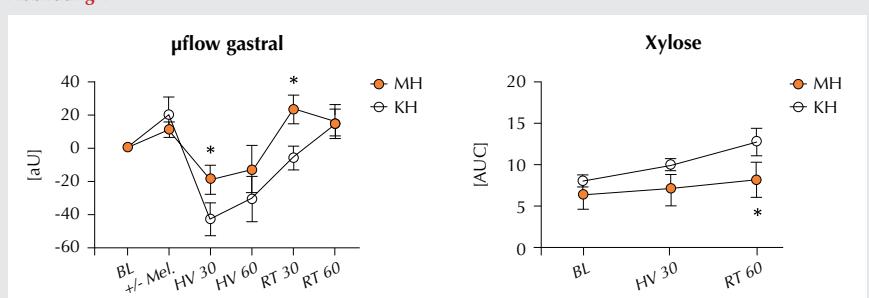
Interpretation

Die intravenöse Melatoningabe hat unter physiologischen Bedingungen weder Einfluss auf die orale und gastrale Mikrozirkulation noch auf hämodynamische Parameter oder die intestinale Barrierefunktion. Unter Hämorrhagie und nach Retransfusion verbessert Melatonin den gastralen pflow durch eine verbesserte pvelo. Die gleichzeitig unveränderte Xylose-Absorption weist darauf hin, dass Melatonin den Verlust der intestinalen Barrierefunktion während einer milden Hämorrhagie verhindern könnte. Die unveränderte μHbO_2 deutet bei höherem Fluss auf ein erhöhtes regionales O_2 -Angebot und einen erhöhten regionalen O_2 -Verbrauch durch Melatonin hin. Diese Effekte scheinen unabhängig vom HZV und DO_2 und sind somit vermutlich lokal vermittelt. Über welche Mechanismen Melatonin diese Effekte vermittelt, z.B. Rezeptor-gekoppelt oder NO-vermittelt, soll in weiterführenden Untersuchungen analysiert werden.

Literatur

1. Mathes AM, et al: Shock 2008;29:112-8
2. Konturek SJ, et al: J Physiol Pharmacol 2007;6:23-52
3. Wang YB, et al: World J Gastroenterol 2011;17:657-61.

Abbildung 1



Perfusion (pflow) unter Ausgangsbedingungen (BL), +/- Melatoningabe (+/- Mel.), Hypovolämie (HV) und Retransfusion (RT) für 30 bzw. 60 min in Interventions- (MH) und Kontrollgruppe (KH) und Xylose-Plasmaspiegel unter BL und HV; * = $p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe.

Neutrophile Granulozyten gelangen erst durch die gezielte Kommunikation von Makrophagen an den Infektionsherd

C. Weisheit¹ · M. Schiwon² · A. Dixit² · S. Gutweiler² · G. Baumgarten¹ · C. Kurts² · D. Engel²

1 Klinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin, Universitätsklinikum Bonn

2 Institut für Molekulare Medizin und Experimentelle Immunologie, Universitätsklinikum Bonn

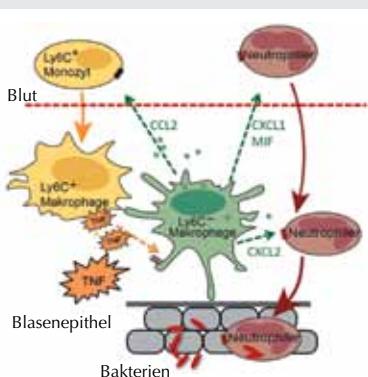
Korrespondenz:

Christina.Weisheit@ukb.uni-bonn.de

Fragestellung

Unter der Therapie mit TNF-Inhibitoren kommt es zu einem vermehrten Auftreten von bakteriellen Harnwegsinfektionen [1,2]. Die ersten Zellen, die den Infektionsort erreichen, sind neutrophile Granulozyten (PMN) und Makrophagen, die für die Abwehr von Bakterien entscheidend sind. Hierbei sind ihre spezifische Kommunikation und Kooperation in Gegenwart einer bakteriellen Infektion bisher unbekannt. Vor diesem Hintergrund stellt sich die Frage, wie PMN und Makrophagen in der Immunantwort gegen einen bakteriellen Reiz miteinander kooperieren und welche Funktion das Zytokin TNF in diesem Zusammenspiel hat.

Abbildung 1



Schematische Darstellung der gezielten Kommunikation und Kooperation von Makrophagen und PMN in der Harnwegsinfektion.

Vgl. Schiwon, Weisheit et al: Cell 2014.

Methodik

Etablierung eines murinen Harnwegsinfektionsmodells mit uropathogenen *E. coli*-Bakterien (Stamm 536). Durchflusszytometrische und histologische Analysen von Harnblasengewebe von infizierten weiblichen C57Bl6 (Wt-), Tnf^{-/-} und Tnfr^{-/-}-Mäusen. Charakterisierung der Funktion einzelner Zellpopulationen durch den adoptiven Transfer von neutrophilen Granulozyten sowie die Generierung knochenmarkschimärer Mäuse aus Wt- und Tnf^{-/-}-bzw. Tnfr^{-/-}-Tieren. Die Ergebnisse sind als mean \pm SD aufgetragen, hierbei gilt: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. Zum Vergleich der Daten ist der nicht parametrische Mann-Whitney- oder Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's post-Test verwendet worden (Software: Graphpad). Die durchgeführten Tierversuche sind durch das LANUV NRW genehmigt worden.

Ergebnisse

Bei gesunden Wt-Mäusen finden sich hauptsächlich Ly6C- (residente) Makrophagen im Harnblasengewebe. Bereits 2h nach Infektion steigt die Anzahl an PMN und Ly6C+ (inflammatorischen) Makrophagen signifikant an, während der Anteil an Ly6C-Makrophagen konstant bleibt. Initiale Untersuchungen an infizierten Tnfr^{-/-}-Tieren zeigen, dass eine Blockade des TNF-Signalwegs bei erhaltener Phagozytoseleistung der neutrophilen Granulozyten und Makrophagen zu einer signifikanten Steigerung der Infektionsstärke führt (Tnfr^{-/-}: $2,53 \times 10^7 \pm 0,44$ Wt: $1,07 \times 10^7 \pm 0,11$ Colony forming Units pro Harnblase). In der Durchflusszytometrie lassen sich allerdings keine quantitativen Unterschiede in der Rekrutierung der phagozytierenden Zellen in die Harnblase im Vergleich zu Wt-Mäusen beobachten. Histologisch kann aber eine Veränderung in der transepithelialen Migration der PMN nachgewiesen werden. Dies zeigt sich in einer signifikant höheren Anzahl PMN im Urothel infizierter Wt-Mäuse im Vergleich zu Tnfr^{-/-}-Mäusen (Tnfr^{-/-}: 153 ± 77 vs. Wt: $591 \pm 71/\text{mm}^2$ Urothel), bei denen die PMN in der Lamina propria unterhalb der urothelialen Basalmembran akkumulieren. Adoptiv transferierte PMN aus Tnfr^{-/-}-Mäusen zeigen bei Wt-Mäusen keinen Defekt in der transepithelialen Migration, so dass es eine andere TNF-Rezeptor-exprimierende Zellpo-

pulation geben muss, die die transepithiale Migration der PMN mediert. Durch Untersuchungen an knochenmarkschimären Mäusen aus Tnfr^{-/-}-Tieren und Wt-Tieren lässt sich der Nachweis erbringen, dass es sich bei der gesuchten Zellpopulation um eine hämatopoietische Zellgruppe handelt. Durch die gezielte Analyse von Chemokinen, die die Migration von PMN beeinflussen, kann das von Ly6C-Makrophagen produzierte CXCL2 als TNF-abhängig reguliertes Signalprotein identifiziert werden.

Diskussion

Die dargestellten Ergebnisse lassen sich in folgendem Modell zusammenfassen: 1.) residente Ly6C-Makrophagen erkennen die bakterielle Infektion und setzen Chemokine frei, die PMN und Ly6C+Makrophagen rekrutieren; 2.) die rekrutierten Ly6C+Makrophagen setzen das Zytokin TNF frei; 3.) dieses TNF erlaubt Ly6C-Makrophagen die Ausschüttung von CXCL2, welches für die Wanderung der PMN durch die Basalmembran verantwortlich ist. Aus der Literatur ist der Einsatz von lizenzierten Zellen bereits aus der Antwort des adaptiven Immunsystems gegenüber viralen Infektionen bekannt [3]. Unsere Befunde zeigen eine analoge Rolle für die Kooperation von Ly6C- und Ly6C+Makrophagen, die erst durch eine koordinierte Chemokinproduktion den PMN den Zugang zum Infektionsherd ermöglichen. Die Steuerung der transepithelialen Neutrophilen-Migration hilft, nach Infektionen eine effiziente und lokal begrenzte Immunantwort einzuleiten und das nicht infizierte Urothel zu schützen.

Literatur

1. Mease PJ, Goffe BS, Metz J, VanderStoep A, Finck B, Burge DJ: Etanercept in the treatment of psoriatic arthritis and psoriasis: a randomised trial. Lancet 2000;356:385-390
2. Winthrop KL, Chang E, Yamashita S, Lademarco MF, LoBue PA: Nontuberculous mycobacteria infections and anti-tumor necrosis factor-alpha therapy. Emerging infectious diseases 2009;15:1556-1561
3. Castellino F, Huang AY, Altan-Bonnet G, Stoll S, Scheinecker C, Germain RN: Chemokines enhance immunity by guiding naïve CD8+ T cells to sites of CD4+ T cell-dendritic cell interaction. Nature 2006;440:890-895.

Individualisierte zielgerichtete Volumentherapie bei der schweren experimentellen akuten Pankreatitis – impliziert positive Volumenreagibilität immer die Indikation zur Volumengabe?

K. H. Wodack · A. M. Poppe · C. J. C. Trepte · B. Saugel · K. Heckel · C. M. Strobel · D. A. Reuter

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

Korrespondenz: k.wodack@uke.de

Fragestellung

Die schwere akute Pankreatitis stellt eine klassische Ätiologie für ein SIRS dar und ist mit einer hohen Mortalität assoziiert [1]. Tierexperimentelle und klinische Studien konnten belegen, dass eine zielgerichtete Flüssigkeitstherapie, basierend auf Parametern der Volumenreagibilität wie Schlagvolumen- oder Pulsdruckvariation (SVV, PPV), die eine Maximierung des Schlagvolumenindex (SVI) anstreben, bei Krankheitsbildern, die mit einem SIRS einhergehen, die Morbidität und Mortalität senken kann [2,3]. Wir haben die Unterschiede zwischen einem individuell optimierten Volumenregime, orientiert an individuellen SVI-Werten vor Pankreatitisinduktion (Studiengruppe=SG) und einem standardisierten, SVI-maximierenden Volumenregime (Kontrollgruppe=KG), im Tiermodell untersucht. Endpunkte waren Parameter der Hämodynamik, die Pankreasgewebeoxygenierung (tpO_2), die Endothelfunktion und der Endothelschaden, die Inflammation und die Histopathologie.

Methodik

Es handelt sich um eine prospektiv randomisierte Studie an 30 Schweinen. Nach Instrumentierung und Messung der Ausgangsparameter, u.a. SVI und Herzfrequenz (HF) (M0),

erfolgte die Pankreatitisinduktion mittels intraductaler Infusion von 1,6 ml/kg Glycodeloxycholsäure und simultaner Applikation von Cerulein i.v. (5 µg/kg) (M1-M2). Nach einer Schädigung über 2 Stunden wurde mit den unterschiedlichen Therapieregimen begonnen. Allen Tieren wurde ab M0 eine Basalrate von 6 ml/kg/h Ringeracetat-Lösung kontinuierlich infundiert. Volumenboli von 7 ml/kg, kristalloide und kolloidale Flüssigkeit im Verhältnis 1:1, erfolgten in der SG orientiert an den individuell gemessenen SVI- und HF-Ausgangsparametern, wohingegen in der KG die SVI nach Pankreatitisinduktion durch repetitive Gaben von Volumenboli maximiert wurde, bis keine weitere Volumenreagibilität vorlag. Die Volumenalgorithmen wurden für weitere 6 Stunden angewendet (M3-M8). Danach erfolgte die postoperative Nachbeobachtung für 7 Tage (M9-M15). Die Hämodynamik wurde mittels transpulmonaler Thermodilution erfasst. Die tpO_2 wurde mittels einer polarographischen Sauerstoffsonde gemessen. Die Endothelfunktion wurde im Bereich der A. femoralis durch flussvermittelte Vasodilatationsmessungen (FMD), der Endothelschaden durch die Bestimmung von Heparansulfat mittels ELISA an den Zeitpunkten M0 und M8 verifiziert. Als Surrogat für die Inflammation wurde IL-6 zum Zeitpunkt M9 gemessen. Die Entnahme der Histopathologie aus Pankreaskopf (PK), Pankreascorpus (PC) und Pankreaschwanz (PS) erfolgte am 7. postoperativen Tag.

Ergebnisse

Die SG erhielt während des Therapieintervalls signifikant weniger kristalloides und kolloidales Volumen (1935.8 ± 540.7 ml (SG) vs. 3462.8 ± 828.2 ml (KG), $p < 0.001$). Die SVI wies ab M3 statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen, mit niedrigeren Werten in der SG, auf ($p \leq 0.007$). Ab M3 konnten signifikant höhere Werte für die SVV und PPV in der SG, verglichen mit der KG, verzeichnet werden ($p \leq 0.003$). Es gab

keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen für HF, MAP oder extravaskuläres Lungenwasser. Jedoch konnten in der SG, verglichen mit der KG, konstant höhere arterielle Sauerstoffpartialdrücke gemessen werden (M5: $p = 0.011$) ($p = 0.053$). Die tpO_2 wies keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen auf ($p = 0.593$). Die FMD zeigte bei M8 eine geringere endotheliale Dysfunktion für die SG (-90.76% (SG) vs. -130.89% (KG), $p = 0.046$). Ergänzend dazu konnten zu diesem Zeitpunkt signifikant niedrigere Heparansulfat-Werte in der SG verzeichnet werden (3.41 ± 5.60 pg/ml (SG) vs. 43.67 ± 46.61 pg/ml (KG), $p = 0.032$). Die IL-6-Werte waren signifikant niedriger in der SG zum Zeitpunkt M9 (32.18 ± 8.81 pg/ml (SG) vs. 77.76 ± 56.86 pg/ml (KG), $p = 0.021$). Die Histopathologie wies im Bereich PK und PC signifikant weniger Ödem für die SG auf (1.82 ± 0.87 (SG) vs. 2.89 ± 0.33 (KG) (PK), $p = 0.03$ und 2.2 ± 0.92 (SG) vs. 2.91 ± 0.3 (KG) (PC), $p = 0.025$).

Interpretation

Eine individualisierte optimierte Flüssigkeitstherapie führt im Vergleich zu einem standardisierten, SVI-maximierenden Volumenregime zu geringerer endothelialer Dysfunktion und Endothelschaden, zu geringerer Inflammation und zu weniger Gewebeödem.

Literatur

1. Banks PA, Freeman ML: Practice guidelines in acute pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 2006;101:2379-2400
2. de-Madaria E, Soler-Sala G, Sánchez-Payá J, López-Font I, Martínez J, Gómez-Escolar L, et al: Influence of fluid therapy on the prognosis of acute pancreatitis: a prospective cohort study. *Am J Gastroenterol* 2011;106:1843-50
3. Trepte CJ, Bachmann KA, Stork JH, Friedheim TJ, Hinsch A, Goepfert MS, et al: The impact of early goal-directed fluid management on survival in an experimental model of severe acute pancreatitis. *Intensive Care Med* 2013;39:717-26.

Phosphodiesterase-4-Inhibition vermindert den hepatozellulären Schaden bei der systemischen Hyperinflammation *in vitro* und *in vivo* ohne Einfluss auf die Inflammation und die HO-1

J. Wollborn¹ · C. Wunder¹ · J. Stix³ · W. Neuhaus^{1,4} · R. Bruno¹ · S. Flemming² · N. Roewer¹ · N. Schlegel² · M. A. Schick¹

1 Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie, Universitätsklinikum Würzburg

2 Klinik und Poliklinik für Chirurgie I, Universitätsklinikum Würzburg

3 Institut für Pathologie, Klinikum Nürnberg/Nord

4 Department für Medizinische/Pharmazeutische Chemie, Universität Wien (Österreich)

Korrespondenz: schick_m@ukw.de

Fragestellung

Ein durch Sepsis bedingtes Multiorganversagen ist mit einer hohen Mortalität vergesellschaftet. Pathophysiologisch spielt die Mikrozirkulationsstörung eine Schlüsselrolle [1], die in Vorarbeiten an Ratten mittels Phosphodiesterase-4-Inhibition (PD-4-I) therapiert werden konnte [2]. Das akute Leberversagen stellt einen prognostischen Indikator für ein schlechteres Outcome bei kritisch Kranken dar [3]. Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss der PD-4-I-Behandlung *in vivo* und *in vitro* auf die Leberzellintegrität und die hepatische Mikrozirkulation zu untersuchen.

Methodik

In vivo: Nach behördlicher Genehmigung wurden 16 männliche SD-Ratten anästhesiert und intensivmedizinisch instrumentiert (ZVK, Arterie, Tracheotomie, HZV-Messung). Die Tiere wurden in die Gruppen (n=5-6) Kontrolle, LPS und LPS+PD-4-I randomisiert. Der hyperinflammatorische Schock wurde bei den letzten beiden Gruppen mittels Lipopolysac-

charid (LPS) i.v. induziert und zur hämodynamischen Stabilisierung (MAD >60 mmHg) 1 ml-Boli kristalloider Lösung verabreicht. Die LPS+PD-4-I-Gruppe erhielt nach 90 min und jede weitere Stunde einen Bolus des PD-4-I Rolipram i.v. Nach 3,5 h wurden die Tiere laparotomiert und die Leber mittels Intravitalmikroskopie untersucht. Nach i.v.-Applikation von Rhodamin, FITC-Albumin, Fluorescein und Propidium-Iodid wurden die hepatische Mikrozirkulation, die Leukozytenadhäsion und der Zelluntergang *in vivo* bestimmt. Des Weiteren wurden die Serumzytospiegel, die Leberhistologie und die Hämoxigenase-1 (HO-1)-Expression mittels qRT-PCR und Western Blot analysiert.

In vitro: Die direkte PD-4-I-Wirkung auf Hepatozyten wurde mittels einer standardisierten HepG2-Zellkultur untersucht, indem die Zellen mit LPS, TNF- α sowie je in Kombination mit Rolipram inkubiert wurden. Die HO-1 wurde mit Chromium Metoporphyrin blockiert. Anschließend wurde der mitochondriale Funktionstest (XTT) als Viabilitätsassay durchgeführt. Die Statistikauswertung erfolgte bei parametrischen Datensätzen mittels ANOVA und Post-hoc-Testung nach Duncan oder bei nicht-parametrischen Daten mit Kruskal-Wallis-Test und Mann-Whitney-U-Test mit Bonferroni-Korrektur ($p\leq 0,05$; MW \pm SEM).

Ergebnisse

In vivo: Die PD-4-I-Therapie (LPS+PD-4-I) konnte eine Reduktion des hepatischen Zelluntergangs bewirken (Abb. 1B, LPS+PD-4-I 18,9 \pm 2,9; LPS 38,8 \pm 4 [tote Zellen/0,1mm 2]). Die sinusoidale Mikrozirkulation (Abb. 1A, LPS+PD-4-I 16,8 \pm 0,7 vs. LPS 13 \pm 0,6 [pl/sek]) und die Anzahl der kontinuierlich perfundierten Sinusoide unter PD-4-I-Therapie (27,2 \pm 2) war verbessert (LPS 22,5 \pm 1, K 37,1 \pm 1 [pro 0,1mm 2]). Der arterielle Mitteldruck war in der LPS+PD-4-I-Gruppe gegenüber der Kontrolle reduziert. Die Leberenzyme und der

histopathologische Schädigungs-Score zeigten keine Unterschiede zwischen LPS und LPS+PD-4-I. Die Zahl der adhärenten Leukozyten unterschied sich auch nicht, genauso die pro-inflammatorischen Zytokine IL-6, IL-12 und TNF- α . Die HO-1 zeigte ebenfalls keine Unterschiede zwischen den Gruppen.

In vitro: Die Inkubation mit LPS und TNF- α verminderte die Viabilität der HepG2 konzentrationsabhängig, während die Koinkubation mit Rolipram die Zellviabilität bei den höheren TNF- α -Konzentrationen (Abb. 1C) und bei LPS verbesserte. Der Block der HO-1 konnte diesen Effekt nicht aufheben.

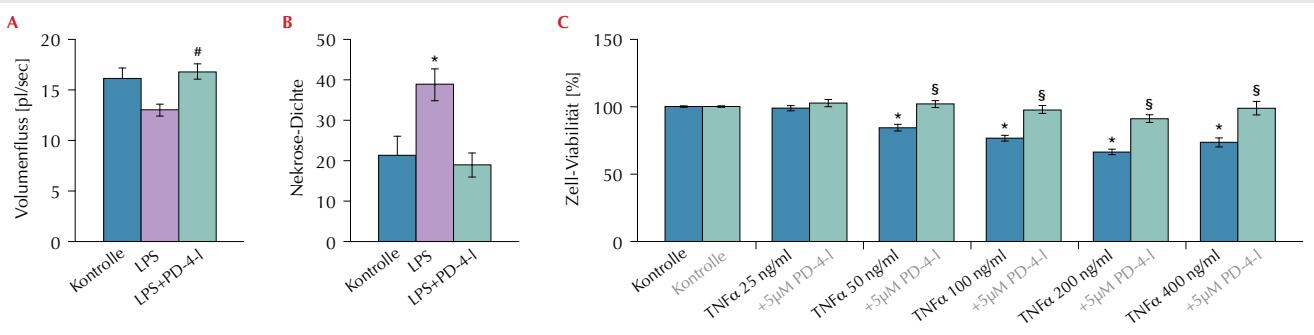
Interpretation

Die Therapie des hyperinflammatorischen Schocks mit PD-4-I verbessert den hepatischen Zelluntergang und die Mikrozirkulation *in vivo*. Die PD-4-I-Therapie hat dabei keinen Einfluss auf die systemische Entzündungsreaktion und auf die Expression der hepatoprotektiven HO-1. Die In-vitro-Untersuchungen zeigen eine direkte Zytoprotektion von PD-4-I im inflammatorischen Milieu. Weitere Untersuchungen sind wichtig, um den genauen Mechanismus der Leberprotektion aufzudecken.

Literatur

- Lee WL, Slutsky AS: Sepsis and Endothelial Permeability. *N Engl J Med* 2010;363: 689-691
- 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
- Kramer L, Jordan B, Druml W, Bauer P, Metnitz PG: Incidence and prognosis of early hepatic dysfunction in critically ill patients – a prospective multicenter study. *Crit Care Med* 2007;35:1099-1104.

Abbildung 1



A) In vivo: Hepatische Mikrozirkulation. **B)** In vivo: Nekrose-Dichte *in vivo* (Tote Zellen pro Gesichtsfeld). **C)** In vitro: HepG2-Zellviabilität.

*p<0,05 vs. Kontrolle; # vs. LPS; § vs. TNFα. MW \pm SEM.