

Inhalt

Mechanismen der Lipopolysaccharid-induzierten Hämolyse – Hinweise für eine direkte Zellmembraninteraktion S. Brauckmann · K. Effenberger-Neidnicht · H. de Groot · M. Nagel · Ch. Mayer · J. Peters · M. Hartmann	343
Der antikoagulative Effekt von Sugammadex – demaskiert als In-vitro-Phänomen! D. Dirkmann · M. Britten · K. Görlinger · H. Pauling · J. Peters	344
Untersuchungen zur Bedeutung der S1P-S1PR-Achse in der septischen Kardiomyopathie der Maus S. M. Coldewey · E. Benetti · M. Collino · M. Bauer · A. Huwiler · Ch. Thiemermann	347
Sepsis beeinflusst die Ausbildung von neutrophilen extrazellulären DNA-Netzen (Neutrophil Extracellular Traps/NETs) sowie die Serumnukleaseaktivität L. Cox · K. Walstein · L. Voellger · A. Engler · A. Höcker · H. Y. Naim · M. von Köckritz-Blickwede · J. Peters · S.T. Schäfer	348
Die Paracetamolmetaboliten para-Benzochinon und N-Acetyl-p-Benzochinonimin sensibilisieren und aktivieren den Capsaicin-Rezeptor TRPV1 M. Eberhardt · F. Schillers · A. Leffler	350
Effekte von Botulinum-Toxin B auf spontane Muskelaktivität in murinen Rückenmarks-Muskelfgewebe-Kulturen in vitro V.-S. Eckle · Ch. Grasshoff · B. Antkowiak	351
Die lektinartige Domäne des Thrombomodulin moduliert in vitro und in vivo die septische Kardiomyopathie der Maus N. Hechaichi · B. Ndongson Dongmo · R.A. Claus · M. Bauer · E. Conway · G. Theilmeier · R. Bauer · R. Heller · S.N. Stehr	355
Fibulin-6 moduliert die TGF-β-vermittelte Differenzierung von kardialen Mausfibroblasten im Rahmen der myokardialen Wundheilung Ch. Herzog · L. Hasselbach · A. Chowdhury · F. Echtermeyer · G. Theilmeier	356
micro-RNA-124a und micro-RNA-155 beeinflussen die Differenzierung regulatorischer T-Zellen bei neuropathischem Schmerz J. Heyn · B. Luchting · S. C. Azad · S. Kreth	357
Endotheliale Hyperpermeabilität nach extrakorporaler Zirkulation: Rolle der Angiopoietin-2/-1-Balance T. Hilbert · D. Dürr · M. Hamiko · S. Frede · G. Baumgarten · A. Hoeft · M. Velten	358
Tbet⁺-NK-Zellen tragen durch Rekrutierung neutrophiler Granulozyten zur Pathogenese des LPS-induzierten, akuten Lungenschadens der Maus bei S. Högl · H. K. Eltzschig · B. Zwißler · E.N. McNamee	360
Alters- und geschlechtsspezifische Unterschiede bei der Freisetzung humoraler Faktoren nach ischämischer Fernpräkonditionierung beim Menschen, in der Ratte in vitro R. Huhn · T. Meyer-Treschan · I. Bauer · M.W. Hollmann · A. Heinen	361
Die Inhibition von Ninjurin-1 vermindert die systemische Entzündung bei der murinen polymikrobiellen Peritonitis C. Jennewein · R. Sowa · A. C. Faber · M. Dildey · K. Zacharowski	362
Persistenter kortikaler Informationsfluss im EEG während tiefer Sevoflurannarkose bis Burst-Suppression D. Jordan · R. Ilg · A. Ranft · P. Kohl · E. F. Kochs	363
Höhere Tidalvolumen-Variabilität verhindert Derekrutierung und reduziert die Lungenschädigung im experimentellen Lungenversagen der Ratte Th. Kiss · R. Huhle · P. L. Silva · Th. Koch · P. R. M. Rocco · M. Gama de Abreu	366
Mitochondriale DNA: Der „missing link“ zur Immunsuppression beim kritisch Kranken A. Limmer · M. Adamzik · L. Franken · S. Frede · J. Walden · N. Schönborn · A. Engler · J. Fandrey · A.M. Westendorf · J. Steinmann · J. Peters · S.T. Schäfer	367
Heparansulfate induzieren eine mitochondriale Dysfunktion in murinen Kardiomyozyten L. Martin · C. Peters · S. Schmitz · M. Lehrke · G. Mueller-Newen · G. Marx · T. Schuerholz	368

Abstracts der 29. Wissenschaftlichen Arbeitstage der DGAI

27. - 28.02.2015, 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 27. - 28.02.2015 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 2016 der Fresenius-Stiftung und das DGAI-Forschungsstipendium der Fresenius-Stiftung finden Sie auf der Seite 342.

Humane mesenchymale Stammzellen stellen das purinerge Calciumsignal in Bronchialepithelzellen von Zystische-Fibrose-Patienten wieder her V. Meidl · M. Kieffmann · C. Börrnchen · K. Riecken · C. Lange · S. Schrepfer · A.E. Goetz · R. Kieffmann	369
ApoA-I-mimetisches Peptid und E06 mAb als neue Targets bei OxPAPC-induzierter Hyperalgesie bei Ratten B. Oehler · R. Mayer · S. Sauer · M. Mohammadi · D. Pflücke · J. Schiller · N. Roewer · R. Blum · A. Brack · H. Rittner	370
Elektrohydraulische Stimulation reguliert die Gefäßregeneration über die Freisetzung von freien TLR3-Liganden und exosomaler microRNA P. Paulus · C. Tepeköylü · B. Scheller · Ch. Reissig · M. Grimm · K. Zacharowski · J. Holfeld	371
Differentielle Transkriptionsanalyse von geschädigten und intakten benachbarten Spinalwurzelganglienneuronen bei Neuropathie bei Mäusen A.-K. Reinhold · L. Batti · D. Bilbao · N. Roewer · H.L. Rittner · P.A. Heppenstall	372
Variable Dehnung reduziert die Freisetzung von Zytokinen bei Lipopolysaccharid-stimulierten Alveolarepithelzellen mittels des extrazellulär regulierten Kinase-1/2-Signalweges I. Rentzsch · C. L. Santos · R. Huhle · C. Schnabel · E. Koch · T. Koch · M. Gama de Abreu	374
Die Cox1-induzierte Thromboxansynthese vermittelt die Neutrophilen-Rekrutierung, NET-Formation und Pathogenbeseitigung in einem murinen Modell der bakteriellen Pneumonie J. Rossaint · H. Van Aken · A. Zarbock	375
Das Methylierungsmuster des AQP5-Promotors beeinflusst die AQP5-Expression in Immunzellen und die Prognose von Patienten mit Sepsis K. Rump · S. Schäfer · M. Unterberg · M. Kreuzer · A. Gronek · L. Bergmann · S. Hahn · W. Siffert · J. Peters · M. Adamzik	377

Ausschreibung des DGAI-Forschungsstipendiums der Fresenius-Stiftung

Die 30. Wissenschaftlichen Arbeitstage der Deutschen Gesellschaft für Anästhesiologie und Intensivmedizin (DGAI) werden vom 19. – 20.02.2016 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.

2016 wird das DGAI-Forschungsstipendium der Fresenius-Stiftung für eine hervorragende Forschungsarbeit mit 15.000 € dotiert. Grundlagenforschung und klinische Forschung sollen gleichermaßen gefördert werden.

Einsendeschluss:

06.01.2016

Nähere Informationen:

www.anaesthesie.ukw.de/wat

E-Mail: wat_wuerzburg@ukw.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 20150015

Fax: 0931 20150019

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

Aktivierung und Sensibilisierung des nozizeptiven Ionenkanals TRPA1 durch die Hauptmetaboliten von Metamizol

S. A. Schenk · F. Dick · M. Eberhardt · A. Leffler

378

Repulsive Guidance Molecule A (RGM-A) fördert die Entzündungsresolution während einer experimentell induzierten murinen Peritonitis

M. Schlegel · A. Körner · S. Wiese · M. Giera · V. Mirakaj

379

Einfluss von freiem Häm auf Mikrozirkulation und zelluläre Integrität der Leber unter Stressbedingungen

F. Schleser · R.A. Seidel · S. Weis · M. Clemens · S.H. Heinemann · M. Bauer

380

TLR2-defiziente hämatopoetische Zellen vermitteln eine Reduktion der Neointima im vaskulären Heilungsprozess nach arterieller Gefäßverletzung

J. C. Severitt · A. Butschkau · L. Bierhansl · B. Vollmar · G. E. F. Nöldge-Schomburg · J. P. Roesner · N.-M. Wagner

382

Mitochondriale DNA ist ein Ligand des zytosolischen cGAS-STING-Signalwegs

F. Steinhagen · S. Frede · V. Hornung · G. Baumgarten · C. Bode

383

Permeation des Lidocainderivates QX-314 durch die humanen Isoformen von TRPV1 und TRPA1 vermittelt eine Inhibition neuronaler Natriumkanäle und Zytotoxizität

T. Stüber · M. Eberhard · C. Hadamitzky · A. Jangra · S. Schenk · A. Leffler

384

Suppression der zellulären Inflammation als Mechanismus der AT1-vermittelten Verringerung des posttraumatischen Hirnschadens im Modell der Maus

R. Timaru-Kast · S. P. Coronel-Castello · A. V. Hugonnet · C. Götz · T. Krämer · A. Sebastiani · M. K.E. Schäfer · K. Engelhard · S. C. Thal

385

Die topische Applikation von Nitroglycerin (NO) oder Iloprost (PGI₂) verbessert die Oxygenierung der gastralen Mukosa während milder Hämorrhagie an Hunden

R. Truse · A. Weber · I. Bauer · O. Picker · C. Vollmer

386

Argon vermittelt in vitro in neuronalen Zellen zytoprotektive Effekte über den Toll-like-Rezeptor 4

F. Ulbrich · F. Wellner · H. Buerkle · T. Loop · U. Goebel

387

Der Aquaporin-5-Gen-Promotor A(-1364)C-Polymorphismus ist mit dem akuten Nierenversagen nach schwerem „acute respiratory distress syndrome“ (ARDS) assoziiert

M. Unterberg · S. Schäfer · K. Rump · W. Siffert · J. Peters · M. Adamzik

388

Effekte von Levosimendan auf die Calciumhomöostase des Kardiomyozyten nach Sepsisinduktion bei der Ratte

S. Wagner · C. Weber · R. Galmbacher · S. Hein · S. Schürmann · J. Fechner · J. Schüttler · O. Friedrich

390

Mechanismen der Lipopolysaccharid-induzierten Hämolyse – Hinweise für eine direkte Zellmembraninteraktion

S. Brauckmann^{1,2} · K. Effenberger-Neidnicht² · H. de Groot² · M. Nagel³ · Ch. Mayer³ · J. Peters¹ · M. Hartmann¹

1 Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin

2 Institute für Physiologische Chemie und

3 Physikalische Chemie

Universität Duisburg-Essen und
Universitätsklinikum Essen

Korrespondenz:

stephan.brauckmann@uk-essen.de

Fragestellung

Lipopolysaccharide (LPS) sind bakterielle Bestandteile, deren Toll-like-Rezeptor-Bindung proinflammatorisch wirkende Zytokine induziert. Klinisch bestehen bei Sepsis oft Hinweise auf Hämolyse mit Anstieg der freien Hämoglobinkonzentration. Zwar vermittelt freies Hämoglobin (und Abbauprodukte) unerwünschte Effekte (NO-„scavenging“, Lipidperoxidation) [1], ist mit erhöhter Letalität assoziiert und prognostisch relevant [2], jedoch sind die Mechanismen der Sepsis-induzierten Hämolyse unbekannt. Wir haben getestet, ob LPS-induzierte Hämolyse 1) Komplement- oder Zytokin-abhängig ist; 2) durch direkte Membraninteraktion evoziert wird.

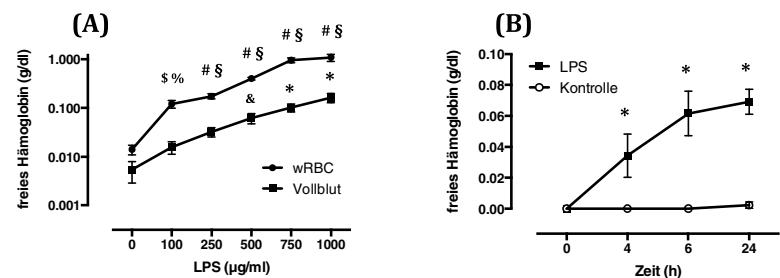
Material und Methodik

Vollblut sowie (zum Ausschluss Komplement-vermittelter Effekte) Suspensionen gewaschener Erythrozyten gesunder Erwachsener wurden mit *E. coli* LPS (Serotyp 0111:B4, Konzentration: 0-1.000 µg/ml) bzw. Vehikel bei 37 °C inkubiert und nach definierten Zeitintervallen die Konzentrationen von freiem Hämoglobin (Spektrophotometrie) sowie die Laktatdehydrogenase (LDH)-Aktivität gemessen, ebenso erythrozytäre osmotische Resistenz (hypotone NaCl-Verdünnungsreihe), Morphologie (Lichtmikroskopie) sowie Membransteifigkeit (atomic force microscopy). Um TLR-vermittelte Mechanismen zu bewerten, wurden alle Untersuchungen sowohl mit *E. coli* LPS als auch einem nicht-toxisch wirkenden LPS durchgeführt, nämlich dem TLR-4-Rezeptor-Antagonisten R. sphaeroides LPS (RS-LPS) [3]. Die TNF-α Konzentration (DuoSet-ELISA, R&D Systems) im Assay wurde ebenfalls bewertet. Statistik: Mittelwerte±SD, Ein- und Mehrweg-Varianzanalyse, Post-hoc-t-Test für unverb. Stichproben, $p < 0,05$.

Ergebnisse

E. coli LPS induzierte im Vollblut sowohl konzentrations- als auch zeitabhängig (Abb. 1A und B) eine Hämolyse, mit einer bis auf das 30-fache erhöhten freien Hämoglobinkonzentration sowie in gewaschenen Erythrozy-

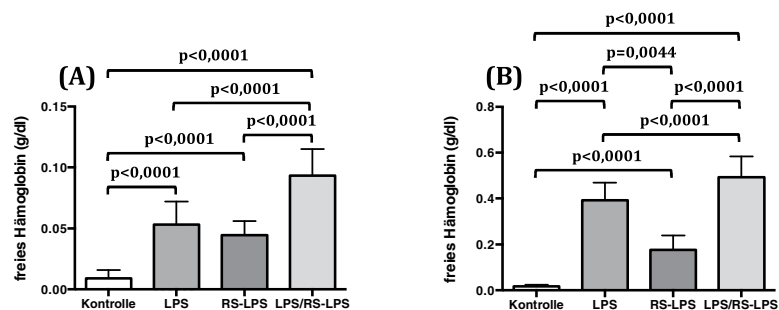
Abbildung 1



LPS-Dosis (A) und -zeitabhängigkeit (B) der freien Hämoglobinkonzentration unter LPS-Inkubation. Die LPS-Exposition erfolgte dosisabhängig über jeweils 6h mit LPS-Dosen von 100, 250, 500, 750, 1.000 µg/ml sowohl im Vollblut als auch in Erythrozytensuspensionen (wRBC) (A). Freie Hämoglobinkonzentration im Vollblut nach (4,6) sowie 24h LPS-Exposition mit einer mittleren LPS-Konzentration von 500 µg/ml LPS bzw. unstimulierte Kontrollen (B). Mittelwerte ± SD; n=12.

* $p < 0,0001$ vs. Kontrolle, # $p < 0,0001$ vs. Kontrolle, \$ $p < 0,0001$ wRBC vs. Vollblut, & $p = 0,0057$ vs. Kontrolle, \$ $p = 0,03$ vs. Kontrolle, % $p = 0,0043$ wRBC vs. Vollblut.

Abbildung 2



Endotoxin-induzierte Hämolyse in Vollblut (A) und wRBC (B) unter 6h Inkubation mit LPS, RS-LPS, RS-LPS/LPS kombiniert sowie Vehikel. Mittelwerte ± SD; n=12.

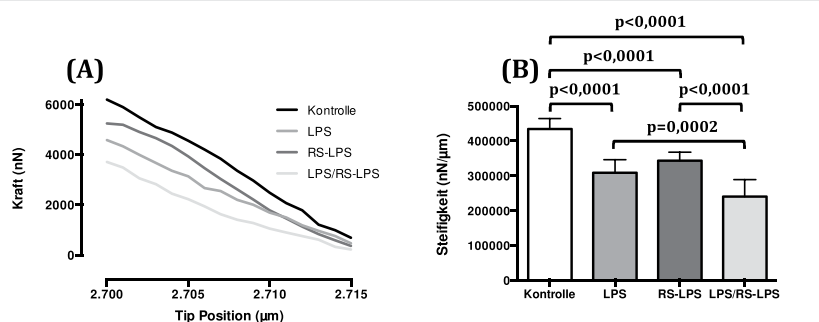
ten eine knapp 80-fach erhöhte freie Hämoglobinkonzentration. RS-LPS führte ebenfalls zu einer gesteigerten Hämolyse in Vollblut sowie in gewaschenen Erythrozyten (Abb. 2). Zelluläre Co-Inkubation mit LPS und RS-LPS zeigte zwar eine Abschwächung der LPS-induzierten TNF-α-Konzentration ($18474 \text{ pg/ml} \pm 1303$ auf 8244 ± 1310 , $p < 0,0001$), jedoch erstaunlicherweise sogar eine massive Erhöhung der freien Hämoglobinkonzentration (Vollblut: $0,009 \text{ g/dl} \pm 0,007$ auf $0,093 \pm 0,022$, $p < 0,0001$; gewaschene Erythrozytensuspensionen: $0,017 \text{ g/dl} \pm 0,008$ auf $0,493 \pm 0,091$, $p < 0,0001$) über LPS-induzierte Werte hinaus. Die osmotische Resistenz LPS-behandelter Erythrozyten war vermindert (EC50: $143,4 \text{ mOsm} \pm 0,9$ vs. $132,3 \pm 1$, $p < 0,0001$). LPS-exponierte Erythrozyten zeigten einen bis zu 20%igen Anteil deformierter Erythrozyten sowie reduzierte Membransteifigkeit ($308900 \text{ nN/}\mu\text{m} \pm 35803$ vs. 434800 ± 30048 , $p < 0,0001$), wobei Co-Inkubation mit LPS/RS-LPS zu einer weiteren erheblichen Verminde-

rung der Membransteifigkeit führte ($240117 \text{ nN/}\mu\text{m} \pm 47933$, $p < 0,0001$) (Abb. 3).

Interpretation

LPS evoziert also in vitro eine Hämolyse, vermindert die Steifigkeit humaner Erythrozyten und vermag eine Hypoosmolalität-evozierte Hämolyse zu verstärken. Da RS-LPS diese Effekte trotz Reduktion der TNF-α-Konzentration im Überstand verstärkt, werden Effekte auf Membraneigenschaften und Zytokinfreisetzung interessanterweise separat vermittelt. Demnach wäre die LPS-induzierte Hämolyse nicht TLR-4-, sondern Rezeptor-unabhängig durch LPS-Interaktion mit der Erythrozytenmembran vermittelt. Die Befunde an gewaschenen Erythrozyten zeigen zudem, dass eine Hämolyse unabhängig von Komplement- und proinflammatorischem Zytokinsystem induziert wird. Mit welchen anderen Membranen LPS Rezeptor-unabhängig interagiert und wie Interaktion und Hämolyse blockiert werden können, bleibt zu untersuchen.

Abbildung 3



Endotoxin-induzierte Veränderung erythrozytärer Steifigkeit im Vollblut nach 6h Inkubation mit Vehikel, LPS, RS-LPS bzw. LPS/RS-LPS stimuliert. Vertikal benötigte Kraft gegen die zurückgelegte Wegstrecke der Untersuchungsspitze. Befunde repräsentativer Experimente (A) sowie die aus der Steigung der Einzelkurven berechneten Mittelwerte der Steifigkeiten (B). Mittelwerte \pm SD; n=12.

Literatur

1. Rother RP, Bell L, Hillmen P, Gladwin MT: The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease. *JAMA* 2005;293:1653-62
2. Adamzik M, Hamburger T, Petrat F, Peters J, de Groot H, Hartmann M: Free hemoglobin concentration in severe sepsis: methods of measurement and prediction of outcome. *Crit Care* 2012;16:R125-34
3. Kutuzova GD, Albrecht RM, Erickson CM, Qureshi N: Diphosphoryl lipid A from *Rhodobacter sphaeroides* blocks the binding and internalization of lipopolysaccharide in RAW 264.7 cells. *J Immunol* 2001;167:482-9.

Der antikoagulative Effekt von Sugammadex – demaskiert als In-vitro-Phänomen!

D. Dirkmann · M. Britten · K. Görlinger · H. Pauling · J. Peters

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

Korrespondenz: Martin.Britten@uk-essen.de

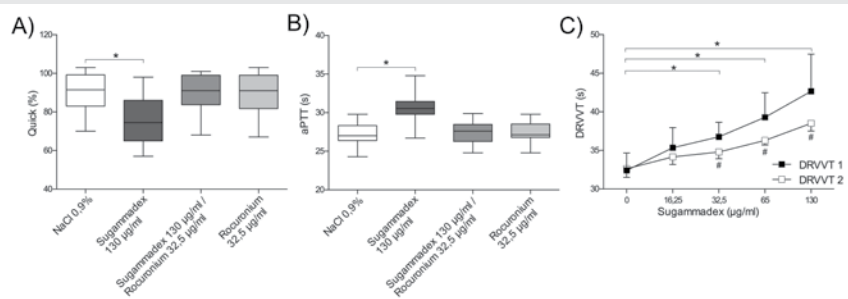
Fragestellung

Nach Injektion von Sugammadex wurden antikoagulative Wirkungen mit Verlängerung der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit (aPTT) sowie Prothrombinzeit (TPZ) beschrieben [1], die u.a. einer FDA-Zulassung von Sugammadex entgegenstanden. Ziel unserer Untersuchungen war es, etwaige Effekte klinisch relevanter Dosen von Sugammadex in der Gerinnungskaskade zu lokalisieren.

Methodik

Nach Billigung der Ethikkommission wurde venöses Vollblut gesunder Probanden (n=18) mit verschiedenen Methoden gerinnungsanalytisch untersucht, und zwar jeweils unter Zugabe von Sugammadex (Konzentration: 130 µg/ml; entsprechend 16 mg/kg Körpergewicht), Rocuronium (32,5 µg/ml), Sugammadex plus Rocuronium (in äquimolaren Mengen) sowie NaCl 0,9% (Kontrolle). Als Methoden der Gerinnungsanalyse kamen zur Anwendung: Standardtests der plasmatischen Gerinnung (TPZ (Quick), aPTT, TZ, Fibrinogenkonzentration), die Dilute Russell Viper Venom Time mit niedriger (DRVVT1) sowie hoher Phospholipidkonzentration (DRVVT2), Vollblut-Rotations-thrombelastometrie (ROTEM® mit extrinsisch (EXTEM®, FIBTEM®) und intrinsisch (INTEM®)

Abbildung 1



Sugammadex verlängert signifikant (*) Thromboplastinzeit (Quick) (A) und aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) (B) sowie die Dilute Russell Viper Venom Time (DRVVT) mit niedriger Phospholipidkonzentration (C). Hohe Phospholipidkonzentrationen im Assay schwächen diesen Effekt jedoch signifikant (#) ab (C).

aktivierten Assays), Aktivität der Gerinnungsfaktoren II, V sowie VII–XIII. Statistik: Prüfung auf Normalverteilung; Friedman-Test mit Dunn-Adjustierung, Mann-Whitney-U-Test.

Ergebnisse

Sugammadex allein führte in vitro zu einer Verlängerung der TPZ nach Quick (-16,6%; p<0.0001) (Abb. 1A), Verlängerung der aPTT (+13,1%; p=0.0003) (Abb. 1B) sowie zu Verlängerungen der ROTEM®-Gerinnungszeiten (CT im EXTEM®: +33.1%; p=0.0028; INTEM®: +22.4%, p=0.0003). Ferner wurden die Aktivitäten der Gerinnungsfaktoren VIII (-7%; p=0.009), IX (-7,8%; p<0.0001), XI (-7%; p<0.0001) sowie XII (-4,3%; p=0.0148) reduziert. Thrombinzeit, Fibrinogenkonzentration, Gerinnselfestigkeiten (im EXTEM®, INTEM® und FIBTEM®), Fibrinolyse (clot lyse index 60) sowie die Aktivitäten der übrigen Gerinnungsfaktoren wurden nicht signifikant verändert. Die alleinige Gabe von Rocuronium bzw. die kombinierte Gabe von Sugammadex und

Rocuronium in äquimolaren Mengen hatten hingegen keinen signifikanten Einfluss auf die gemessenen Variablen. Bemerkenswerterweise führte Sugammadex jedoch zu einer dosisabhängigen, signifikanten Verlängerung der DRVVT1, welche jedoch im Assay mit hoher Phospholipidkonzentration (DRVVT2) signifikant abgeschwächt wurde (Abb. 1C).

Interpretation

Sugammadex allein führt also sowohl in plasmatischen Gerinnungsanalysen als auch in der Vollblut-Rotationsthembelastometrie zu signifikanten, klinisch bedeutsam erscheinenden antikoagulativen Effekten. Die unter Sugammadex verringerten Aktivitäten der Faktoren VIII, IX, XI und XII, die initial den Verdacht aufkommen ließen, dass Sugammadex nicht nur Rocuronium, sondern auch Gerinnungsfaktoren binden mag, sind indes quantitativ unzureichend, um die beobachteten Verlängerungen der Gerinnungszeiten zu erklären. Auch lassen sich Veränderungen extrinsisch

aktivierter Assays (TPZ, CT EXTEM®) nicht durch Reduktion der Aktivität dieser dem intrinsischen Teil der Gerinnungskaskade zuzurechnenden Faktoren erklären. Gemeinsamer „Nenner“ aller signifikant veränderten Assays ist vielmehr einzig deren Abhängigkeit vom Vorhandensein von Phospholipiden im Test selbst. Zwar sind Phospholipide selbst gerinnungs-inert, sie dienen indes als Oberfläche für gerinnungsenzymatische Reaktionen. Die

verlängerten Gerinnungszeiten in mehreren Phospholipid-sensitiven Assays (aPTT, TPZ, DRVVT1) und deren Verkürzung in einem Assay unter hoher Phospholipidkonzentration (DRVVT2) zeigen vielmehr – gemäß Kriterien der Internationalen Gesellschaft für Thrombose und Hämostase (ISTH) – einen Anti-Phospholipid-Antikörperartigen Effekt von Sugammadex an [2]. Somit demaskieren unsere Untersuchungen den vermeintlich anti-

koagulatorischen Effekt von Sugammadex als Artefakt und In-vitro-Phänomen in üblichen Gerinnungstests.

Literatur

1. De Kam PJ, Grobara P, Prohn M, et al: Int J Clin Pharmacol Ther 2014;52:227-36
2. Pengo V, Tripodi A, Reber G, et al: J Thromb Haemost 2009;7:1737-40.

Untersuchungen zur Bedeutung der S1P-S1PR-Achse in der septischen Kardiomyopathie der Maus

S. M. Coldewey^{1,2} · E. Benetti³ · M. Collino³ · M. Bauer^{1,2} · A. Huwiler⁴ · Ch. Thiemermann⁵

- 1 Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin, Universitätsklinikum Jena
- 2 Center for Sepsis Control and Care, Universitätsklinikum Jena
- 3 Department of Drug Science & Technology, University of Turin
- 4 Institut für Pharmakologie, Universität Bern
- 5 The William Harvey Research Institute, Barts & The London School of Medicine & Dentistry, Queen Mary University of London

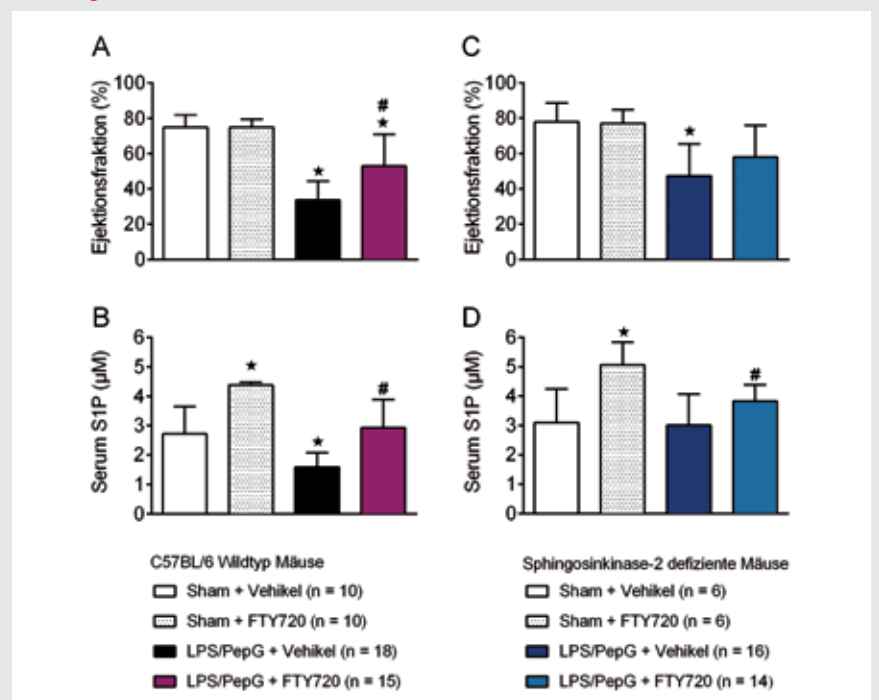
Korrespondenz: sina.coldewey@med.uni-jena.de

Preisträgerin des DGAI-Forschungsstipendiums der Fresenius-Stiftung 2015

Fragestellung

Sphingosin-1-Phosphat (S1P) reguliert als Lipid-Signaltransduktor über Bindung an die fünf bekannten S1P-Rezeptoren (S1PR1-5) verschiedenste biologische Funktionen. S1P entsteht durch Phosphorylierung von Sphingosin durch Sphingosinkinase (SPHK)-1 und -2 [1]. Der Immunmodulator FTY720 wird in vivo zu FTY720-P phosphoryliert, welches primär ein unselektiver Agonist an S1PR1 und S1PR3-5 sowie sekundär ein selektiver funktioneller Antagonist an S1PR1 ist [1]. Die Bedeutung der S1P-S1PR-Achse für die Pathophysiologie und ihre Eignung als Target für die Behandlung der septischen Kardiomyopathie ist unbekannt.

Abbildung 1



Effekte von LPS/PepG-Applikation und Behandlung mit FTY720 auf die Ejektionsfraktion und die S1P-Serumspiegel von Wildtyp- und SPHK-2 defizienten Mäusen.

Mittelwerte und Standardabweichung, *p < 0,05 vs. Sham + Vehikel; #p < 0,05 vs. LPS/PepG + Vehikel.

Material/Methodik

Wir verwendeten ein Modellsystem, in dem durch Verabreichung der bakteriellen Zellwandkomponenten Lipopolysaccharid (LPS;

9 mg/kg i.p.) und Peptidoglycan (PepG; 1 mg/kg i.p.) bei C57BL/6 Wildtyp(WT)- und SPHK-2 defizienten Mäusen eine kardiale Dysfunktion induziert wurde [2]. Die Mäuse

erhielten 1 h nach LPS/PepG-Gabe FTY720 (0,1 mg/kg i.v.). Um die molekularen Mechanismen für beobachtete FTY720-Effekte zu untersuchen, wurden WT-Mäusen 45 min nach LPS/PepG und 15 min vor FTY720 ein selektiver Phosphatidylinositol-3-Kinase-(PI3K)-Inhibitor (LY294002; 0,3 mg/kg i.v.) oder ein selektiver S1PR2-Antagonist (JTE013; 1 mg/kg i.v.) oder 1 h nach LPS/PepG ein selektiver S1PR1-Agonist (SEW2871; 1 mg/kg i.v.) appliziert. Bei allen Tieren wurden nach 18 h die prozentuale Ejektionsfraktion (EF) echokardiographisch evaluiert [2], S1P-Serumspiegel mittels Flüssigchromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie (LC/MS/MS) bestimmt [3] und die Expression ausgewählter Signalmoleküle im Herzen mittels Immunoblot-Analysen ermittelt [2]. Tierversuche erfolgten nach Genehmigung durch die lokale Tierschutzkommission. Die statistischen Auswertungen erfolgten mit einer univariaten Varianzanalyse und Bonferroni-Korrektur.

Ergebnisse

WT-Mäuse entwickelten 18 h nach LPS/PepG-Gabe im Vergleich zu scheinbehandelten WT-Mäusen eine signifikante Reduktion der EF (Abb. 1A) und der S1P-Serumspiegel (Abb. 1B). Die nach Behandlung mit FTY720 beobachtete signifikant verbesserte EF ging

mit einer Erhöhung des Serum-S1P einher (Abb. 1A, B). Die EF von SPHK-2 defizienten Mäusen war 18 h nach LPS/PepG-Gabe nur mittelgradig eingeschränkt (Abb. 1 C) und signifikant höher als bei korrespondierenden WT-Mäusen (Abb. 1A). Die hier gemessenen S1P-Werte entsprachen denjenigen der scheinbehandelten Tiere (Abb. 1D). Nach Applikation von FTY720 stiegen die S1P-Serumspiegel signifikant an, einhergehend mit einer Verbesserung der EF, welche in SPHK-2 defizienten Mäusen jedoch nicht signifikant war (Abb. 1C, D). Die Verabreichung des PI3K-Inhibitors oder S1PR2-Antagonisten vor FTY720-Gabe konnte die protektiven Effekte von FTY720 bei WT-Mäusen vollständig aufheben. Die Applikation des S1PR1-Agonisten hatte keinen Effekt auf die reduzierte EF der WT-Mäuse nach LPS/PepG-Gabe. Immunoblot-Analysen des Herzwesens von WT-Mäusen, die nach LPS/PepG-Gabe FTY720 erhielten, zeigten eine signifikante Zunahme der Phosphorylierung (Aktivierung) von AKT und endothelialer Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) im Vergleich zu den mit Vehikel behandelten LPS/PepG-Kontrollen.

Interpretation

SPHK-2-defiziente Mäuse weisen nach LPS/PepG eine bessere kardiale Funktion auf als WT-Tiere. Sie scheinen durch höhere en-

dogene S1P-Spiegel geschützt zu sein. Die Verbesserung der eingeschränkten linksventrikulären Kontraktilität nach LPS/PepG-Gabe bei WT-Mäusen durch die Behandlung mit FTY720 geht mit einer Erhöhung der biologischen Verfügbarkeit von S1P im Serum einher. Zusammenfassend weisen unsere Ergebnisse darauf hin, dass eine Aktivierung des S1PR2 über durch FTY720 erhöhtes Serum-S1P und die nachfolgende Aktivierung von PI3K, AKT und eNOS eine entscheidende Rolle für den kardioprotektiven Effekt von FTY720 in unserem Modellsystem spielen.

Literatur

1. Maceyka M, Spiegel S: Sphingolipid metabolites in inflammatory disease. *Nature* 2014; 510:58-67
2. Coldewey SM, Rogazzo M, Collino M, et al: Inhibition of IkappaB kinase reduces the multiple organ dysfunction caused by sepsis in the mouse. *Dis Mod el Mech* 2013;6:1031-1042
3. Schmidt H, Schmidt R, Geisslinger G: LC-MS/MS-analysis of sphingosine-1-phosphate and related compounds in plasma samples. Prostaglandins & other lipid mediators 2006;81:162-170.

Sepsis beeinflusst die Ausbildung von neutrophilen extrazellulären DNA-Netzen (Neutrophil Extracellular Traps/NETs) sowie die Serumnukleaseaktivität

L. Cox¹ · K. Walstein¹ · L. Voellger² · A. Engler¹ · A. Höcker¹ · H. Y. Naim² · M. von Köckritz-Blickwede² · J. Peters¹ · S.T. Schäfer¹

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

2 Institut für Physiologische Chemie, Tierärztliche Hochschule Hannover

Korrespondenz: lindacox@gmx.de

Fragestellung

Neutrophile Granulozyten können sowohl als Reaktion auf proinflammatorische Signale als auch nach Kontakt mit bakteriellen Erregern ein extrazelluläres Netz aus DNA und antimikrobiellen Peptiden bilden, sogenannte Neutrophil Extracellular Traps (NETs). Diese vermögen verschiedene Pathogene wie *Staphylokokkus aureus* zu immobilisieren [1]. Um einer überschüssigen NET-Produktion entgegenzuwirken, reagiert der Wirtsorganismus andererseits mit Aktivierung NETs-

degradierender Nukleasen [2]. Da eine Depletierung von NETs bei Mäusen zu einem fulminanten Sepsisverlauf führt, haben NETs offenbar eine essentielle Funktion in der Immunabwehr [3]. Unbekannt ist jedoch, wie die NETs-Bildung bei Patienten mit Sepsis reguliert ist. Daher testeten wir die Thesen, dass 1) die Produktion von Netzen ex vivo sowie 2) die Nukleaseaktivität im Serum von Patienten mit Sepsis im Vergleich zu gesunden Probanden induziert ist.

Methodik

Neutrophile Granulozyten von 21 gesunden Probanden sowie 15 Patienten mit Sepsis wurden nach positivem Votum der Ethikkommission isoliert (Dichtegradientenzentrifugation, Polymorphprep, Progen, Heidelberg) und 5×10^5 Neutrophile je Well in 500 µl FKS-freiem RPMI 1.640 Medium eingesetzt. Wir bestimmten die Ausbildung von NETs durch die so isolierten Neutrophilen (Immunfluoreszenzmikroskopie) sowohl in unstimulierten Assays als auch unter Inkubation mit hitzeinaktiviertem *Staphylokokkus aureus* bzw. Phorbol-myristat-acetat (PMA). Bewertet wurde der Anteil NETs-ausbildender Neutrophiler je Gesichtsfeld (6 repräsentative Bilder; zwei Wells je Kondition). Zusätzlich bestimmten

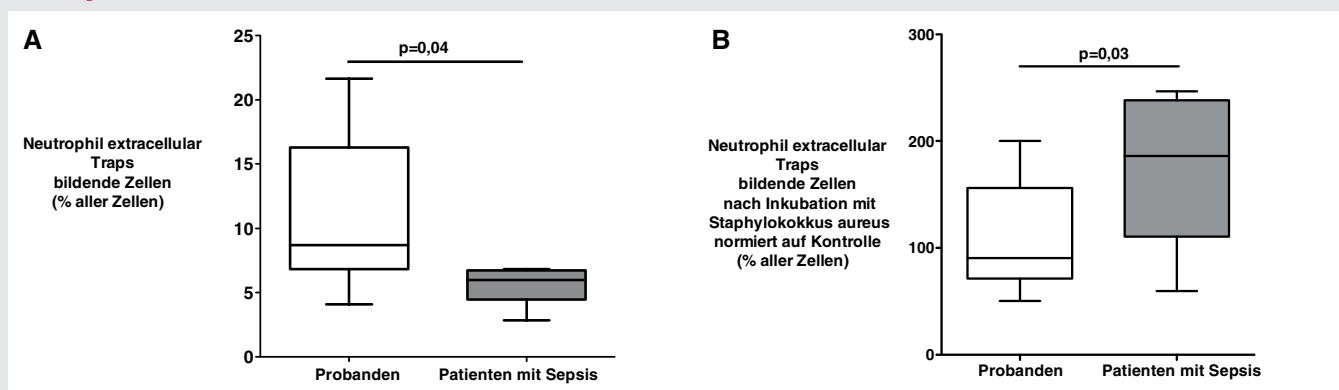
wir die Nukleaseaktivität im Serum bei 40 Patienten mit Sepsis und 15 gesunden Probanden mittels Nukleaseverdau (Zugabe von 7,5 µl Kälber-Thymus-DNA mit einer Konzentration von 1mg ml⁻¹) und anschließender Beurteilung der DNA-Degradation mittels Agarose-Gelelektrophorese (kategoriale Einteilung I-VI: 1 keine Degradation, 6 vollständige Degradation). Patientencharakteristika und Simplified Acute Physiology Score II wurden bei Studieneinschluss dokumentiert.

Statistik: Mittelwerte±SD; Shapiro-Wilk-normality, Student's t- und Mann-Whitney-Tests; Spearman-Korrelation; p<0,05.

Ergebnisse

Die unstimulierte In-vitro-NETs-Bildung bei Patienten mit Sepsis war im Vergleich zu gesunden Probanden entgegen unserer Erwartung nach 2 h um 48% (4,6%±1,8 vs. 7,9±2,7, p=0,0002) und nach 4 h sogar um 50% (5,6%±1,6 vs. 11,1±5,9; p=0,04, Abb. 1A) reduziert. Inkubation mit hitzeinaktiviertem *Staphylokokkus aureus* induzierte hingegen die NETs-Bildung in den Proben von Patienten mit Sepsis nach 4 h um 79% (8,7%±2,7 vs. 4,9%±1,6; p=0,01), nicht jedoch in Proben gesunder Probanden (9,2%±3,8 vs. 8,4±3,2; p=n.s.; Abb. 1B). Stimulierte man Neutrophile

Abbildung 1



A) Anteil neutrophil extracellular traps (NETs) bildender Zellen bei gesunden Probanden und Patienten mit Sepsis. Bei Patienten mit Sepsis ($n=15$) ist der Anteil NETs bildender Zellen in vitro ohne Stimulation im Vergleich zu gesunden Probanden ($n=21$) stark reduziert.

B) Einfluss von hitzeinaktiviertem *Staphylococcus aureus* auf die Ausbildung von neutrophil extracellular traps (NETs) bildenden Zellen. Hitzeinaktivierter *Staphylococcus aureus* induziert den Anteil NETs ausbildender Zellen bei Patienten mit Sepsis ($n=6$), nicht jedoch bei gesunden Probanden ($n=10$).

jedoch für 4 h mit dem potenten chemischen Agens PMA (Positivkontrolle), zeigte sich sowohl in den Proben von Patienten mit Sepsis wie auch denen von Probanden eine submaximale NETs-Bildung ($88\% \pm 14$ vs. 88 ± 15 ; $p=n.s.$), welche zwischen den Gruppen nicht unterschiedlich war. Die Nukleaseaktivität im Serum von Patienten mit Sepsis war gegen-

über Gesunden reduziert ($2,7$ Kategorien $\pm 0,8$ vs. $4,9$ Kategorien $\pm 0,4$; $p < 0,0001$). Auch korrelierte die Nukleaseaktivität invers mit dem Simplified Acute Physiology Score II ($r = -0,335$; $p = 0,04$) sowie der Procalcitoninkonzentration als Surrogatvariable für den Grad einer bakteriellen Sepsis ($r = -0,535$; $p = 0,01$). Septische Patienten und gesunde Probanden

unterschieden sich nicht hinsichtlich Größe, Gewicht und Alter (alle $p > 0,05$). Septische Patienten hatten einen SAPS II von 34 ± 11 , und im Vergleich zu gesunden Probanden wiesen septische Patienten erhöhte Leukozytenkonzentrationen ($14 \text{ nl}^{-1} \pm 7$ vs. $7 \text{ nl}^{-1} \pm 1$; $p = 0,01$), C-reaktives Protein-Konzentrationen ($24 \text{ mg ml}^{-1} \pm 13$ vs. $0,4 \text{ mg ml}^{-1} \pm 0,8$;

$p=0,0001$) und Prokalcitoninkonzentrationen ($68 \text{ ng ml}^{-1} \pm 138$ vs. $0 \text{ ng ml}^{-1} \pm 0$; $p=0,0001$) im Serum auf. Bei 12 von 15 septischen Patienten konnte ein mikrobiologischer Keimnachweis geführt werden (3 x grampositive Sepsis, 1 x gramnegative Sepsis, 1 x Pilzsepsis, 7 x Sepsis mit grampositivem und gramnegativem Keimnachweis).

Interpretation

Die unstimulierte NETs-Bildung bei Sepsis ist jedenfalls in vitro gegenüber der gesunden Probanden reduziert. Interessanterweise weisen jedoch neutrophile Granulozyten

septischer Patienten eine stärkere NETs-Bildung nach Kontakt mit hitzeinaktiviertem Staphylokokkus aureus auf. Ferner konnten wir eine verringerte Nukleaseaktivität bei Patienten mit bakterieller Sepsis feststellen. Dies lässt vermuten, dass NETs-Bildung sowie NETs-Degradation während einer bakteriellen Sepsis reguliert sind, um etwa eine effiziente Immobilisierung von Erregern zu ermöglichen. Laufende Studien werden die zellulären Grundlagen der differentiellen NETs-Produktion bei Probanden sowie Patienten mit Sepsis näher charakterisieren.

Literatur

1. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C: Neutrophil extracellular traps kill bacteria. Science 2004;303:1532–5
2. Hakim A, Fünhrer BG, Amann K: Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. Proc Natl Acad Sci USA 2010;107:9813–8
3. Meng W, Paunel-Görgülü A, Flohé S: Depletion of neutrophil extracellular traps in vivo results in hypersusceptibility to polymicrobial sepsis in mice. Crit Care 2012;16:R137.

Die Paracetamolmetaboliten para-Benzochinon und N-Acetyl-p-Benzochinonimin sensibilisieren und aktivieren den Capsaicin-Rezeptor TRPV1

M. Eberhardt · F. Schillers · A. Leffler

Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin, Medizinische Hochschule Hannover

Korrespondenz:

eberhardt.mirjam@mh-hannover.de

Fragestellung

Paracetamol (PCM) ist ein weitverbreitetes, frei verkäufliches Medikament, dessen molekulare Wirkmechanismen in Hinsicht auf analgetische und antipyretische Wirkung bisher wenig bekannt sind. Kürzlich konnte für die elektrophilen PCM-Metaboliten p-Benzochinon (pBQ) und N-Acetyl-p-Benzochinonimin (NAPQI) eine analgetische Wirkung durch Aktivierung spinaler TRPA1-Rezeptoren gezeigt werden, während in die Pfote injiziertes PCM unwirksam war [1]. PCM wird durch Enzyme des Cytochrom-P450-Systems verstoffwechselt, und reaktive Metaboliten wie NAPQI entstehen durch die Expression dieser Enzyme auch im Rückenmark [1]. Während die chemischen Modifikationen von Cysteinen des TRPA1-Rezeptors durch reaktive Substanzen unter anderem auch durch pBQ und NAPQI einen Mechanismus zur Aktivierung des Ionenkanals darstellen [1,2], sind viele reaktive TRPA1-Agonisten auch in der Lage, den mit TRPA1 eng verwandten TRPV1-Rezeptor zu sensibilisieren [3]. Ziel des Projektes war es zu prüfen, ob reaktive PCM-Metaboliten neben TRPA1 auch TRPV1 sensibilisieren oder aktivieren können.

Methodik

Für die Experimente wurde eine induzierbare, TRPV1-exprimierende HEK293-Zelllinie verwendet. Mittels der „patch clamp“-Technik (voltage clamp) wurden eine direkte Akti-

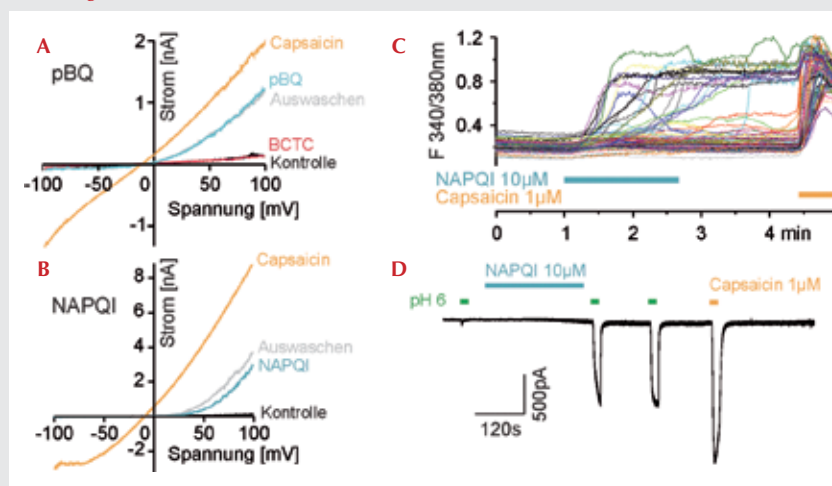
vierung von TRPV1 durch pBQ und NAPQI untersucht und sensibilisierende Effekte durch Steigerung von Rampenströmen (-100 - $+100 \text{ mV}$, 500 ms) nachgewiesen. In Ergänzung wurden Calcium-Imaging-Experimente an FURA2-AM-beladenen, TRPV1-exprimierenden HEK293-Zellen durchgeführt. Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben. Die statistische Analyse erfolgte mittels gepaarten Wilcoxon-Tests, Signifikanzniveau $p \leq 0,05$.

Ergebnisse

Sowohl pBQ ($1 \mu\text{M}$) als auch NAPQI ($10 \mu\text{M}$) sensibilisieren innerhalb von Minuten Rampenströme durch TRPV1. Diese Sensibilisierung kann durch den TRPV1-Antagonisten BCTC (100 nM) für die Dauer seiner Applikation transient blockiert werden (Abb. 1 A, B). pBQ ($3 \mu\text{M}$) und NAPQI ($10 \mu\text{M}$) induzieren selber durch TRPV1-Einwärtsströme bzw. Anstiege der intrazellulären Calciumkonzentration (Abb. 1 C). PCM hat in Konzen-

trationen bis $1.000 \mu\text{M}$ keinen Effekt auf Rampenströme in TRPV1. Sowohl pBQ als auch NAPQI sensibilisieren pH-induzierte Einwärtsströme und Hitzeantworten in TRPV1-exprimierenden Zellen. Hierbei steigern pBQ und NAPQI pH6-induzierte Einwärtsströme von $-41 \pm 13 \text{ pA}$ auf $-1608 \pm 559 \text{ pA}$ ($p=0,005$; $n=10$) bzw. von $-82 \pm 14 \text{ pA}$ auf $-603 \pm 264 \text{ pA}$ ($p<0,008$; $n=9$; Abb. 1 D) und 45°C -induzierte Einwärtsströme von $-1124 \pm 335 \text{ pA}$ auf $-4128 \pm 511 \text{ pA}$ ($p<0,028$; $n=6$) bzw. von $-860 \pm 182 \text{ pA}$ auf $-2477 \pm 407 \text{ pA}$ ($p<0,028$; $n=7$). Eine Sensibilisierung von Rampenströmen in TRPV1 durch pBQ und NAPQI lässt sich durch Dithiothreitol (DTT) (5 mM) nicht antagonisieren und legt dadurch eine irreversible chemische Modifikation von TRPV1 nahe. Eine gleichzeitige Applikation von DTT und pBQ/NAPQI verhindert jedoch eine Sensibilisierung von Rampenströmen in TRPV1 für die Dauer der Applikation im Sinne einer „Scavenger“-Wirkung des DTT.

Abbildung 1



A) pBQ- und B) NAPQI-sensibilisierte Rampenströme; C) NAPQI-induzierter Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in TRPV1-exprimierenden Zellen; D) Sensibilisierung pH-induzierter Einwärtsströme durch NAPQI.

Interpretation

Unsere Daten belegen eine Sensibilisierung und Aktivierung des TRPV1-Rezeptors durch die PCM-Metaboliten pBQ und NAPQI. Neben TRPA1-Rezeptoren, für die dies auf spinaler Ebene bereits postuliert wurde, könnte auch eine Sensibilisierung oder Aktivierung von TRPV1-Rezeptoren an Mechanismen der PCM-vermittelten Analgesie beteiligt sein. Im Sinne eines negativen Regelkreises könnte die Sensibilisierung und Aktivierung von TRPV1

Effekte von Botulinum-Toxin B auf spontane Muskelaktivität in murinen Rückenmarks-Muskelgewebe-Kulturen in vitro

V.-S. Eckle · Ch. Grasshoff · B. Antkowiak

Sektion Experimentelle Anästhesiologie, Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin, Universitätsklinikum Tübingen

Korrespondenz:

veit-simon.eckle@uni-tuebingen.de

Fragestellung

Botulinum-Toxine werden zur Behandlung von muskulären Fehlstellungen und spastischen Kontrakturen eingesetzt, indem sie peripher in das Muskelgewebe injiziert werden. Dort wird über eine Hemmung der neuromuskulären Übertragung eine schlaffe Lähmung des betreffenden Muskels induziert. Zunehmend wird Botulinum-Toxin B jedoch auch ein Nutzen in der Behandlung von neuropathischen Schmerzen zugemessen [1]. Es gibt Hinweise, dass antinozizeptive Effekte von Botulinum-Toxin B zentral im Rückenmark vermittelt werden [1]. Bislang gibt es jedoch keine Studien zu möglichen Risiken intrathekalen Anwendung von Botulinum-Toxin B. Organotypische Rückenmarks-Muskelgewebe-Kulturen sind ein geeignetes Testsystem, um Langzeit-Effekte von Medikamenten in neuronalen Netzwerken in vitro zu untersuchen. In der vorliegenden Studie wurde daher der Frage nachgegangen, wie Botulinum-Toxin B die spontane Muskelaktivität in murinen Rückenmarks-Muskelgewebe-Kulturen in vitro verändert.

Methodik

Nach Genehmigung des Regierungspräsidiums Tübingen wurde embryonales Gewebe (E 13) von C57BL/6J-Mäusen entnommen, und es wurden organotypische Rückenmarks-Muskelgewebe-Schnitte kultiviert. Nach 10-tägiger Kultivierung in vitro zeigten sich spontane Muskelbewegungen [2]. Diese Muskelaktivität wurde mithilfe einer Lichtvideomikroskopie aufgezeichnet und der Effekt

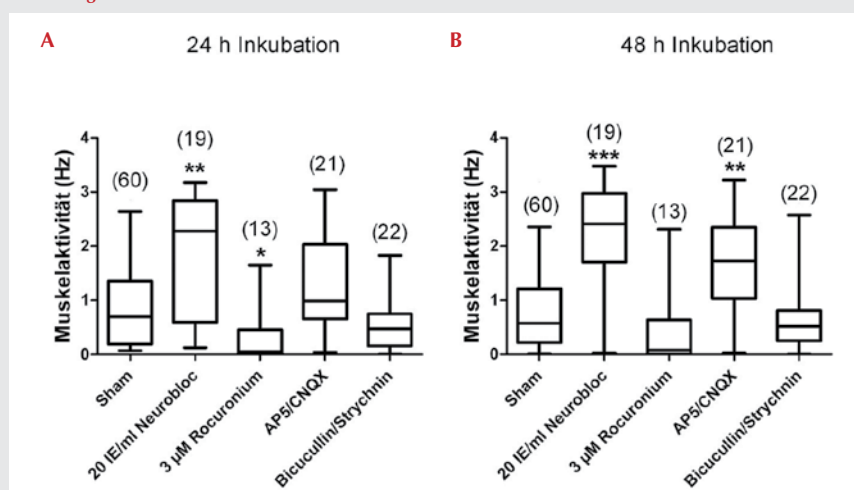
durch pBQ und NAPQI zusätzlich bezüglich der antipyretischen Wirkung des Paracetamols von Relevanz sein.

Literatur

1. Andersson DA, Gentry C, Alenmyr L, Killander D, Lewis SE, Andersson A, et. al: TRPA1 mediates spinal antinociception induced by acetaminophen and the cannabinoid $\Delta(9)$ -tetrahydrocannabinol. *Nat Commun* 2011; Nov 22;2:551

2. Ibarra Y, Blair NT: Benzoquinone reveals a cysteine-dependent desensitization mechanism of TRPA1. *Mol Pharmacol* 2013; 83(5):1120-32
3. Chuang HH, Lin S: Oxidative challenges sensitize the capsaicin receptor by covalent cysteine modification. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009 Nov 24;106(47):20097-102.

Abbildung 1



Langzeitwirkung von Botulinum-Toxin B (Neurobloc) auf spontane Muskelaktivität in organotypischen Rückenmarks-Muskelgewebe-Kulturen. Die Anwendung von AMPA-/NMDA-Rezeptorblockern (AP5/CNQX) führt ebenfalls zu einer Aktivitätszunahme, während unter Rocuronium die Aktivität abnimmt. In Klammern angegeben ist die Anzahl der durchgeführten Experimente.

der Testsubstanzen nach 24 und 48 Stunden gemessen. Die Daten wurden auf Normalverteilung getestet, und es wurde der Kruskal-Wallis-Test mit einer Dunn's Post-hoc-Analyse angewendet. Ein signifikanter Unterschied wurde als $p < 0.05$ definiert.

Ergebnisse

Es wurden 135 unabhängige Versuche durchgeführt. Botulinum-Toxin B (20 IE/ml Neurobloc®) führte zu einer signifikanten Muskelaktivitätszunahme (Abb. 1 A, B), während unter der Anwendung des Muskelrelaxanz Rocuroniumbromid (3 µM) die Aktivität abnahm (Abb. 1 A). Interessanterweise stieg die Muskelaktivität unter der Behandlung von AMPA- und NMDA-Rezeptorblockern (20 µM AP5 und 15 µM CNQX) nach 48 Stunden ebenfalls signifikant an (Abb. 1 B), während die Hemmung von inhibitorischen Neurotransmittern mittels Bicucullin (100 µM) und Strychnin (1 µM) keinen Einfluss auf die spontane Muskelaktivität hatte.

Interpretation

Aufgrund der induzierten Steigerung der Muskelaktivität durch Botulinum-Toxin B sowie durch AMPA-/NMDA-Rezeptorblocker stellen wir die Hypothese auf, dass Botulinum-Toxin B vor allem die glutamaterge Übertragung hemmt, während die neuromuskulären und inhibitorischen Synapsen unbeeinflusst bleiben. Interessanterweise kommt das Substrat von Botulinum-Toxin B, das Vesikel-assoziierte Protein 2, vor allem im dorsalen Horn des Rückenmarks vor [3]. Die Hemmung der glutamatergen Übertragung im dorsalen Horn könnte mechanistisch antinozizeptive Effekte von Botulinum-Toxin B erklären.

Literatur

1. Pavone F, Ueda H: *Pain* 2014;155:649-50
2. Rosato-Siri MD, Zoccolan D, Furlan F, Ballerini L: *Eur J Neurosci* 2004;20:2697-2710
3. Trimble W, Gray T, Elferink L, Wilson M, Scheller R: *J Neurosci* 1990;10:1380-7.

Die lektinartige Domäne des Thrombomodulin moduliert in vitro und in vivo die septische Kardiomyopathie der Maus

N. Hechaichi^{1,3} · B. Ndongson Dongmo^{1,2} · R.A. Claus^{1,3} · M. Bauer^{1,3} · E. Conway⁴ · G. Theilmeier⁵ · R. Bauer^{1,2} · R. Heller^{1,2} · S.N. Stehr^{1,6}

- 1 Center for Sepsis Control and Care, Jena
- 2 Center for Molecular Biomedicine, Jena,
- 3 Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin, Universitätsklinikum Jena
- 4 UBC Centre for Blood Research, Vancouver
- 5 European Medical School Oldenburg
- 6 Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck

Korrespondenz:

Nadine.Hechaichi@med.uni-jena.de

Fragestellung

Das endotheliale Protein Thrombomodulin besitzt sowohl anti-koagulatorische als auch anti-inflammatorische Effekte [1]. Letztere sind bedingt durch eine Interaktion der lektinartigen Domäne des Thrombomodulin (TM-LED) mit dem Alarmin HMGB1, welche in

der Folge das nachgeschaltete pro-inflammatorisch wirkende Signaling von HMGB1 unterbindet [2]. Wir untersuchten in vitro und in vivo, ob die TM-LED durch Modulation der HMGB1-Verfügbarkeit einen Effekt auf die Ausprägung der septischen Kardiomyopathie der Maus hat.

Methodik

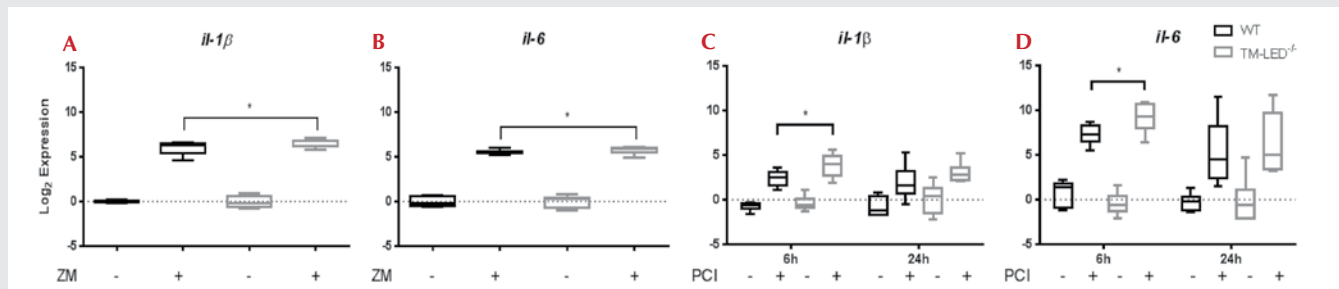
Nach behördlicher Genehmigung wurden zunächst In-vitro-Stimulationsversuche an neonatalen Kardiomyozyten von Wildtyp- und TM-LED^{-/-}-Tieren durchgeführt. Nach Stimulation mit einem Zytokinmix (Konzentrationen in ng/ml: TNFα 50, IL-6 50, IL-1β 10, INFγ 10, LPS 100) erfolgten RT-PCR-Messungen inflammatorischer Gene. Eine Überlebenszeitanalyse und intermittierende Klassifizierung der Krankheitsausprägung wurde bei Wildtyp- und TM-LED^{-/-}-Mäusen nach Sepsisinduktion durch intraperitoneale Injektion einer mikrobiologisch validierten, humanen Stuhlsuspension (PCI-Modell) durchgeführt. Die Herzfunktion der Mäuse wurde mittels Konduktanz-Katheter 12 Stunden nach PCI-Induktion bei Wildtyp- und TM-LED^{-/-}-Mäusen evaluiert. Myokardproben wurden mit RT-PCR analysiert und Plasmaproteinspiegel für Zytokine, HMGB1 und Troponin mittels ELISA

bestimmt. Die statistische Überprüfung wurde mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Test, einem α-Fehler von 0,05 und Bonferroni-Korrektur, bzw. Log-rank (Mantel-Cox) für die Überlebensanalyse durchgeführt.

Ergebnisse

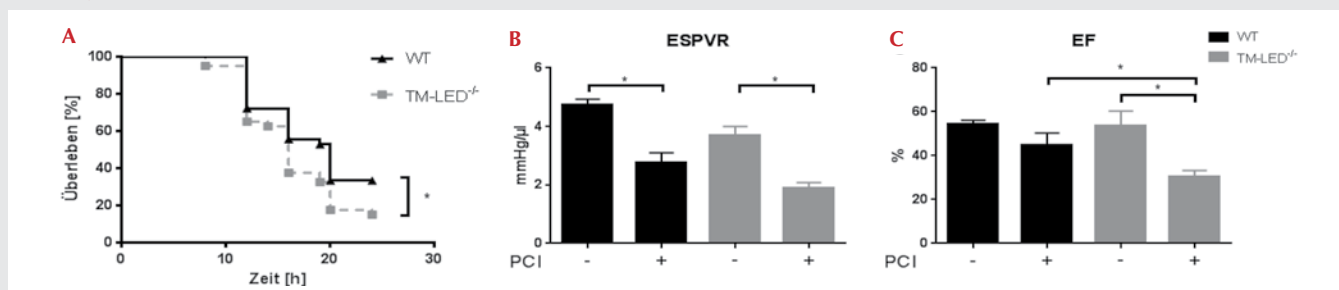
In vitro zeigte sich nach Stimulation eine signifikant erhöhte mRNA-Expression von il-1β in TM-LED^{-/-} gegenüber Wildtyp-Kardiomyozyten (Abb. 1 A, B). Die myokardiale Expression von il-1β, il-6 und mcp-1 war in vivo nach sechs Stunden bei den TM-LED^{-/-}-Mäusen gegenüber den Wildtypen signifikant erhöht (Abb. 1 C, D). Das Überleben nach PCI war bei den TM-LED^{-/-}-Mäusen (n=40) signifikant von 33 auf 15% reduziert (Abb. 2 A). Zudem zeigte sich ein früher einsetzender und stärker ausgeprägter Krankheitsverlauf bei den TM-LED^{-/-}-Mäusen. Die Parameter der Herzfunktion zeigen eine Einschränkung der myokardialen Funktion nach PCI (Abb. 2 B, C). Weiterhin zeigte sich in vivo sowohl für die plasmatischen Zytokinspiegel als auch für die Plasmaproteinlevel von kardialem Troponin und HMGB1 eine signifikante Erhöhung bei den TM-LED^{-/-}-Mäusen (Abb. 3 A-C).

Abbildung 1



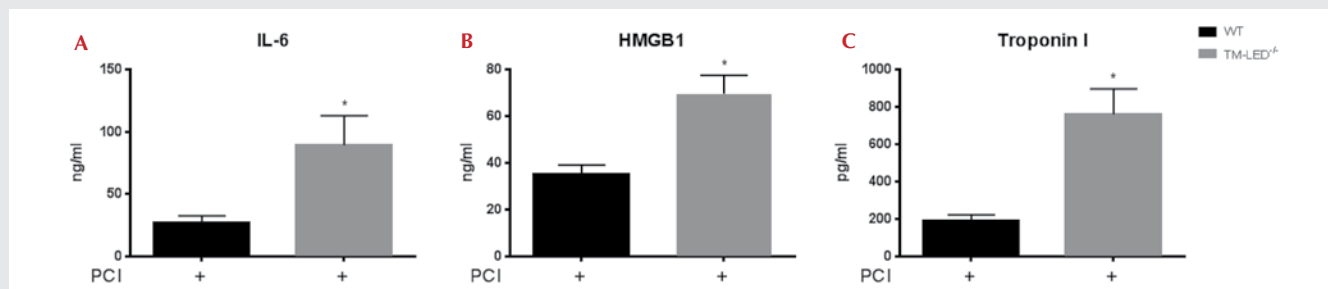
Log2-transformierte relative mRNA-Expression von il-1β und il-6 in Wildtyp (WT)- und TM-LED^{-/-}-Tieren: **A/B** in vitro (n=8-20) nach Stimulation mit Zytokinmix (ZM); **C/D** in vivo (n=6-12) nach 6 und 24 h PCI; p<0,05. [Box mit Median, Whiskers von Minimum zu Maximum].

Abbildung 2



A Überlebenskurve von Wildtyp- und TM-LED^{-/-}-Tieren nach PCI (2 µl Faeces/g KG). **B** Herzfunktion 12 h nach PCI (n=4-7): Kontraktilität (ESPVR) und **C** Hämodynamik (EF%); p<0,05. [Mittelwert ± SEM].

Abbildung 3



Plasmaproteinlevel bei Wildtyp- und TM-LED^{-/-}-Tieren nach 6 Stunden PCI.

A Interleukin-6, B High-mobility Group Box-1, C kardiales Troponin I; p<0,05. [Mittelwert ± SEM].

Interpretation

TM-LED beeinflusst sowohl in vitro als auch in vivo die Inflamationsreaktion und damit den Krankheitsverlauf positiv. Bezüglich der septischen Kardiomyopathie zeigten sich signifikant erniedrigte Werte von inflammatorischen Proteinen und Troponin als Herzschädigungsmarker bei den Wildtyp-Mäusen.

Fibulin-6 moduliert die TGF- β -vermittelte Differenzierung von kardialen Mausfibroblasten im Rahmen der myokardialen Wundheilung

Ch. Herzog · L. Hasselbach · A. Chowdhury · F. Echtermeier · G. Theilmeier

Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin, Medizinische Hochschule Hannover

Korrespondenz:

herzog.christine@mh-hannover.de

Fragestellung

In der perioperativen Medizin spielen Herz-Kreislauf-Erkrankungen als Komorbiditäten eine wichtige Rolle, weil sie Komplikationen wie Herzinfarkte nach sich ziehen können. Wichtige Weichen werden bereits in der Frühphase der myokardialen Wundheilung gestellt. Präventions- oder Therapieoptionen sind besonders für diese Phase nicht verfügbar. Die Beschreibung neuer Kandidatenmoleküle und -signalwege, die sich als Therapieziele eignen, ist daher dringend notwendig. Kürzlich konnten wir zeigen, dass Fibulin-6 nach Myokardinfarkt bei Maus und Mensch differentiell reguliert wird und eine verstärkte Expression in der Infarkt-Remote-Zone, ein Bereich mit besonders hoher mechanischer Beanspruchung, aufweist [1]. Im Verlauf des myokardialen Remodelings finden eine ganze Reihe von Auf- und Umbauprozessen inner-

Zukünftig ist zu klären, über welche Rezeptoren diese Interaktion vermittelt wird und ob deren Blockade bzw. die Applikation von TM-LED mit einem positiven Effekt bezüglich des Überlebens einhergeht, insbesondere bei septischen Patienten.

halb der extrazellulären Matrix statt, die im Wesentlichen durch kardiale Fibroblasten gesteuert werden [2]. In unseren Vorarbeiten zeigte sich, dass Fibulin-6 von kardialen Fibroblasten exprimiert wird und offensichtlich eine wichtige Rolle bei der Migration von Fibroblasten spielt. In dieser Studie untersuchen wir nun 1) ob Fibulin-6 eine funktionelle Rolle bei der TGF- β vermittelten Differenzierung von kardialen Fibroblasten in vitro ausübt und 2) über welchen Signaltransduktionsweg dies vermittelt wird.

Methodik

Primäre neonatale kardiale Mausfibroblasten und 3T3-kardiale Mausfibroblasten wurden mit nonsense (Kontrolle)- und Fibulin-6-siRNA (Fib6-KD) transfiziert, um den Effekt auf die TGF- β (10 nM; Cell Signaling, Frankfurt, Deutschland) – vermittelte Differenzierung von Fibroblasten in vitro im Kollagengel-Kontraktions-Assay, über morphometrische Quantifizierung der Stressfasern mittels Färbung mit Alexa Fluor Phalloidin 488 (A12379, Molecular Probes, Darmstadt, Deutschland) sowie über die Quantifizierung von Kollagen I und CTGF mit Realtime-PCR und densitometrischer Auswertung im Western-Blot (Kollagen I, AB765P, Millipore, Darmstadt, Deutschland; CTGF, PA1-22376, Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland) zu untersuchen. Die Translokation von SMAD3 in den Zellkern wurde nach 15-minütiger Inkubation mit TGF- β (10 nM)

Literatur

1. Conway EM: Thrombomodulin and its role in inflammation. *Semin Immunopathol* 2011; DOI 10.1007/s00281-011-0282-8
2. Herzog C, et al: Thrombomodulin's lectin-like domain reduces myocardial damage by interfering with HMGB1-mediated TLR2 signaling. *Cardiovasc Res* 2013; doi: 10.1093/cvr/cvt275.

anhand von nukleären und zytosolischen Proteinextrakten im Western-Blot und über immunhistochemische Färbung mit einem SMAD3-Antikörper (51-1500, Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) analysiert. Bei der statistischen Analyse wurde aufgrund der signifikant unterschiedlichen Varianzen bei normaler Verteilung der Daten der Mann-Whitney-U-Test gewählt. Das Signifikanzniveau wurde auf p<0.05 festgelegt.

Ergebnisse

Kontroll-Mausfibroblasten reagieren auf TGF- β -Stimulation mit einem signifikanten Anstieg der durchschnittlichen Anzahl der Stressfasern pro Zelle (30±22 vs. 83±51, n=15, p<0,0001), der jedoch bei Fib6-KD-Fibroblasten vollständig ausbleibt (30±21 vs. 30±17, n=15, p=ns). Um den Einfluss von Fibulin-6 auf die Kontraktionsfähigkeit der Fibroblasten zu untersuchen, wurde ein In-vitro-Kollagengel-Kontraktions-Assay durchgeführt, der zeigte, dass Kontroll-Fibroblasten nach TGF- β -Stimulation das Kollagengel auf 14% der Ausgangsfläche kontrahieren, während bei Fib6-KD-Fibroblasten keine Kontraktion des Gels beobachtet werden kann (n=15, p<0,001). Die TGF- β -vermittelte Differenzierung von Fibroblasten ist durch einen Anstieg der Expression von Matrixproteinen, wie z.B. Kollagen I und Wachstumsfaktoren wie CTGF gekennzeichnet. In Fib6-KD-Fibroblasten ist der Anstieg der Expression von

Kollagen I auf mRNA-Ebene um 46% ($n=8$, $p<0,05$) und auf Protein-Ebene um 52% ($n=5$, $p<0,05$) im Vergleich zur Kontrolle reduziert. Ein Anstieg der Expression von CTGF konnte in Fib6-KD-Fibroblasten ebenfalls nicht beobachtet werden. Bei der Untersuchung des Einflusses von Fibulin-6 auf den SMAD-abhängigen Signalweg zeigte sich, dass in Fib6-KD-Fibroblasten die Translokation von SMAD3 in die Zellkerne im Vergleich zu Kontroll-Zellen um 75% reduziert ist ($n=9$, $p<0,005$).

Interpretation

Fibulin-6 spielt eine wichtige Rolle bei der TGF- β -vermittelten Differenzierung von kardialen Fibroblasten, indem es Einfluss nimmt auf die Ausbildung von Stressfasern, auf die Kontraktionsfähigkeit und auf die Matrixsynthese der Zellen. Vermittelt werden diese Effekte über das Eingreifen von Fibulin-6 in den SMAD-abhängigen Signalweg. Fibulin-6 stellt somit eine potentielle therapeutische Option für die Modulation der Infarktheilung nach myokardialer Schädigung dar.

Literatur

1. Chowdhury, et. al: Cardiovasc Res 2014;103(4):509-20
2. Souders, et. al: Circ Res 2009;105(12):1164-76.

micro-RNA-124a und micro-RNA-155 beeinflussen die Differenzierung regulatorischer T-Zellen bei neuropathischem Schmerz

J. Heyn* · B. Luchting* · S. C. Azad · S. Kreth

Klinik für Anaesthesiologie, Universität München

Korrespondenz:

jens.heyne@med.uni-muenchen.de

Fragestellung

Neuere Studien weisen darauf hin, dass Störungen des Gleichgewichts zwischen pro- und anti-inflammatorisch wirkenden T-Zellpopulationen eine zentrale Rolle in der Entstehung chronischer Schmerzsyndrome spielen [1]. Für Patienten mit chronischem Rückenschmerz konnten wir beispielsweise eine signifikant erhöhte Anzahl regulatorischer T-Zellen (Treg) im peripheren Blut nachweisen [2]. Aktuelle Daten zeigen, dass Expression und Aktivität von FoxP3, dem für die Entwicklung und Funktion von Treg verantwortlichen Master-Transkriptionsfaktor, in starkem Maße durch die NAD⁺-abhängige Deacetylase Sirtuin 1 (SIRT1) bestimmt werden [3].

Das vorliegende Forschungsvorhaben befasst sich daher mit der Frage, ob auch Patienten mit neuropathischem Schmerz (NP) veränderte Treg-Häufigkeiten aufweisen und ob dies mit Veränderungen der SIRT1-Expression assoziiert ist. In einem zweiten Schritt haben wir untersucht, ob SIRT1-Veränderungen – falls vorhanden – einer Regulation durch micro-RNA (miR) unterliegen.

Methodik

Von Patienten mit NP ($n=11$, drei Patienten mit neuropathischem Gesichtsschmerz, acht Patienten mit Polyneuropathie) und gesunden Probanden ($n=9$; Blutentnahme durch Ethikkommission genehmigt, Einverständniserklärung lag vor) wurden T-Zellen über magnetische Zellseparation isoliert. Der Anteil der Tregs wurde durchflusszytometrisch ($CD4^+CD25^{\text{high}}CD127^{\text{low}}\text{Foxp3}^+$) bestimmt. Aus den isolierten

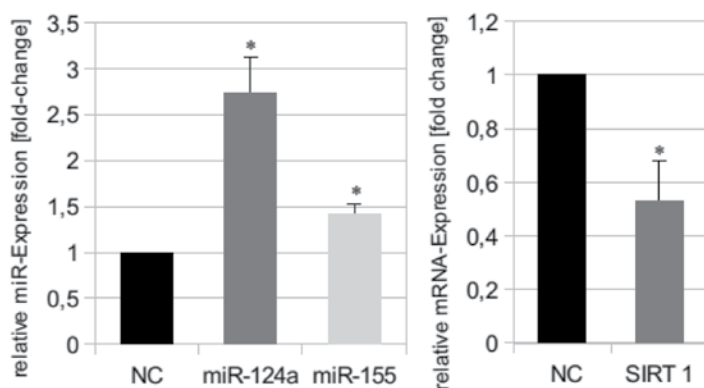
T-Zellen wurde zudem RNA gewonnen und revers transkribiert. SIRT1- und miR-Expressionsraten wurden mittels „real-time“-PCR bestimmt. Mittels bioinformatischer Methoden (Target Scan) wurde der 3'-UTR von SIRT1 auf potentielle miR-Bindungsstellen hin untersucht. Zur experimentellen Validierung der vorhergesagten miR-SIRT-Interaktion wurden $CD4^+$ -T-Zellen mit miRs-Vorläufern (pre-miRs) bzw. Kontroll-miR transfiziert (Elektroporation); nach 36 h wurde jeweils RNA präpariert, revers transkribiert und die mRNA-Expression von SIRT1 bestimmt. Die direkte miR-Zielgen-Interaktion wurde mittels Reporterassay nachgewiesen. Hierzu wurde der 3'-untranslatierte Bereich des SIRT1-Gens mittels PCR amplifiziert und in einen Luciferase-Reporter-Vektor kloniert. Das Vektorkonstrukt wurde zusammen mit den jeweiligen pre-miRs (bzw. Kontroll-miR) in HEK293-Zellen transfiziert; Reporteraktivitäten wurden luminometrisch quantifiziert. Die statistische Auswertung erfolgte mittels t- bzw. Mann-Whitney-U-Test sowie Berechnung des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman.

Ergebnisse

Die Population peripherer T-Zellen bei Patienten mit NP wies im Vergleich zu gesunden Probanden einen signifikant erhöhten Anteil an Tregs auf ($4,2\% \pm 0,9\%$ vs. $1,4\% \pm 0,4\%$, $p<0,001$). Bei NP wurde eine signifikant verminderte SIRT1-Expression gefunden ($0,53 \pm 0,16$; $p=0,004$; Abb.1). In silico wurden mögliche Bindungsstellen für miR-124a und miR-155 im 3'-UTR von SIRT1 identifiziert. Entsprechend dieser Vorhersage führte die Transfektion von humanen $CD4^+$ -Zellen mit diesen beiden pre-miRs zu einer signifikant verminderten mRNA-Expression von SIRT1 ($n=3$, pre-miR-124a: $-32\% \pm 3\%$; $p<0,05$; pre-miR-155:

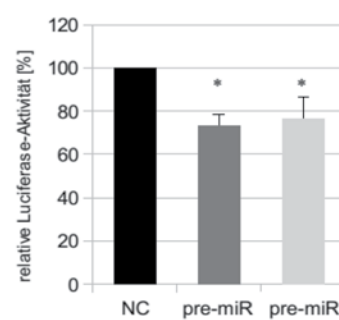
* am Abstract gleichermaßen beteiligt.

Abbildung 1



Relative Expression von miR-124a, miR-155 und SIRT1 bei NP im Vergleich zu gesunden Probanden (Mittelwerte \pm SD, * $p < 0,01$).

Abbildung 2



Relative Luciferase-Aktivität nach Co-Transfektion von pre-miR 124a, pre-miR 155 und non targeting Control (NC) mit dem SIRT1-3'UTR-Vektorkonstrukt (Mittelwerte \pm SD, * $p < 0,01$).

-27% \pm 3%; $p < 0,05$). Eine direkte Regulation der Expression von SIRT1 durch miR-124a und miR-155 konnte mittels Luciferase-Assay nachgewiesen werden ($n=6$; Reduktion Luciferase pre-miR-124a: -27% \pm 5%; pre-miR-155: -24% \pm 9%; $p < 0,01$; Abb. 2).

In T-Zellen von Patienten mit NP wurde eine 2,8-fach erhöhte Expression von miR-124a und eine 1,4-fach erhöhte miR-155 Expression gefunden (jeweils $p < 0,01$; Abb. 1), wobei die Expression von SIRT1 und die der beiden miRs signifikant negativ miteinander

korrelierten (miR-124a: $r = -0,75$; $p < 0,001$; miR-155: $r = -0,6$; $p = 0,006$).

Interpretation

Eine erhöhte Expression von miR-124a und miR-155 führt bei NP über eine Hemmung von SIRT1 zur gesteigerten Ausdifferenzierung von immunsuppressiven Tregs. Dies könnte ein wichtiger kompensatorischer Regulationsmechanismus zur Kontrolle der inflammatorischen Komponente bei NP und damit zur Reduktion des Schmerzes sein.

Literatur

1. Grace PM, et al: Pathological pain and the neuroimmune interface. *Nat Rev Immunol* 2014 Apr;14(4):217-31
2. Luchting, et al: Disrupted TH17/Treg balance in patients with chronic low back pain. *PLoS One* 2014;9:e104883
3. Akimova T, et al: Targeting sirtuin-1 alleviates experimental autoimmune colitis by induction of Foxp3⁺ T-regulatory cells. *Mucosal Immunol* 2014;7:1209-20.

Endotheliale Hyperpermeabilität nach extrakorporaler Zirkulation: Rolle der Angiotensin-2/-1-Balance

T. Hilbert¹ · D. Dürr² · M. Hamiko² · S. Frede¹ · G. Baumgarten¹ · A. Hoeft¹ · M. Velten¹

1 Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin,

2 Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie, Universitätsklinik Bonn

Korrespondenz: thilbert@uni-bonn.de

Fragestellung

Kardiochirurgische Bypass-Operationen erfolgen regelhaft unter Verwendung extrakorporaler Zirkulation (EKZ) mittels Herz-Lungen-Maschine (HLM). Diese kann eine systemische Reaktion des Körpers, das SIRS, mit Ausbildung einer endothelialen Barriere-Störung provozieren. Die Ausprägung des SIRS mit Hypovolämie, Gewebsödem und Organdysfunktion ist hierbei eine nachgewiesene Determinante der postoperativen Morbidität [1]. Angiotensine sind bedeutende vaskuläre

Wachstumsfaktoren. Konstitutiv sezerniertes Angiotensin-(ANG-) 1 verhindert Hyperpermeabilität, dagegen induziert ANG-2 als funktioneller Gegenspieler die Destruktion der endothelialen Barriere [2]. Letzteres wurde als serologisches Korrelat einer vaskulären Leckage u.a. im akuten Lungenversagen identifiziert, und ein erhöhter ANG-2/-1-Quotient korreliert eng mit der Mortalität [3]. In der vorliegenden Arbeit erfassten wir im Rahmen von Bypass-OPs unter EKZ den klinischen Verlauf sowie Veränderungen von ANG-1 und -2 und deren Rezeptor TIE2 im Blut, außerdem wurden biologische Effekte einer veränderten ANG-1/-2-Aktivität untersucht.

Methodik

Nach Ethikvotum und Einwilligung wurde Patienten ($n=28$) im Rahmen isolierter Bypass-OPs präoperativ sowie 1, 6 und 24 Stunden nach HLM Blut abgenommen und das Serum mittels ELISA untersucht. Pulmonale mikrovaskuläre Endothelzellen (MVEC) wurden in einem Zwei-Kammer-System auf permeablen

Membranen kultiviert. Bei Konfluenz erfolgte die Präinkubation mit gefiltertem, verdünntem Patientenserum (7.5%, 30 Min.) der Zeitpunkte „präop.“ sowie 24 Stunden nach HLM. Nach 15 Min. wurde die Permeabilität durch Zugabe von Thrombin (1 IU/ml) provoziert und anschließend über eine Stunde die Permeation von FITC-Dextran (70 kDa) gemessen. Zusätzlich wurden MVEC in 96-well-Platten mit rekombinantem IL-6 bzw. mit Patientenserum (5%) der Zeitpunkte „präop.“ sowie 1 Stunde nach HLM in An- oder Abwesenheit eines Anti-human-IL-6-Antikörpers über 24 Stunden inkubiert. Nach Stimulation der ANG-2-Sekretion durch Thrombin wurde der Zellüberstand mittels ELISA untersucht. Statistik: Student's t-test, MW \pm SD bzw. SEM, $p < 0,05$ = stat. signifikant.

Ergebnisse

EKZ führte bereits nach einer Stunde zu einem signifikanten und über 24 Stunden anhaltenden Abfall von ANG-1 (12 vs. 14.7 ng/ml präop., $p=0.003$) bzw. Anstieg von ANG-2 im Serum (2.5 vs. 0.6 ng/ml präop.,

$p < 0.0001$), was einer mittleren Verschiebung des ANG-2/-1-Quotienten um den Faktor 5.9 nach 24 Stunden entspricht ($p < 0.0001$). Das ANG-2/-1-Verhältnis eine Stunde nach EKZ war positiv mit der Flüssigkeitsbilanz und der postoperativen Serumlaktatkonzentration und negativ mit dem Oxygenierungsindex korreliert ($r = 0.7$ bzw. $r = -0.6$, $p < 0.05$). Die Permeabilität endothelialer Monolayer wurde durch Präinkubation mit Seren, bei welchen 24 Stunden nach EKZ ein deutlicher Anstieg des ANG-2/-1-Verhältnisses messbar war (Faktor 18), signifikant gesteigert, was für Seren mit gering gestiegenem ANG-2/-1-Quotienten (Faktor 6) nicht nachweisbar war ($p < 0.05$, $n = 8-10$). Durch EKZ kam es früh zu einer inflammatorischen Reaktion in Form eines Anstiegs der IL-6-Aktivität im Serum ($0.3 \text{ ,1 hr' vs. } 0.5 \text{ ,6 hrs' vs. } 0.003 \text{ ng/ml ,präop.'}$, $p < 0.0001$). Die IL-6-Aktivität eine Stunde nach EKZ korrelierte signifikant mit dem späteren Verlauf von ANG-2 (24 Stunden postop., $r = 0.7$, $p = 0.0001$). Inkubation

von MVEC mit stark IL-6-haltigen ,1 hr'-Seren (MW: 739 pg/ml) steigerte im Gegensatz zu Proben mit geringerer IL-6-Aktivität (MW: 78 pg/ml) deren ANG-2-Sekretion signifikant im Vergleich zu ,präop.'-Kontrollserum (2.9 vs. 2.4fache Steigerung der basalen ANG-2-Sekretion ,präop.', $p < 0.05$, $n = 6-9$). Dieser Effekt ließ sich allerdings nicht durch einen Anti-IL-6-AK blockieren. Die Inkubation von MVEC mit rek. IL-6 hatte keinen Einfluss auf die ANG-2-Sekretion.

Interpretation

EKZ induziert eine im Serum messbare signifikante Verschiebung des für die endotheliale Integrität bedeutsamen ANG-2/-1-Verhältnisses zu Gunsten des barriere destruktiven ANG-2. Dies ist mit klinischen Parametern der Oxygenierung und Organperfusion korreliert. Im Ex-vivo-Permeabilitätsassay verursacht die Verschiebung des ANG-2/-1-Quotienten eine verstärkte Barrierestörung. EKZ geht ferner mit einer gesteigerten IL-6-Se-

rumaktivität einher. Proben mit hohem proinflammatorischem Potential steigern ex vivo die ANG-2-Sekretion durch Endothelzellen (EC), jedoch scheint IL-6 selbst nur Ausdruck der inflammatorischen Reaktion und nicht der die EC beeinflussende Faktor zu sein. Dieser ist zu identifizieren, um mit einer gezielten Prävention einer gestörten ANG-2/-1-Balance entgegenwirken zu können.

Literatur

1. Paparella, et al: Cardiopulmonary bypass induced inflammation: pathophysiology and treatment. An update. Eur J Cardiothorac Surg 2002;21:232-44
2. Scharpfenecker, et al: The Tie-2 ligand angiopoietin-2 destabilizes quiescent endothelium through an internal autocrine loop mechanism. J Cell Sci 2005;118:771-80
3. Luz Fiusa, et al: A high angiopoietin-2/angiopoietin-1 ratio is associated with a high risk of septic shock in patients with febrile neutropenia. Crit Care Lond Engl 2013;17(4):R169.

Tbet⁺-NK-Zellen tragen durch Rekrutierung neutrophiler Granulozyten zur Pathogenese des LPS-induzierten, akuten Lungenschadens der Maus bei

S. Högl^{1,2} · H. K. Eltzschig¹ · B. Zwißler² · E.N. McNamee¹

¹ Department of Anesthesiology, University of Colorado, Aurora/USA

² Klinik für Anaesthesiologie, Ludwig Maximilians-Universität München

Korrespondenz:

Sandra.Hoegl@med.uni-muenchen.de

Fragestellung

Der Einstrom myeloider Zellen, insbesondere neutrophiler Granulozyten in die Lunge trägt entscheidend zur initialen Entstehung eines akuten Lungenversagens (ARDS) bei. Welche Mechanismen an der Kontrolle der pulmonalen Entzündungsreaktion und zell-spezifischen Zytokinantwort beteiligt sind, ist demnach von hoher therapeutischer Relevanz. Bei chronischen Entzündungsreaktionen wie dem allergischen Asthma, scheint der Transkriptionsfaktor T-bet, der an der Ausreifung von T-Zellen, aber auch von natürlichen Killer-(NK)-Zellen beteiligt ist, eine wichtige Rolle zu spielen [1,2]. Seine pathophysiologische Rolle beim ARDS ist hingegen unbekannt und wurde daher am LPS-induzierten Lungenschaden der Maus untersucht.

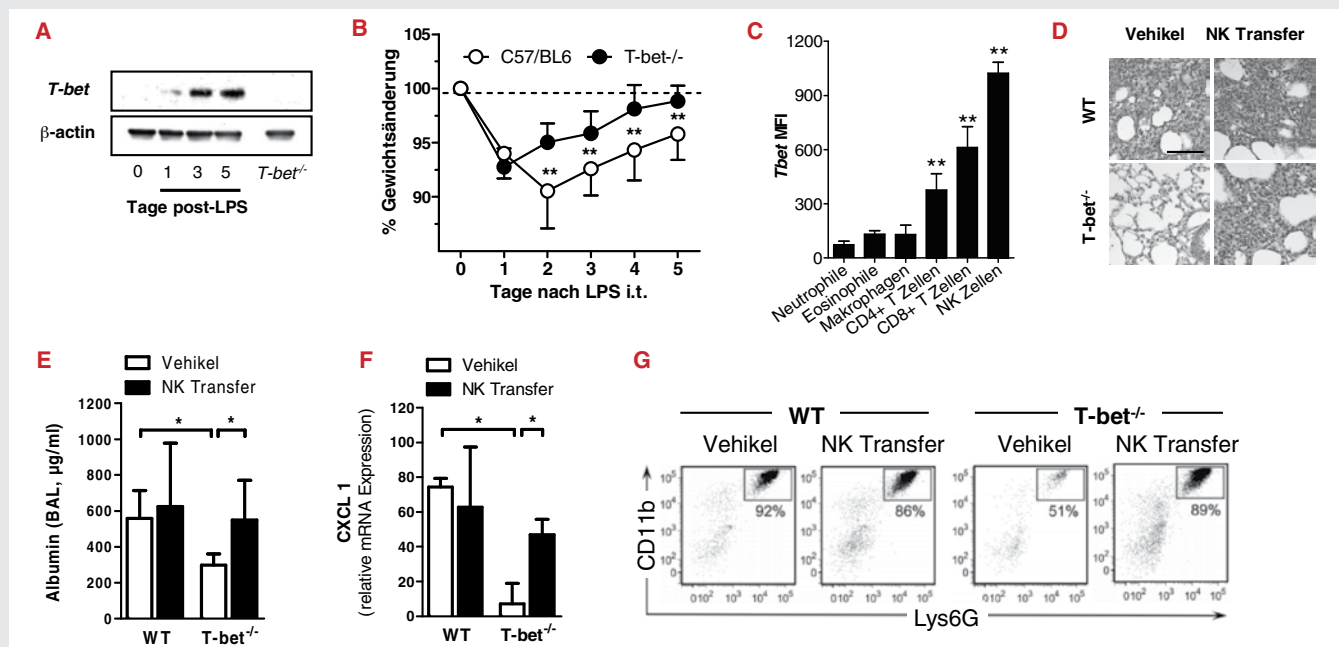
Methodik

Alle Tierversuche wurden durch die zuständigen Behörden genehmigt. Die Mäuse erhielten LPS (5 mg/kg) intratracheal [3]; nach den angegebenen Zeitpunkten wurden die Tiere mit einer Überdosis Pentobarbital euthanasiert. Folgende Mauslinien wurden verwendet (n=5-8): WT (C57/BL6), Tbet^{-/-} und CD45.1. Für die Experimente zum adoptiven Zelltransfer extrahierten wir NK-Zellen aus der Milz von CD45.1-WT-Mäusen mittels „magnetic beads“, eine Stunde vor LPS-Gabe erfolgte die Injektion von 1,5x10⁶ CD49b (DX5)+ NK-Zellen (oder Vehikel) bei WT- oder Tbet^{-/-}-Mäusen. Änderungen auf Proteinebene wurden mittels Westernblot und ELISA, transkriptionelle Veränderungen mittels RT-PCR bestimmt. Als Anhalt für die Schwere einer Lungenschädigung galt der Verlust an Körpergewicht der Mäuse [3]; zur Quantifizierung wurde der histologische Schaden im Lungengewebe mit einem semiquantitativen Score graduiert sowie der Albumingehalt in der BAL bestimmt. Die Tbet positiven Zellfraktionen sowie die Neutrophilenfraktion in der Lunge wiesen wir mittels Durchflusszytometrie nach. Zur statistischen Auswertung verwendeten wir die zweifaktorielle Varianzanalyse (Bonferroni-Post-hoc-Test) bzw. t-Tests, *p<0,05, Ergebnisse als Mittelwert [SD].

Ergebnisse

Die intratracheale LPS-Applikation führte zu einer Induktion von Tbet im Lungengewebe (A). Der genetische Tbet Knockout scheint in unserem ARDS-Modell protektiv, Tbet^{-/-}-Mäuse waren weniger kompromittiert und verloren weniger Körpergewicht im Vergleich zu WT-Mäusen (B). Tbet^{-/-}-Mäuse zeigten eine geringere histologische Lungenschädigung, eine geringere Konzentration proinflammatorischer Zytokine sowie einen verminderten Einstrom neutrophiler Granulozyten. Vergleicht man die relative Expression von Tbet in leukozytären Zellen im Lungengewebe am Tag 3 nach LPS-Gabe, so zeigten sich NK-Zellen als primäre Quelle (C). Um nachzuweisen, dass Tbet⁺-NK-Zellen neutrophile Granulozyten in die Lunge rekrutieren, die entscheidend an der Pathogenese des ALI beteiligt sind, injizierten wir in unserem LPS-Modell CD45.1 WT-NK-Zellen bei Tbet^{-/-}-Mäuse. Diese Tiere verhielten sich in ihrem Schädigungsmuster ähnlich zu WT-Mäusen (D, E). Die Expression des Neutrophilen-Chemotaxins CXCL1 war ebenfalls nur bei den Tbet-defizienten Mäusen ohne adoptiven NK-Zell-Transfer reduziert (F). Schließlich führte der NK-Zell-Transfer bei Tbet^{-/-} zu einem mit WT-Mäusen vergleichbaren Einstrom von Neutrophilen in die BAL, während in die Lunge nativer Tbet^{-/-}-Mäuse deutlich weniger Neutrophile einwanderten (G).

Abbildung 1



(A) Westernblot Lungenhomogenat. (B) Körpergewicht der Mäuse nach LPS i.t.. (C) Durchflusszytometrie von Tbet: Mediane Fluoreszenzintensität (MFI) in Leukozyten (BAL, Tag 3 nach LPS i.t.). Adoptiver NK-Zell-Transfer: (D) Lungenhistologie (HE, 10x). (E) Albuminkonzentration (ELISA, BAL). (F) RT-PCR gegen CXCL1 (Lungenhomogenat). (G) Durchflusszytometrie Neutrophilen-Punktwolke (BAL, Tag 1 nach LPS i.t.).

Interpretation

Zusammenfassend zeigt die Studie, dass Tbet⁺-NK-Zellen eine wichtige Rolle in der Akutphase eines ARDS spielen, indem sie an der Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in die Lunge beteiligt sind. Eine NK-Zell-Depletion könnte demnach in der frühen Phase einer nicht-infektiösen Lungenschädigung

eine protektive Wirkung auf die Entwicklung eines ARDS haben.

Literatur

1. Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH: A novel transcription factor, Tbet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 2000;100(6):655-669

Alters- und geschlechtsspezifische Unterschiede bei der Freisetzung humoraler Faktoren nach ischämischer Fernpräkonditionierung beim Menschen, in der Ratte in vitro

R. Huhn¹ · T. Meyer-Treschan¹ · I. Bauer¹ · M.W. Hollmann² · A. Heinen^{1,3}

- 1 Klinik für Anästhesiologie, Universitätsklinikum Düsseldorf
- 2 Klinik für Anästhesiologie, Universitätsklinikum Amsterdam/Niederlande
- 3 Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Korrespondenz:

Ragnar.Huhn@med.uni-duesseldorf.de

Fragestellung

Es existieren Hinweise auf geschlechtsspezifische Unterschiede hinsichtlich der kardioprotektiven Effekte von Präkonditionierungsinterventionen [1]. Unbekannt ist allerdings, ob hiervon auch die ischämische Fernpräkonditionierung (Remote Ischemic Preconditioning, RIPC) betroffen ist. Es gibt erste Hinweise, dass der infarktgrößenreduzierende Effekt der RIPC im in vivo Tiermodell einer Alterungsabhängigkeit unterliegt (eigene, nicht publizierte Beobachtung). Hierbei kommen als mögliche Ursachen zum einen Störungen bei der Signalvermittlung zwischen Präkonditionierungs- und Effektororgan (z.B. eine veränderte Freisetzung von humoralen Faktoren, welche auf dem Blutwege zum Effektororgan transportiert werden) in Frage, zum anderen könnten auch intrakardiale Veränderungen dem alterungsbedingten Verlust der Protektion zugrunde liegen. Ziel dieser Studie war es zu überprüfen, ob die Freisetzung humoraler Faktoren nach RIPC am Menschen geschlechtsspezifischen und/oder alterungs-spezifischen Veränderungen unterliegt und welche, durch humorale Faktoren vermittelte intrakardiale Signaltransduktionswege daran beteiligt sein könnten.

Methodik

Für diese Studie lagen Genehmigungen der Ethikkommission (Studie 3911) sowie des Tierschutzbeauftragten (Nr. O 27/12) der

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf vor. RIPC wurde bei freiwilligen Probanden durch Aufblasen einer Blutdruckmanschette (200 mmHg) am rechten Oberarm für drei Zyklen mit fünfminütiger Armschämie, gefolgt von jeweils fünfminütigen Reperusionsphasen, induziert. Insgesamt wurden vier Probandengruppen (je n=10 pro Gruppe) dieser Intervention unterzogen: 1) junge Männer (j/m; 23±1 Jahre), 2) junge Frauen (j/w; 23±1 Jahre), 3) alte Männer (a/m; 69±7 Jahre) und 4) alte Frauen (a/w; 67±4 Jahre). Bei allen Probanden wurde jeweils vor (Kontrolle, Con) und 5 min nach RIPC (RIPC) Blut (50 ml) am kontralateralen Arm abgenommen und das Blutplasma zur späteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Die Untersuchung der kardioprotektiven Potenz des von Probanden gewonnenen Blutplasmas wurde an männlichen Wistar-Ratten (2 bis 3 Monate alt) in vitro durchgeführt. Die Herzen wurden an einer Langendorff-Anlage mit Krebs-Henseleit-Puffer bei einem konstanten Druck von 80 mmHg perfundiert. Das Blutplasma (0,5% des Koronarflusses) wurde über zehn Minuten vor der infarktinduzierenden Ischämie appliziert. Die Herzen unterliefen eine 33-minütige Globalischämie, gefolgt von 1 h Reperfusion. Am Versuchsende wurde die Infarktgröße mittels Triphenyltetrazoliumchlorid-Färbung bestimmt (8 Gruppen, je n=10 pro Gruppe). In einer zusätzlichen Versuchsserie wurde basierend auf den Ergebnissen der Untersuchungen mit dem Blutplasma der jungen weiblichen Probanden ein möglicher Zusammenhang der Kardioprotektion mit Östrogenrezeptoren untersucht. Hierzu wurden weitere Infarktgrößenexperimente (4 Gruppen, je n=10 pro Gruppe) mit dem Östrogenrezeptorenblocker Fulvestrant (Ful, 100 nM, über 15 min vor der Ischämie) durchgeführt. Die Bestimmung der myokardialen cAMP-Spiegel sowie der PKA-, GSK3β- und Akt-Aktivität erfolgte in zusätzlichen Experimenten nach 10-minütiger Applikation von Kontroll- und RIPC-Plasma junger und alter männlicher Probanden (je n=10 pro Gruppe). Die cAMP-Spiegel wurden mit ELISA bestimmt. Als Marker der PKA-, GSK3β- und Akt-Aktivität wurde das Verhältnis von phosphoryliertem zu Gesamtprotein mittels Wes-

2. Lazarevic V, Glimcher LH: Tbet in disease. *Nat Immunol* 2011;12(7):597-606
3. Ehrentraut, H., Clambey E.T., McNamee E.N., Brodsky K.S., Ehrentraut S.F., Poth J.M., Riegel A.K., Westrich J.A., Colgan S.P., Eltzschig H.K.: CD73+ regulatory T cells contribute to adenosine-mediated resolution of acute lung injury. *FASEB J* 2013;27(6):2207-2219.

tern-Blot-Analyse bestimmt. Statistik: t-Test. Daten sind MW±SD.

Ergebnisse

RIPC-Plasma von jungen Männern reduzierte die Infarktgröße von 47±5% auf 31±10% (RIPC (j/m); P<0,05 vs. Con (j/m)). Nach Applikation von Kontrollplasma junger Frauen betrug die Infarktgröße 33±10% (Con (j/w)) und konnte durch RIPC nicht weiter reduziert werden (RIPC (j/w): 29±10%; ns vs. Con (j/w)). RIPC-Plasma von alten Männern und Frauen zeigte keine kardioprotektiven Eigenschaften (Con (a/m): 43±9%, RIPC (a/m): 46±12%; ns und Con (a/w): 43±12%, RIPC (a/w): 45±10%; ns). Der Östrogenrezeptorblocker Fulvestrant hatte keinen Effekt auf die Infarktgrößenreduktion durch Plasma junger Frauen. RIPC-Plasma junger Männer führte zu einer Steigerung der GSK3β-Phosphorylierung, verglichen mit der Kontrolle (0,56±0,36 vs. Con (j/m): 0,41±0,29; P<0,05). Nach Applikation von Plasma der alten Männer konnte dieser Effekt nicht nachgewiesen werden (RIPC (a/m): 0,45±0,26 vs. Con (a/m): 0,36±0,13; ns). Bei der Untersuchung der Akt- und PKA-Aktivität sowie der cAMP-Spiegel zeigten sich keine Unterschiede.

Interpretation

Diese Ergebnisse zeigen, dass: **1)** RIPC bei jungen Männern zur Freisetzung eines humoralen Faktors mit kardioprotektiver Wirkung führt, **2)** das RIPC-Plasma junger Männer im Herzen eine Phosphorylierung von GSK3β induziert, **3)** Plasma junger Frauen per se protektive Eigenschaften besitzt und **4)** im Plasma von alten Männern und Frauen nach RIPC kein humoraler Faktor freigesetzt wird, der eine myokardiale Protektion auslösen kann.

Literatur

1. Murphy E., Steenbergen C: Gender-based differences in mechanisms of protection in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2007;75(3):478-86.

Die Inhibition von Ninjurin-1 vermindert die systemische Entzündung bei der murinen polymikrobiellen Peritonitis

C. Jennewein · R. Sowa · A. C. Faber · M. Dildey · K. Zacharowski

Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie, Universitätsklinikum Frankfurt am Main

Korrespondenz: carla.jennewein@kgu.de

Fragestellung

Ninjurin-1 (Ninj1) ist ein Adhäsionsmolekül, dessen Expression bei Nervenschädigungen erhöht ist. Über Zell-Zell-Interaktionen trägt es zur Nervenregeneration bei. Darüber hinaus wird Ninj1 auf Endothelzellen und Leukozyten exprimiert, was zur Migration von Immunzellen führt und eine wichtige Rolle während entzündlicher Prozesse impliziert. Im Multiple-Sklerose-Mausmodell (experimentelle Autoimmun-Enzephalomyelitis) konnte gezeigt werden, dass die Inhibition von Ninj1 zur verminderten Einwanderung von Leukozyten und nachfolgend zu verbesserten klinischen Outcomemesswerten führt [1]. Zudem konnten wir zeigen, dass Ninj1 neben der Zellmigration auch die Lipopolysaccharid-vermittelte Genexpression in Endothelzellen beeinflusst und damit generell eine Rolle bei der Entzündung spielt [2]. Eine weitere Studie zeigte außerdem eine vermehrte Ninj1-Expression auf Leukozyten bei Patienten mit schwerem Trauma [3]. Daher untersuchten wir, ob Ninj1 die systemische Entzündung auch während einer Sepsis beeinflusst.

Methodik

Alle Tierversuche wurden durch das Regierungspräsidium Darmstadt (F91/67) genehmigt. Für die Induktion der polymikrobiellen Peritonitis wurde das Modell der zökalen Ligation und Punction (cecal ligation and puncture, CLP) an C57Bl/6N-Mäusen angewendet. In Kürze, die Hälfte des Zökums wurde ligiert, mit einer 20G-Nadel zweimal punktiert und etwas Darminhalt ausgedrückt. Daraufhin wurde die Darmschlinge rückverlagert und die Wunde verschlossen. Die Inhibition von Ninj1 erfolgte durch die Gabe eines Ninj1-blockierenden Peptids (Ninj126-37, 1 mg/kg/KW, i.v.), zur Kontrolle wurde ein Scrambled-Peptid verwendet (Scr). Die Tiere wurden nach 24 h terminiert und Gewebe und Blut entnommen. Die Analyse der Zytokin-Plasmakonzentrationen erfolgte mittels Multiplex-Assay, die der Aminotransferasenaktivität im Plasma mittels kolorimetrischen Assays. Die pulmonale Neutrophileninfiltration wurde immunhistologisch bestimmt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels OneWay-ANOVA, modifiziert mit Bonferroni's Post-hoc-Analyse.

Ergebnisse

Die Plasmakonzentrationen von $\text{TNF}\alpha$, IL-6 und IL-10 waren nach CLP-Operation erhöht, wobei die Inhibition von Ninj1 zu einer signifikanten Reduktion derselben führte. Als Hinweis auf einen Leberschaden wurden die Plasma-Konzentrationen der Transaminasen herangezogen, welche in der Ninj1-inhibierten Gruppe im Vergleich zur CLP-Scr-Gruppe signifikant verringert waren (Abb. 1). Durch immunhistologische Färbung konnte eine vermehrte Einwanderung von Neutrophilen in die Lunge nachgewiesen werden, die durch Inhibition von Ninj1 vermindert war.

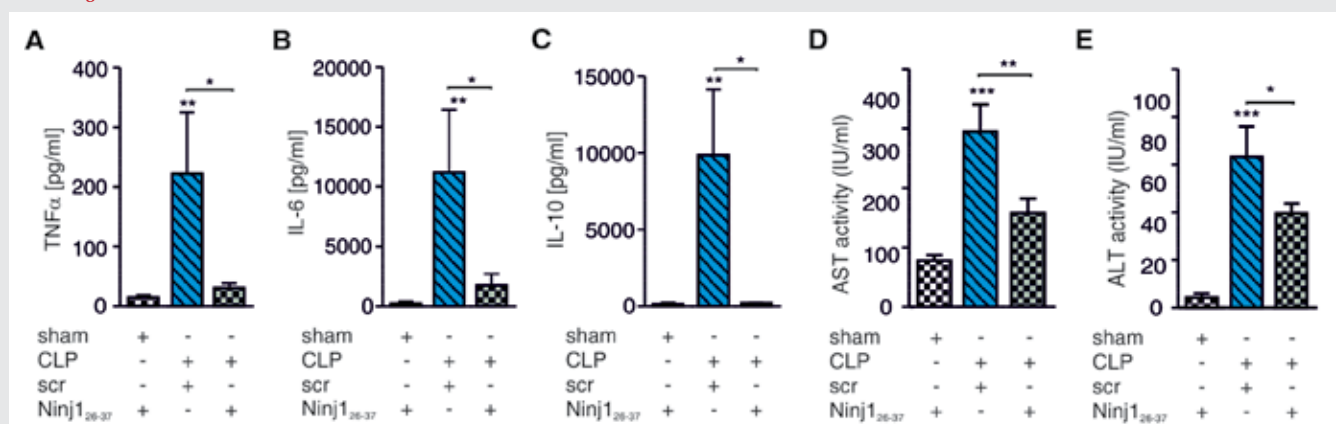
Interpretation

Ninjurin-1 trägt sowohl zur systemischen Entzündung als auch zu Sepsis-assoziierten Organschädigungen bei und könnte damit einen neuen Therapieansatz zur Behandlung von Entzündungskrankheiten liefern.

Literatur

1. Ifergan I, Kebir H, Terouz S, Alvarez JI, Lecuyer MA, Gendron S, et al: Role of ninjurin-1 in the migration of myeloid cells to central nervous system inflammatory lesions. *Ann Neurol* 2011; 70: 751-63
2. Jennewein C, Zacharowski K: Ninjurin 1 contributes to TLR-induced inflammation in endothelial cells [abstract]. *Crit Care* 2012;16:P44
3. Xiao W, Mindrinos MN, Seok J, Cuschieri J, Cuenca AG, Gao H, et al: A genomic storm in critically injured humans. *J Exp Med* 2011;208:2581-90.

Abbildung 1



C57Bl/6N-Mäuse wurden der CLP (cecal ligation and puncture)-Operation unterzogen und mit Ninj126-37 bzw. Scr-Peptid behandelt. (A-C) Die Plasmakonzentrationen von $\text{TNF}\alpha$ (A), IL-6 (B) und IL-10 (C) wurden mittels Luminex-Multiplex-Assay bestimmt. (D, E) Die Plasma-Konzentrationen der Aspartat-Aminotransferase (AST) und der Alanin-Aminotransferase (ALT) wurden mittels kolorimetrischen Assays bestimmt. mean \pm SEM, n \geq 13.

Persistenter kortikaler Informationsfluss im EEG während tiefer Sevoflurannarkose bis Burst-Suppression

D. Jordan¹ · R. Ilg² · A. Ranft¹ · P. Kohl^{1,2} · E. F. Kochs¹

1 Klinik für Anaesthesiologie

2 Neurologische Klinik

Klinikum rechts der Isar,
Technische Universität München

Korrespondenz: d.jordan@lrz.tum.de

Fragestellung

Medikamentös induzierter Bewusstseinsverlust kann durch Wirkungen auf der Rezeptorebene alleine nicht hinreichend geklärt werden, da Veränderungen in der neuronalen Netzwerkfunktion auf der systemischen Ebene des Gehirns hierüber nicht erfassbar sind. Neuere funktionelle bildgebende und elektrophysiologische (EEG) Untersuchungen kortikaler Netzwerke zeigen eine abnehmende frontoparietale Rückkopplung in höheren kortikalen Netzwerken bei medikamentös induzierter Bewusstlosigkeit [1,2]. In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, ob sich die beobachtete frontoparietale Diskonnektion auch auf tiefe Narkosestadien übertragen lässt. Dazu wurde mit Hilfe eines informations-theoretischen Ansatzes der kortikale Informationsfluss im EEG während Wachheit und tiefer Sevoflurannarkose, speziell während Episoden mit Burst-Suppression EEG, untersucht.

Methodik

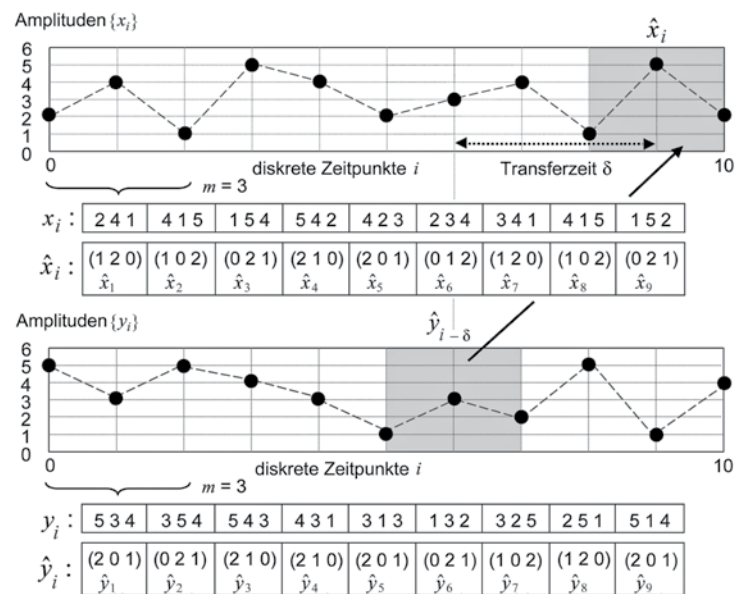
Nach Zustimmung der Ethikkommission nahmen 22 gesunde Männer (18-30 Jahre) an der Studie teil. Während einer Phase entspannter Wachheit (AW) wurde das EEG (63 Kanäle) aufgezeichnet und anschließend mit Hilfe einer Larynxmaske 3vol% Sevoflurankonzentration sowie der EEG-Endpunkt Burst-Suppression mittels Sevoflurantitrierung angesteuert und während der EEG-Messung aufrechterhalten. Die symbolische Transferentropie (STEn) stellt ein Maß für die gerichtete nicht-lineare Interaktion zwischen zwei EEG-Ableitungen x und y dar [3] und wird hier zur Beurteilung der bevorzugten Richtung des kortikalen Informationsflusses verwendet (Abb. 1).

Die Differenz $STEn = STEn_{x \rightarrow y} - STEn_{y \rightarrow x}$ bestimmt die bevorzugte Richtung einer Interaktion zwischen den Ableitungen x und y ($STEn > 0$: x sendet Informationen nach y , $STEn < 0$: x empfängt Informationen von y). Die Berechnung der STEn erfolgte mit $m=5$, $\delta=7-12$ (35-60 ms) und 0,5-70 Hz Bandbreite des EEG. Sevofluran-induzierte Änderungen der STEn wurden durch die AUC und Bootstrap Konfidenzintervalle (CI) beurteilt ($p < 0,05$ korrigiert).

Ergebnisse

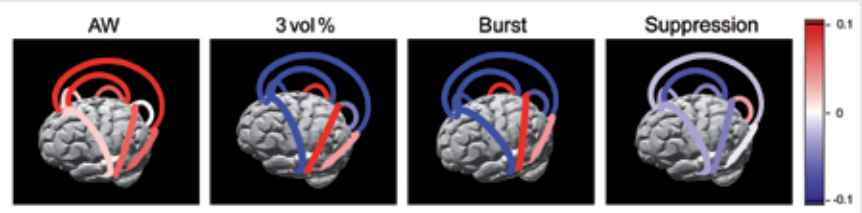
Die STEn zeigte eine dominierende Rückkopplung (Feedback-Interaktion) zwischen frontal-posterioren EEG-Ableitungen im Zu-

Abbildung 1



Beispiel zur Berechnung der STEn $_{x \rightarrow y}$: Aus den Amplitudenwerten der Ableitungen x und y werden kurze Sequenzen x_i und y_i der Länge m (im Beispiel $m = 3$) und anschließend deren Rangordnungen \hat{x}_i und \hat{y}_i bestimmt. Durch STEn $_{x \rightarrow y}$ wird die Wahrscheinlichkeit, dass sich Rangordnungen \hat{x}_i aus vergangenen \hat{y}_i bezüglich einer Transferzeit δ (im Beispiel $\delta = 3$) voraussagen lassen, quantifiziert.

Abbildung 2



stand AW und eine vorwiegende posterior-frontale Interaktion (Feedforward) in den Zuständen 3vol%, Burst-Suppression (Abb. 2). Im frontal-parietalen EEG wurden signifikante Änderungen von AW zu 3vol% (AUC: 0,93; CI: 0,76-1,00), AW zu Burst (0,89; 0,68-1,00) und AW zu Suppression (0,86; 0,63-0,99) beobachtet.

Interpretation

Vorliegende Ergebnisse bestätigen Untersuchungen systemischer Netzwerke während Bewusstseinsverlust und zeigen auch in tiefer Narkose eine Abnahme des frontoparietalen Feedbacks bei erhaltener Feedforward-Interaktion als mögliches zentrales Korrelat von (medikamentös-induzierter) Bewusstlosigkeit. Überraschenderweise ließ sich selbst in Perioden mit Suppression-EEG ein Informationsfluss von niedrigeren sensorischen zu höheren frontalen Arealen beobachten. Dies weist auf

eine erhaltene systemische Gehirnaktivität hin, obschon Suppression-EEG mit einem Zustand neuronaler Deaktivierung assoziiert wurde [4].

Literatur

1. Jordan D, Ilg R, Riedl V, Schorer A, Grimberg S, Neufang S, et al: Simultaneous electroencephalographic and functional magnetic resonance imaging indicate impaired cortical top-down processing in association with anesthetic-induced unconsciousness. *Anesthesiology* 2013;119:1031-1042
2. Lee U, Ku S, Noh G, Baek S, Choi B, Mashour GA: Disruption of frontal-parietal communication by ketamine, propofol, and sevoflurane. *Anesthesiology* 2013;118:1264-1275
3. Staniek M, Lehnertz K: Symbolic transfer entropy. *Phys Rev Lett* 2008;100:158101
4. Lewis LD, Ching S, Weiner VS, Peterfreund RA, Eskandar EN, Cash SS, et al: Local cortical dynamics of burst suppression in the anesthetized brain. *Brain* 2013;136:2727-2737.

Höhere Tidalvolumen-Variabilität verhindert Derekrutierung und reduziert die Lungenschädigung im experimentellen Lungenversagen der Ratte

Th. Kiss^{1,2} · R. Huhle¹ · P. L. Silva² · Th. Koch¹ · P. R. M. Rocco² · M. Gama de Abreu¹

1 Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie, Universitätsklinikum Dresden, TU Dresden

2 Institut für Biophysik, Bundesuniversität von Rio de Janeiro/Brasilien

Korrespondenz:

thomas.kiss@uniklinikum-dresden.de

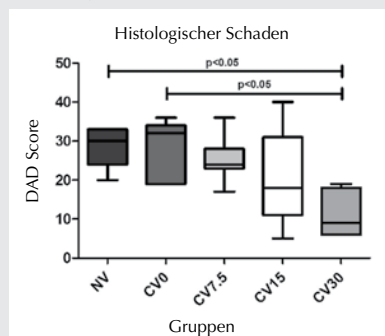
Fragestellung

Frühere Studien zum experimentellen Lungenversagen zeigten, dass eine Lungenrekrutierung mittels variabler Beatmung effektiver und anhaltender ist als konventionelle Rekrutierungsmanöver [1,2]. Weiterhin wurde für die variable Beatmung im Lungenversagen gezeigt, dass eine Variabilität des Tidalvolumens von circa 30% (Variationskoeffizient, CV) benötigt wird, um eine geschädigte Lunge effektiv zu rekrutieren. In der aktuellen Arbeit untersuchten wir, welcher Tidalvolumen-Variabilität es bedarf, um die Derekrutierung einer bereits rekrutierten Lunge zu vermindern. Wir stellten die Hypothese auf, dass nach einer Rekrutierung der Lunge durch variable Beatmung die Variabilität des Tidalvolumens reduziert werden kann, ohne eine Derekrutierung auszulösen.

Methodik

Vierundzwanzig Stunden vor Beginn der mechanischen Beatmung wurde bei 28 Wistar-Ratten ein experimentelles Lungenversagen mittels intratrachealer Instillation von 800 µg Lipopolysaccharid (LPS) induziert (positives Votum der Ethikkommission der Bundesuniversität Rio de Janeiro, Brasilien). Zusätzlich wurden 7 Tiere mit LPS behandelt, jedoch nicht beatmet (Kontrollgruppe NV). Zu Beginn wurden alle Tiere mit variablen Tidalvolumina (mittleres Atemzugvolumen 6 ml/kg und Variationskoeffizient (CV) 30%, Normalverteilung), Inspirations/Expirations-Verhältnis 1:1, einem positiven end-expirato-

Abbildung 1



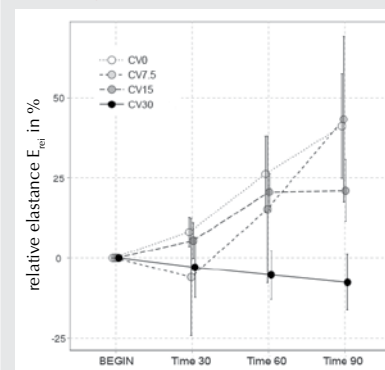
Kumulierter „Diffuser Alveolar Schaden“ (DAD)-Score (Median, Minimum, Maximum), Gruppe NV und CV0 signifikant gegenüber CV30 ($p < 0,05$).

rischen Druck (PEEP) von 4 cmH₂O und einer Atemfrequenz entsprechend dem Ziel PaCO₂ von 35–45 mmHg beatmet. Nach 30 Minuten wurden die Tiere einer von vier Therapiegruppen randomisiert zugeordnet: Tidalvolumen CV von 1) 0% (CV0), 2) 7.5%, 3) 15%, und 4) 30% (CV30). Dann folgte die studientherapeutische Beatmung über einen Zeitraum von 1,5 Stunden, wobei Parameter der Hämodynamik, des Gasaustausches sowie der Lungenmechanik halbstündig bestimmt wurden. Die Elastanz des respiratorischen Systems (E_{RS}) wurde pro Atemzug ermittelt und diente als Surrogat für die Lungenrekrutierung. Die Tiere wurden getötet und die Lunge zur weiteren Analyse entnommen. Histologische Proben wurden nach einem Score für den Diffusen Alveolaren Schaden beurteilt. Zusätzlich wurde die Entzündungsreaktion mittels mRNA-PCR (Polymerase-Kettenreaktion) untersucht. Die statistische Auswertung erfolgte mittels gepaarten t-Tests, Einweg-ANOVA, allgemein linearen Modells und Kruskal-Wallis-Test. Als Signifikanzniveau wurde $p < 0,05$ festgelegt.

Ergebnisse

Durch die Rekrutierung reduzierte sich E_{RS} und erhöhte sich P_{aO_2} in allen Gruppen. Während der Studientherapie stieg E_{RS} in allen Gruppen an, mit Ausnahme von CV30. Die

Abbildung 2



Änderung der totalen Elastanz E_{rel} (Mittelwert und Standardabweichung), Gruppe CV30 signifikant gegenüber allen anderen Gruppen ($p < 0,05$).

Oxygenierung zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Die Atemwegsdrücke und die Hämodynamik waren vergleichbar zwischen den Gruppen. Gruppe CV30 zeigte im histologischen Vergleich zu CV0 signifikant weniger Alveolarschäden. Die Genexpression von IL-8, Amphiregulin und TNF-alpha war signifikant höher in der CV0-Gruppe, verglichen mit allen anderen Gruppen und der NV-Gruppe.

Interpretation

Im LPS-induzierten experimentellen Lungenversagen der Ratte verhindert die Beatmung mit 30% Tidalvolumen-Variabilität eine Derekrutierung und reduziert die Lungenschädigung.

Literatur

1. Bellardine CL, Hoffman AM, Tsai L, Ingenito EP, Arold SP, Lutchen KR, et al: Comparison of variable and conventional ventilation in a sheep saline lavage lung injury model. Crit Care Med 2006; 34:439-445
2. Arold SP, Mora R, Lutchen KR, Ingenito EP, Suki B: Variable Tidal Volume Ventilation Improves Lung Mechanics and Gas Exchange in a Rodent Model of Acute Lung Injury. Am J Respir Crit Care Med 2002;165:366-371.

Mitochondriale DNA: Der „missing link“ zur Immun- suppression beim kritisch Kranken

A. Limmer^{1,2} · M. Adamzik^{3,4} · L. Franken¹ ·
S. Frede^{5,6} · J. Walden³ · N. Schönborn³ ·
A. Engler³ · J. Fandrey⁵ · A.M. Westendorf⁶ ·
J. Steinmann⁶ · J. Peters³ · S.T. Schäfer³

1 Institut für molekulare Medizin und
experimentelle Immunologie und

2 Klinik für Orthopädie, Universität Bonn

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

4 Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin
und Schmerztherapie, Universitätsklinikum
Knappschaftskrankenhaus Bochum,
Ruhruniversität Bochum

5 Institut für Physiologie,
Universität Duisburg-Essen

6 Klinik für Anästhesiologie und operative
Intensivmedizin, Universität Bonn

Institut für Medizinische Mikrobiologie,
Universitätsklinikum Essen und Universität
Duisburg-Essen

Korrespondenz: andreas.limmer@uni-bonn.de

Fragestellung

Unklar ist, warum kritisch Kranke häufig eine Sepsis entwickeln, auch wenn kein vorbestehender Fokus existiert. Mäuse mit induziertem Schlaganfall oder Verbrennungen entwickeln innerhalb weniger Stunden eine Sepsis [1,2]. Dies geht mit Zunahme der Zahl immunsuppressiv wirkender T-Zellen (Th1-Th2-Shift, Induktion regulatorischer T-Zellen) in Blut, Thymus und Milz sowie einer Konzentrationszunahme anti-inflammatorischer Zytokine im Blut (Interleukin 10) einher. Da Polytraumatisierte erhöhte Serumkonzentrationen des endogen freigesetzten Toll-Like-Rezeptor (TLR)-Liganden mitochondriale DNA (mtDNA) aufweisen und mtDNA neutrophile Granulozyten stimuliert [3], könnte mtDNA auch Einfluss auf weitere Immunzellen haben. Wir testeten die These, dass der TLR-Ligand mtDNA eine Immunparalyse auslösen kann.

Methodik

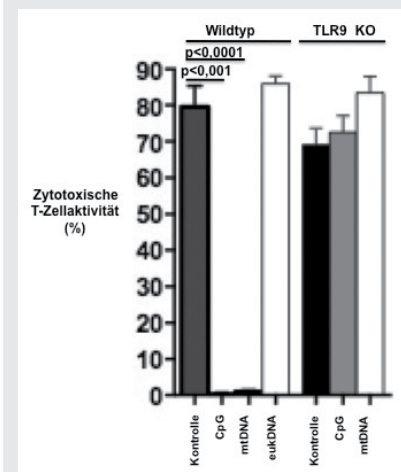
Zunächst wurde nach Genehmigung durch die Tierschutzbehörde in einem adenoviralen Modell bei Wildtyp (WT)- und TLR9-knock-out (KO)-Mäusen geprüft, ob mtDNA, mikrobielle CpG-DNA und genomische eukaryote (euk) DNA zytotoxische T-Zellen supprimieren und dies über TLR9 erfolgt. Zur Identifikation suppressiver Mechanismen nutzten wir folgende Methodenpalette: FACS-Analyse CD8⁺ dendritischer Zellen (DC), funktionelle Antigenkruz-Präsentationsmessung von DC (IL2, Interferon γ), Analyse der Milzstruktur sowie Messung der Kynurenin-Konzentration im Serum als Marker der immunsuppressiven

Indolaminaktivität. Um die Verhältnisse bei kritisch Kranken zu beleuchten, schlossen wir nach Votum der Ethikkommission der Universität Duisburg-Essen 160 Patienten mit schwerer Sepsis, 60 postoperative Intensivpatienten ohne Sepsis sowie 50 gesunde Probanden (Blutspender) in eine prospektive Beobachtungsstudie ein und bestimmten mtDNA- (ATPase 6, D-Loop; qPCR) und Kynurenin-Serumkonzentrationen (HPLC). Auch analysierten wir die Milzstruktur (Splenektomie) bei 10 Patienten. Statistik: Mittelwerte \pm SD; Mann-Whitney-Test; Ein-Weg-ANOVA, Post-hoc-Student-t-test; $p < 0,05/n$.

Ergebnisse

Bei Patienten mit Sepsis (ATPase6: 64-fach \pm 84; D-Loop: 79-fach \pm 83) und postoperativen Intensivpatienten ohne Sepsis (ATPase6: 15-fach \pm 21; D-Loop: 10-fach \pm 8) war die mtDNA-Serumkonzentration im Vergleich zu Probanden deutlich erhöht (alle $p < 0,0001$). Bei WT-Mäusen supprimierten CpG-DNA ($p < 0,0001$) und mtDNA ($p < 0,001$), nicht jedoch eukDNA ($p = ns$) die adaptive T-Zellantwort um 90% (Abb.1). Da dieser Effekt bei TLR9-KO-Mäusen aufgehoben war, ist TLR9 offenbar zentraler Mittler der mtDNA-induzierten Abnahme der zytotoxischen T-Zellaktivität. Ferner konnten wir eine Reihe dieser Immunsuppression offenbar zu Grunde liegenden Mechanismen aufzeigen. So führten mtDNA und CpG-DNA bei Mäusen zu einer veränderten Milzmorphologie (Splenomegalie, Auflockerung der Marginalzone) und reduzierten die Antigenkruzpräsentationsfähigkeit (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.

Abbildung 1

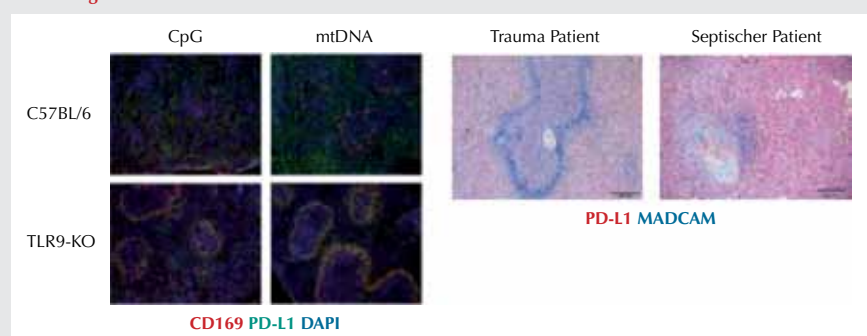


Zytotoxische T-Zellaktivität bei Wildtyp- und TLR9-KO-Mäusen.

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

Kontrolle $p < 0,0001$; mtDNA vs. Kontrolle $p < 0,0001$) im Vergleich zu TLR9-KO-Mäusen (alle $p = ns$) drastisch reduziert (Abb. 1). Suppressiv Membranproteine wie Programmed Cell Death Ligand 1 (PD-L1, Abb. 2) waren nach mtDNA-Injektion sowohl bei WT-Mäusen als auch in der Milz kritisch Kranker induziert (Abb. 2). Ebenso waren suppressiv wirkende Enzyme wie Kynurenin im Serum bei WT-Mäusen (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. 1) und bei Patienten gegenüber Blutspendern stark erhöht (11,8 μ M \pm 1,2 vs. 2,7 μ M \pm 2,6; $p < 0,0001$).

Abbildung 2



PD-L1 in Milzen von WT- und TLR9^{-/-}-Mäusen (links) sowie kritisch Kranken (rechts).

PD-L1 ist bei WT-Mäusen (links) nach einmaliger CpG- bzw. mtDNA-Injektion induziert, nicht jedoch bei TLR9^{-/-}-Mäusen. Bei Patienten mit Sepsis (rechts) ist PD-L1 ebenfalls stark induziert, nicht jedoch in Milzen von Patienten mit Splenektomie im Rahmen eines akuten Traumas.

Interpretation

Eine einmalige Injektion mitochondrialer DNA supprimiert bei Wildtyp-Mäusen TLR9-abhängig die adaptive Immunantwort und vermag eine Immunparalyse auszulösen. Ferner induziert mtDNA die Indolamin-2,3-Dioxygenase (Erhöhung der Kynurenin-Serumkonzentration) sowie PD-L1 und reduziert die für die Antigenkruzpräsentation relevanten CD8⁺DEC205⁺ DC bei Wildtyp-Mäusen erheblich. Da ein Teil der bei Mäusen beobachteten Phänotypen ein Korrelat im

Patienten hatte, scheint eine Translation dieser Ergebnisse möglich, zumal die mtDNA-Serumkonzentration bei kritisch Kranken mit sowie ohne Sepsis erheblich erhöht ist. Mithin mag mitochondriale DNA der „missing link“ für die Immunsuppression beim kritisch Kranken sein.

Literatur

1. Prass K, Meisel C, Höflich C, Braun J, Halle E, Wolf T, Ruscher K, Victorov IV, Priller J, Dirnagl U, Volk H-D, Meisel A: Stroke-induced

immunodeficiency promotes spontaneous bacterial infections and is mediated by sympathetic activation reversal by poststroke T helper cell type 1-like immunostimulation. *J Exp Med* 2003;198:725-36

2. Choileain NN, MacConmara M, Zang Y, Murphy TJ, Mannick JA, Lederer JA: Enhanced Regulatory T Cell Activity Is an Element of the Host Response to Injury. *J Immunol* 2005; 176:225-36
3. Zhang Q, Raoof M, Chen Y, Sumi Y, Sursal T, Junger W, Brohi K, Itagaki K, Hauser CJ: Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature* 2010;464:104-7.

Heparansulfate induzieren eine mitochondriale Dysfunktion in murinen Kardiomyozyten

L. Martin¹ · C. Peters¹ · S. Schmitz¹ · M. Lehrke² · G. Mueller-Newen³ · G. Marx¹ · T. Schuerholz¹

- 1 Klinik für Operative Intensivmedizin und Intermediate Care
- 2 Medizinische Klinik I
- 3 Institut für Biochemie und Molekularbiologie Uniklinik RWTH Aachen

Korrespondenz: tschuerholz@ukaachen.de

Fragestellung

Die systemische Inflammationsreaktion in der Sepsis wird durch zwei entscheidende Wege induziert und aufrechterhalten: Neben Wandbestandteilen pathogener Mikroorganismen werden endogene Mediatoren freigesetzt [1]. Zu Letzteren gehören Heparansulfate (HS), die von Proteoglykanen, die an der Zellmembran assoziiert sind, abgespalten werden und im Blut zirkulieren [2]. Die mitochondriale Dysfunktion ist maßgeblich an der Pathophysiologie der kardialen Dysfunktion in der Sepsis beteiligt und mit einer verminderten Expression von Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma Coactivator-1 alpha (PGC-1α) und beta (PGC-1β) assoziiert [3]. Wir hypothesierten, dass zirkulierende HS die Expression des PGC-1α/β reduzieren und somit entscheidend zur mitochondrialen Dysfunktion in Kardiomyozyten beitragen.

Methodik

Nach Genehmigung durch die lokale Ethikkommission wurde Serum von Patienten (n=5) im septischen Schock (SP, Gruppe 1) entnommen. HS wurden aus dem Serum mittels monoklonalen Antikörpers (USCN Life Science Ltd Co., Wuhan, China) und Affinitätschromatographie (Thermo Scientific Inc., Worcester, MA, USA) entfernt (HS-freies Serum = HS-FS, Gruppe 2) bzw. synthetische HS in gleicher Menge wieder hinzugefügt (HS-SP, Gruppe 3).

Murine Kardiomyozyten (HL-1-Zellen) wurden mit Claycomb-Medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) kultiviert. Die Zellen wurden für 4 Stunden mit HS (10 µg/ml), SP (5%), HS-FS oder HS-SP (5%) stimuliert. RNA wurde mittels Trizol isoliert und unter Verwendung von mausspezifischen Primern für PGC-1α und PGC-1β in der Real-time-PCR (7.300 Real-time-PCR-System, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) analysiert und gegen rpS7 normalisiert (alle Primer: biomers, Ulm, Germany). Die respiratorische Funktion der Mitochondrien wurde im XF96 (Seahorse Bioscience) quantifiziert. Mitochondriale Superoxide wurden im „live-cell imaging“ dargestellt. Hierfür wurden die Zellen nach der 4-stündigen Stimulation mit 10 µM MitoSOX Red und 1 µg/ml Hoechst 33.342 (beide Invitrogen, USA) inkubiert und mittels Konfokalmikroskop (LSM 710, Carl Zeiss, Germany) abgebildet. Die Quantifizierung der mitochondrialen Superoxide (Fluoreszenzmessung) und die mRNA-Expression werden in Relation zu unstimulierten Zellen als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben. Die Auswertung erfolgte mittels 1-way-ANOVA und Tukey's-Test mit einem Signifikanzniveau von p<0,05.

Ergebnisse

Die mRNA-Expression von PGC-1α und PGC-1β war in den Zellen, die mit HS stimuliert wurden, im Vergleich zu unstimulierten Zellen signifikant erniedrigt (-77,7 ± 4,9 und -76,9 ± 2,4; beide p<0,0001). Stimulation mit HS-FS resultierte in signifikant geringerer Reduktion der mRNA-Expressionen von PGC-1α und PGC-1β (-23,5 ± 3,4 und -24,2 ± 5,8) im Vergleich zu den Zellen, die mit SP (-52,6 ± 5,9 und -52,2 ± 4,4; p=0,0098 und p=0,0068) oder HS-SP (-55,5 ± 13,9 und -54,4 ± 12,5; p=0,0057 und p=0,0043) stimuliert wurden. Im Vergleich zu den unstimulierten Zellen (120,3 ± 4,5 pmol/min) war die basale mitochondriale Respiration in den HS-stimulierten Zellen (155,0 ± 2,6 pmol/min; p=0,0053), den SP-stimulierten Zellen (161,7 ± 13,9 pmol/min; p=0,0015) und in

den Zellen, die mit HS-SP stimuliert wurden (145,0 ± 10,8 pmol/min; p=0,0429), signifikant erhöht. Die maximale Respiration war in den Zellen, die mit HS stimuliert wurden, signifikant niedriger als in den unstimulierten Zellen (179,5 ± 13,4 pmol/min vs. 245,3 ± 9,0 pmol/min; p<0,0001). Stimulation mit HS-FS resultierte in signifikant höherer maximaler mitochondrialer Respiration im Vergleich zur Stimulation mit SP (248,7 ± 6,5 pmol/min vs. 124,0 ± 7,6 pmol/min; p<0,0001) oder im Vergleich zur Stimulation mit HS-SP (122,0 ± 6,1 pmol/min; p<0,0001). Die relative Fluoreszenz mitochondrialer Superoxide war in den Zellen, die mit HS stimuliert wurden, signifikant erhöht (3,0 ± 1,1; p<0,0001). Zellen, die mit HS-FS stimuliert wurden, zeigten eine signifikant niedrigere relative Fluoreszenz mitochondrialer Superoxide im Vergleich mit SP (1,2 ± 0,3 vs. 3,9 ± 1,0; p=0,0142) oder HS-SP (3,6 ± 0,5; p=0,0235).

Interpretation

In der Sepsis freigesetzte, zirkulierende Heparansulfate reduzieren die Expression von PGC-1α/β und reduzieren die metabolische Reserve in murinen Kardiomyozyten durch Induktion einer mitochondrialen Dysfunktion. Die Elimination der Heparansulfate führt zur Wiederherstellung der Funktion. Therapeutika, die Heparansulfate binden, könnten von Vorteil zur Prävention kardiomyozytärer Dysfunktion in der Sepsis sein.

Literatur

1. Wiersinga WJ, Leopold SJ, Cranendonk DR, van der Poll T: Host innate immune responses to sepsis. *Virulence* 2014;5:36-44
2. Nelson A, Berkestäd I, Bodelsson M: Circulating glycosaminoglycan species in septic shock. *Acta Anaesthesiol Scand* 2014;58:36-43
3. Schilling J, Lai L, Sambandam N, Dey CE, Leone TC, Kelly DP: Toll-like receptor-mediated inflammatory signaling reprograms cardiac energy metabolism by repressing peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 signaling. *Circulation* 2011;124:474-82.

Humane mesenchymale Stammzellen stellen das purinerge Calciumsignal in Bronchialepithelzellen von Zystische-Fibrose-Patienten wieder her

V. Meidl¹ · M. Kieffmann¹ · C. Börnchen¹ · K. Riecken² · C. Lange² · S. Schrepfer³ · A.E. Goetz¹ · R. Kieffmann¹

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

2 Onkologisches Zentrum, Interdisziplinäre Klinik und Poliklinik für Stammzelltransplantation

3 Klinik und Poliklinik für Herz- und Gefäßchirurgie

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Korrespondenz: m.kieffmann@uke.de

Fragestellung

Die funktionale Erholung eines geschädigten Gewebes durch humane mesenchymale Stammzellen (hMSCs) ist vielfach beschrieben. Es wurde gezeigt, dass hMSCs entweder den Heilungsprozess durch Sekretion von Mediatoren beeinflussen oder die geschädigten Zellen direkt ersetzen können [1].

Wir konnten bereits nachweisen, dass in humanen Bronchialepithelzellen (hBECs) von Zystische-Fibrose (CF)-Patienten die purinerge Signalkaskade eingeschränkt wirksam ist (siehe Ergebnisse). Diese bewirkt in gesunden hBECs nach Stimulierung mittels ATP über ein Purinrezeptor-induziertes (P2) Ca^{2+} -Signal

die Aktivierung eines Ca^{2+} -abhängigen Chloridkanals, welcher als alternativer Weg zum cystic fibrosis transmembrane conductance „regulator“ (CFTR) die mukosale Hydratation und somit die mukoziliäre Clearance-Funktion steigert [2].

Wir stellen die neuartige Hypothese auf, dass hMSCs in der Lage sind, gezielt diesen ATP-vermittelten Signalweg in hBECs von CF-Patienten zu reparieren.

Methodik

Primäre hMSCs und Bronchialepithelzellen von CF-Patienten (cfhBEC) wurden von lebenden Organspendern, die hBECs von hirntoten Organspendern isoliert. Alle primärisolierten Zellen sowie die immortalisierten (IB3-1) Zellen von CF-Patienten wurden unter Standardbedingungen kultiviert. Das Expressionsmuster der P2-Subtypen in hMSCs, hBECs und IB3-1 wurde mittels RT-PCR sowie Western Blot bestimmt. Die funktionale Charakterisierung purinerner P_2Y - oder P_2X -Rezeptorsubtypen erfolgte mittels ATP (100 μM ; Agonist für $\text{P}_2\text{Y}_{2,6,11}$), UDP (100 μM ; Agonist für P_2Y_6), BzATP (100 μM ; Agonist für P_2Y_{11}), in An- und Abwesenheit von extrazellulärem Calcium [3]. Die zytosolische Calciumkonzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$) wurde mittels konventioneller Fluoreszenzmikroskopie und Ratio-imaging von Fura-2 quantifiziert und die Ergebnisse mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie von Fluo-4 validiert. Zur Unterscheidung von hMSCs und IB3-1-Zellen in Co-Kultur wurden letztere stabil lentiviral mit einem

mCherry-Plasmid transduziert. Ob Calcium direkt von hMSCs auf IB3-1-Zellen übertreten kann, wurde mittels Calcium-uncaging untersucht. Dazu wurden diese beiden Zelltypen co-kultiviert und mit NP-EGTA beladen sowie mit Fluo-4-AM gefärbt. Durch gezielte UV-Laserimpulse wurden spezifisch in hMSCs zytosolisch „gefangene“ Ca^{2+} freigesetzt und die Ausbreitung dieses Ca^{2+} -Signals auf benachbarte IB3-1-Zellen mittels konfokalen Real-time-imaging dargestellt. Alle Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm SD angegeben. Zur statistischen Analyse wurde der Rank-sum-test für un-/verbundene Stichproben angewandt ($p < 0,05$, $n = 3-16$ Versuchsansätze). Die Gewinnung der humanen Zellen wurde durch die Ethikkommission der Ärztekammer Hamburg genehmigt.

Ergebnisse

In hMSCs erfolgte der Nachweis der Subtypen $\text{P}_2\text{Y}_{1,2,6,11}$ sowie $\text{P}_2\text{X}_{4,5}$ auf mRNA- und $\text{P}_2\text{Y}_{2,6,11}$ auf Proteinebene. In hBECs wurden die Subtypen $\text{P}_2\text{Y}_{1,2,11}$ und P_2X_5 auf mRNA- sowie der P_2Y_2 -Rezeptor auf Proteinebene identifiziert. In IB3-1-Zellen wurde auf mRNA-Ebene $\text{P}_2\text{Y}_{1,11}$ und $\text{P}_2\text{X}_{4,5}$, jedoch kein P2-Subtyp auf Proteinebene detektiert. ATP, nicht aber UDP, induzierte in Anwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} in hMSCs eine Erhöhung von $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ um $104,5 \pm 26,2$ nM vs. Ausgangsbedingung. Unter Ca^{2+} -freien Bedingungen konnte auf ATP hin ein vergleichbares Ca^{2+} -Signal ausgelöst werden, hingegen induzierte BzATP nur unter Ca^{2+} -haltigen

Bedingungen eine Ca^{2+} -Antwort. In hBECs steigerte ATP $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ um $102,8 \pm 40,4$ nM vs. Ausgangsbedingung. Diese Ca^{2+} -Antwort war in cfhBECs ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$: $40,7 \pm 9,6$ nM) sowie in IB3-1 ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$: $11,8 \pm 2$ nM) im Vergleich zu hBECs deutlich abgeschwächt. Durch Co-Kultivierung mit hMSCs stieg $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ in IB3-1-Zellen auf $62,8 \pm 18,2$ nM an. Calcium-uncaging führte in hMSCs zur Zunahme der Fluo-4-Fluoreszenzintensität von $63,8 \pm 8,5$ auf $227,7 \pm 13,4$ und in benachbarten IB3-1-Zellen von $56,8 \pm 6,6$ auf $85,4 \pm 15,7$ Arbitrary-Units.

Interpretation

In hMSCs und hBECs scheint ATP vornehmlich über den P_2Y_2 -Rezeptor ein Ca^{2+} -Signal

hervorzurufen. Dieses war in cfhBECs sowie in IB3-1-Zellen verringert, konnte jedoch durch Co-Kultivierung der IB3-1-Zellen mit hMSCs gesteigert werden. Diese Ergebnisse scheinen unseres Wissens nach den ersten Hinweis dafür zu liefern, dass hMSCs die Funktionseinschränkung eines Rezeptor-vermittelten Ca^{2+} -Signals in einem anderen Zelltyp wieder aufheben. Dieses könnte auf Grund der Calcium-uncaging-Experimente zumindest teilweise durch einen Transfer des Ca^{2+} -Signals von hMSCs auf IB3-1-Zellen erklärt werden. Ob durch diese mögliche neue Option der Stammzelltherapie die Chloridsekretion und damit die mukoziliäre Eigenschaft in CF-Patienten verbessert werden kann, ist Gegenstand aktueller Untersuchungen.

Literatur

1. Conese M, Carbone A, Castellani S, Di Gioia S: Paracrine Effects and Heterogeneity of Marrow-Derived Stem/Progenitor Cells: Relevance for the Treatment of Respiratory Diseases Cells Tissues Organs 2013;197:445-473
2. Accurso FJ, Moss RB, Wilcott RW, Anbar RD, Schaberg AE, Durham TA, et al: Denu-fosol tetrasodium in patients with cystic fibrosis and normal to mildly impaired lung function. Am J Respir Crit Care Med 2011;183:627-34
3. Burnstock G: Purinergic signalling: Its unpopular beginning, its acceptance and its exciting future. Bioessays 2012 Mar;34(3):218-25.

ApoA-I-mimetisches Peptid und E06 mAb als neue Targets bei OxPAPC-induzierter Hyperalgesie bei Ratten

B. Oehler¹ · R. Mayer¹ · S. Sauer¹ · M. Mohammadi¹ · D. Pflücke¹ · J. Schiller³ · N. Roewer¹ · R. Blum² · A. Brack¹ · H. Rittner¹

1 Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie,

2 Institut für klinische Neurobiologie, Universitätsklinikum Würzburg

3 Institut für Medizinische Physik und Biophysik, Universität Leipzig

Korrespondenz: Oehler_B@ukw.de

Fragestellung

In der Entzündung werden oxidierte Phospholipide durch die Reaktion von reaktiven Sauerstoffspezies mit Lipiden aus der Zellmembran freigesetzt. Entstandenes oxidiertes 1-Palmitoyl-2-Arachnoidyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin (OxPAPC) ist als pro- sowie anti-inflammatorischer Mediator bekannt. OxPAPC ist an der Bildung arteriosklerotischer Läsionen sowie in der akuten Lungenentzündung beteiligt [1]. ApoA-I-Peptid, ein Strukturpeptid von „high density“ Lipoproteinen (HDL), fängt reaktive Lipide ab und reduziert so ihr pro-inflammatorisches Potenzial [2]. Nach Entwicklung und Untersuchung von synthetisch hergestelltem ApoA-I-mimetischen Peptid in vitro wurden bereits klinische Phase-II-Studien zu dessen Verträglichkeit durchgeführt. Der monoklonale Antikörper E06, welcher oxidierte Phospholipide bindet, kann für die Markierung sowie die In-vivo-Bindung genutzt werden [3]. In Vorarbeiten konnten wir bereits zeigen, dass OxPAPC mechanische und thermische Hyperalgesie in Ratten auslöst. Außerdem konnten wir mittels Matrix-unterstützter Laser-Desorption/Ionisation und Massenspektrometrie mit Flugzeitanalysator (MALDI-TOF)

OxPAPC im entzündeten Gewebe nach intraplantarer Injektion von komplettem Freund'schen Adjuvans (CFA) nachweisen. Target für die Vermittlung OxPAPC-induzierter Hyperalgesie ist die Aktivierung des „Transient Receptor Potential“-Kanals vom Ankyrin-Typ (TRPA1).

In dieser Studie untersuchen wir mögliche antinozizeptive Effekte des ApoA-I-mimetischen Peptids (ApoA-I) sowie E06 mAb auf OxPAPC- und CFA-induzierter Hyperalgesie bei Ratten sowie die Beeinflussung der OxPAPC-vermittelten TRPA1-Aktivierung durch ApoA-I und E06.

Methodik

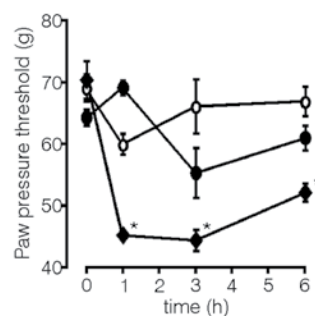
Für die Messung mechanischer und thermischer Schmerzschwellen sowie des Pfoten-volumens applizierten wir entweder lokal OxPAPC, CFA zusammen mit den potentiellen Inhibitoren E06 mAb (E06) oder ApoA-I lokal und systemisch bei Wistar-Ratten. In

Fura-2-gestützten Einzelzellkalziummessungen wurde der intrazelluläre Kalziumanstieg in stabil mit TRPA1-transfizierten HEK-293-Zellen sowie in kultivierten Hinterwurzelganglien (DRGs) von Mäusen bestimmt. Die Messung nach Stimulation mit einer Mischung aus OxPAPC und ApoA-I oder E06 wurden mit OxPAPC sowie Senföl, einem Standardagonisten von TRPA1, verglichen. Für die Durchführung der Tierversuche lag eine Genehmigung der Regierung von Unterfranken vor (REG61/11). Die Datenauswertung erfolgte mit ANOVA bzw. Two-Way-ANOVA.

Ergebnisse

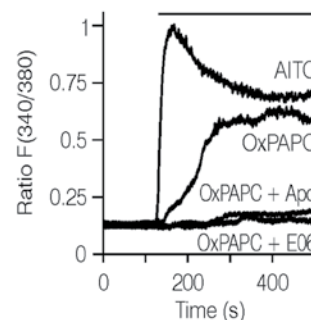
Die simultane, lokale Behandlung mit ApoA-I (Abb. 1) oder E06 hebt OxPAPC-induzierte mechanische und thermische Hyperalgesie bei Ratten auf. Die im Rahmen einer lokalen Entzündung durch CFA induzierte mechanische Hyperalgesie wird durch 1. einmalige lokale Gabe von ApoA-I oder E06 in

Abbildung 1



ApoA-I hebt OxPAPC-induzierte mechanische Hyperalgesie (●) sowohl nach systemischer Vorbehandlung der Tiere (○) als auch nach lokaler Co-Injektion (▲) auf (n=6, *p<0,05 vs. ApoA-I).

Abbildung 2



OxPAPC aktiviert TRPA1 in HEK-293. Simultane Applikation von OxPAPC und ApoA-I oder E06 blockieren die TRPA1-Aktivierung. AITC als Referenzagonist. (n=100, Mittelwert).

der frühen Entzündungsphase und 2. repetitive systemische Gabe von ApoA-I sowohl akut als auch längerfristig reduziert ($n=6$, Two-Way-ANOVA, $p<0.05$ vs. CFA). Gleichzeitig reduzieren sich die Pfotenschwellung und Entzündung. Thermische CFA-induzierte Hyperalgesie bleibt durch ApoA-I-Behandlung unverändert. In intrazellulären Kalziummessungen aktiviert OxPAPC-TRPA1 in transfizierten HEK-293-Zellen sowie in DRGs. Die Anzahl der reagierenden Zellen sowie die „area under curve“ (AUC) sind nach Stimulation mit Gemischen aus OxPAPC und ApoA-I

beziehungsweise E06 reduziert (Abb. 2) ($n>6$, One-Way-ANOVA, $p>0.05$).

Interpretation

ApoA-I-mimetisches Peptid und E06 mAb sind zwei mögliche Therapeutika in der Behandlung von Entzündungsschmerzen, die den neu entdeckten proalgetischen Mediator OxPAPC blockieren könnten. TRPA1 auf Nozizeptoren ist zentrales Target von OxPAPC.

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

Elektrohydraulische Stimulation reguliert die Gefäßregeneration über die Freisetzung von freien TLR3-Liganden und exosomaler microRNA

P. Paulus¹ · C. Tepeköylü² · B. Scheller¹ · Ch. Reissig¹ · M. Grimm² · K. Zacharowski¹ · J. Holfeld²

1 Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie, Universitätsklinikum Frankfurt/Main

2 Universitätsklinik für Herzchirurgie, Medizinische Universität Innsbruck

Korrespondenz: patrick.paulus@gmx.net

Fragestellung

Ischämische Herz- und Skelettmuskelerkrankungen stellen große sozio-ökonomische Probleme dar. Elektrohydraulische Stoßwellen (EHS), welche bereits erfolgreich zur Geweberegeneration eingesetzt werden, können Endothelzellen direkt über einen Toll-like-Rezeptor (TLR)-3-abhängigen bi-phasischen Signalweg stimulieren [1,2] und dadurch die Angiogenese in ischämischem Myokardgewebe hervorrufen [3]. Die genauen Mechanismen der Mechanotransduktion, also der Umwandlung eines mechanischen Stimulus in eine biologische Antwort, sind jedoch noch ungeklärt. Wir nehmen an, dass EHS die Freisetzung von zytoplasmatischen TLR3-Liganden, teils über exosomale Wege, fördert und so die Neoangiogenese induziert.

Methodik

EHS wurden mit einem defokussierten Schallkopf CP-155, 300 Impulsen mit 0,1 ml/mm² und 3 Hz appliziert. Schäden auf humanen Nabelschnurendothelzellen (HUVECs) durch EHS wurden mittels LDH-Messung ausgeschlossen. Ein Teil der HUVECs wurde zusätzlich mit Cycloheximid (CHX), inkubiert. Als Kontrolle dienten HUVECs ohne Behandlung (CTR), mit Poly(I:C) und mit EHS (EHS) Behandlung. In den Überständen

wurde die RNA-Konzentration photometrisch bestimmt und in einer Gruppe mit RNase III (EHS+RNase) behandelt. Danach wurde der Überstand weitere 24 h auf TLR3/ISRE-LUC-Reporterzellen inkubiert. Am Ende des Versuchs wurde die Luziferase-Aktivität bestimmt. Die Genexpressionen wurden mittels RT-PCR bestimmt. Aus den Zellkulturüberständen isolierten wir exosomale RNA und führten einen miRNA-Array durch. Nach Erteilung der Tierversuchsgenehmigung durch die zuständige Behörde der Medizinischen Universität Innsbruck wurden je $n=6$ Wildtyp (WT)- sowie TLR3-defizienten (TLR3^{-/-}) C57Bl6-Mäusen operativ die linke A. Femoralis verodet. Die Tiere wurden entsprechend der Empfehlungen durch die EU-Direktive 86/609 EEC gehalten, und eine Schmerzfreiheit über die Dauer der Versuche wurde sichergestellt. Nach 6 h wurde die EHS-Therapie durchgeführt. Tiere mit Ischämie und ohne EHS dienten als Kontrolle (CTR). Serum und Muskelproben wurden 72 h und 28 Tage nach EHS-Applikation entnommen. Die RNA-Konzentration im Serum wurde photometrisch bestimmt, die Muskel wurden molekularbiologisch und immunhistochemisch auf TLR3-Aktivierung und Neoangiogenese untersucht. Die Durchblutung der Hinterläufe wurde mittels Laser-Doppler gemessen. Statistisch wurden die Resultate mittels ANOVA und Tukey-Post-hoc-Test ausgewertet. Die Daten wurden als Mittelwerte \pm SEM dargestellt.

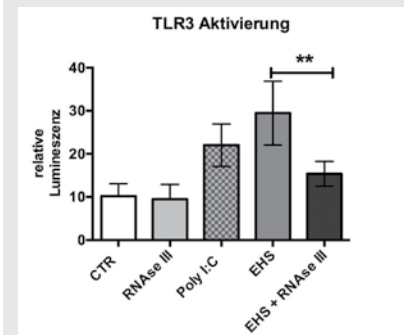
Ergebnisse

Nach EHS-Stimulation gab es keine Zellschäden. Es konnten erhöhte RNA-Konzentrationen in den Überständen gefunden werden (CTR 19.73 \pm 1.04 μ g/ μ l vs. EHS 34.93 \pm 0.87 μ g/ μ l, $p<0.001$). In EHS-behandelten HUVECs war TLR3-mRNA signifikant hochreguliert, und die CHX-Behandlung hatte keinen Einfluss auf die TLR3 (relative mRNA-Expression, EHS 272.43 \pm 3.87, EHS + CHX 202,9 \pm 7 vs. CTR 21.28 \pm 1.43, $p<0.001$)

Literatur

1. Imai Y., et al: Cell, 2008;133(2):235-49
2. Navab M., et al: Trends Cardiovasc Med 2008;18(2):61-6
3. Hörkö S., et al: J Clin Invest, 1999;103(1):117-28.

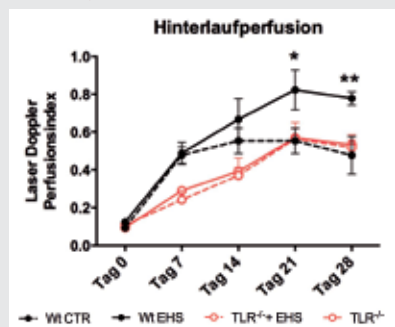
Abbildung 1



Der Reporterzell-Assay zeigt eine selektive Aktivierung des TLR3-Signalweges durch EHS. Nach RNase-III-Verdau geht diese Antwort verloren. Dies deutet auf die selektive Freisetzung von doppelsträngigen RNAs nach EHS hin.

und IFN- β 1- Expression (EHS 71.37 \pm 7.95, EHS+CHX 72.37 \pm 8.71 vs. CTR 32.85 \pm 6.21). In der RNase-III-Gruppe blieb die TLR3-Aktivierung aus (Relative Lumineszenz: CTR 10.17 \pm 2.91, EHS 29.47 \pm 7.43, EHS+RNase 15.37 \pm 2.88, Poly(I:C) 22.02 \pm 4.94) (Abb. 1). Im Array beobachteten wir, dass EHS selektiv miRNAs induzieren, welche mit der muskulären Regeneration in Zusammenhang stehen. Im Mausmodell der Hinterlaufischämie konnten wir nach EHS eine signifikant erhöhte RNA-Konzentration im Serum nachweisen. Nur bei WT+EHS-Tieren konnten wir bereits nach 72 h einen Anstieg des TLR3-Signalmoleküls IRF3 erkennen (CTR 46.7 \pm 16.72 vs. EHS 101.69 \pm 14.14, $P<0.01$; EHS vs. TLR3^{-/-} + EHS 13.43 \pm 4.97, $p<0.01$). Nach 28 Tagen konnte eine verbesserte Perfusion der Extremität bei den WT-, aber nicht bei TLR3^{-/-}-Mäusen nachgewiesen werden (relative Einheiten; CTR 0.51 \pm 0.06 vs. EHS 0.82 \pm 0.09, $p<0.05$; EHS vs. TLR3^{-/-}+EHS 0.54 \pm 0.08, $p<0.05$; (Abb. 2). Erhöhte CD31 (Endothelzellmarker) und α -Smooth-Muscle-Actin-

Abbildung 2



In vivo führt EHS zu einer verbesserten Perfusion im Hinterlaufschämie-Modell. Dieser Effekt bleibt in den TLR3^{-/-}-Tieren jedoch aus.

Differentielle Transkriptionsanalyse von geschädigten und intakten benachbarten Spinalwurzelganglienneuronen bei Neuropathie bei Mäusen

A.-K. Reinhold^{1,2} · L. Batti¹ · D. Bilbao¹ · N. Roewer² · H.L. Rittner² · P.A. Heppenstall¹

- 1 European Molecular Biology Laboratory, Monterotondo/Italien
- 2 Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie, Universitätsklinikum Würzburg

Korrespondenz: reinhold_a@ukw.de

Fragestellung

Neuropathischer Schmerz ist ein komplexes Phänomen und in seinen molekularen Grundlagen bislang nur unzureichend verstanden. Die Komplexität der Pathophysiologie beruht einerseits auf der Beteiligung unterschiedlicher Zelltypen (neuronal, immun, glial). Andererseits sind neuronale nicht nur primär geschädigte, sondern auch intakte, benachbarte Neurone involviert [1]. Verschiedene fluoreszierende neuronale Marker können zur Differenzierung dieser neuronalen Subgruppen benutzt werden [2]. 1-Dioctadecyl-3,3,3,3-Tetramethylindocarbocyanin-Perchlorat (DiI), ein amphiphiles Carbocyanin, markiert alle Neuronen, indem es rasch in die Lipid-Doppelmembran eindringt und axonal passiv weiter diffundiert. Fluoroemerald (FE) dagegen kann als Fluorescein-markiertes Dextran (Mw 10.000 kDa) nur bei gestörter Membranfunktion aufgenommen werden und identifiziert geschädigte Neurone. In dieser Studie untersuchten wir die Genexpression in primär geschädigten sowie benachbarten Neuronen aus Spinalwurzelganglien (DRG) im Mausmodell der Chronic Constriction Injury (CCI). Hierzu etablierten wir eine Metho-

(α -SMA)-Proteinexpressionen waren nur in der EHS-Gruppe zu beobachten (Relative Signalexpression, CD31: CTR 0.41 ± 0.15 , WT+EHS 2.94 ± 1.67 , TLR3^{-/-} 0.23 ± 0.04 , TLR3^{-/-}+EHS 0.42 ± 0.14 , $p < 0.05$; α -SMA: CTR 4.91 ± 1.06 , WT+EHS 13.63 ± 4.0 , TLR3^{-/-} 0.42 ± 0.14 , TLR3^{-/-}+EHS 0.46 ± 0.06 , $p < 0.05$).

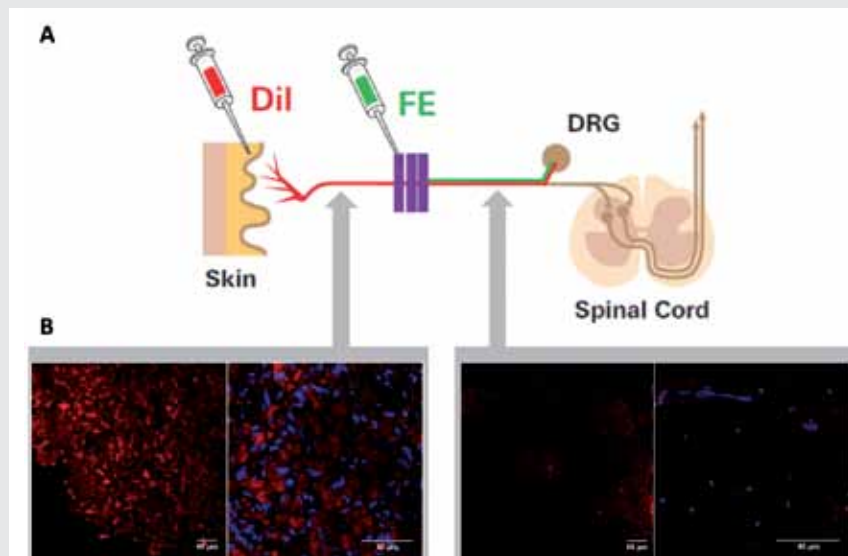
Interpretation

EHS können das Wachstum neuer Blutgefäße über TLR3-abhängige Signalwege induzieren. Sowohl freie, doppelsträngige RNAs als auch exosomale miRNAs scheinen hierbei als Mediatoren zu fungieren. Der Freisetzungsmechanismus ist wahrscheinlich nicht Protein-mediiert. Exosome könnten hier eine essentielle Rolle spielen.

Literatur

1. Holfeld J, Tepekoylu C, Kozaryn R, Mathes W, Grimm M, Paulus P: Shock wave application to cell cultures. J Vis Exp 2014
2. Holfeld J, Tepekoylu C, Kozaryn R, Urbach A, Zacharowski K, Grimm M, et al: Shockwave therapy differentially stimulates endothelial cells: implications on the control of inflammation via toll-Like receptor-3. Inflammation 2014;37:65-70
3. Holfeld J, Zimpfer D, Albrecht-Schgoer K, Stojadinovic A, Paulus P, Dumfarth J, et al: Epicardial shock-wave therapy improves ventricular function in a porcine model of ischaemic heart disease. J Tissue Eng Regen Med 2014 (Epub ahead of print).

Abbildung 1



Tracerinjektion. (A) FE wird am Läsionsort epineurial injiziert, DiI bilateral an der Hinterpfote intraplantar. (B) Histologische Untersuchung des DiI-Signals (rot) proximal und distal der Ligatur nach 7 d (blau = DAPI, n = 3, repräsentativ, Balken = 40 μ m).

de zur Isolierung der Gruppen mithilfe von DiI und FE sowie durchflusszytometrischer Zellsortierung (FACS).

Methodik

C57BL/6J-Mäusen wurde nach lockerer Ligatur des N. ischiadicus (CCI) an der Läsionsstelle epineurial FE und bilateral intraplantar DiI injiziert [Abb. 1A]. Nach 7 d wurden aus den DRG L3-5 bilateral die Zellen isoliert und FACS-sortiert (3 Analysen, je n=13). Die mRNA der aufgereinigten Zellpopulationen wurden mit einem Microarray analysiert und durch Two-Way-ANOVA (Benjamini-

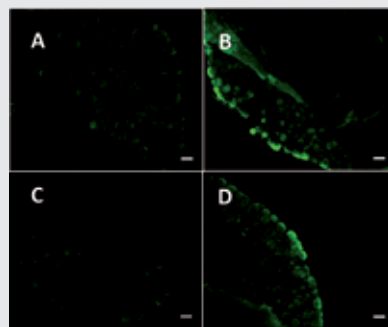
Hochberg-Korrektur) statistisch ausgewertet (BioConductor). Mittels (Immun-)Fluoreszenz wurde ferner 1. in Gefrierschnitten der N. ischiadicus auf das DiI-Signal gemeinsam mit einer Kernfärbung und 2. die Immunreaktivität von Corticolibertin (CRH) im DRG untersucht. Alle Tierversuche wurden von der Ethikkommission des EMBL Monterotondo (Italien) genehmigt.

Ergebnisse

Proximal der Läsion nimmt die DiI-Fluoreszenz im N. ischiadicus stark ab (Abb. 1B). In der FACS der DRG-Zellen zeigten sich

zwei deutlich voneinander abzugrenzende Populationen, Dil^+/FE^- (benachbart) sowie FE^+ (geschädigt), in einem Verhältnis von ca. 2:1. Beide Gruppen weisen unterschiedliche mRNA-Expressionsmuster auf, sowohl im direkten Vergleich (für 706 von 45.101 Genen) als auch jeweils zur kontralateralen Kontrolle. Signifikant hochreguliert in geschädigten Neuronen sind bekannte Neuropathie-assoziierte Gene, z.B. der purinerge Rezeptor $P2rx3$ (8,2-fach) und das Neuropeptid Galanin (7,2-fach). Viele dieser mRNAs sind – als Trend – auch in benachbarten Neuronen hochreguliert. Zudem sind einige Gene nur in den intakten Neuronen erhöht (z.B. das Chemokin $Cxcl14$). Das am stärksten hochregulierte Gen ist CRH mit 208-facher Überexpression in geschädigten Neuronen. Auch immunohistochemisch ist hier die Immunreaktivität von CRH gegenüber nativen Neuronen erhöht (Abb. 2).

Abbildung 2



Immunohistochemie für CRH in DRGs. Nach Sham-OP ist die CRH-Immunreaktivität sehr niedrig (A, C). Nach CCI (B, D) zeigt sich ein robustes CRH-Signal im Zytoplasma von Zellen variabler Größe. (repräsentativ, n=3, Balken = 60 μ m).

Interpretation

Die Markierung mit Dil und FE in vivo erlaubt eine Unterscheidung und differenzielle Analyse zwischen geschädigten und benachbarten Neuronen nach traumatischer peripherer Nervenläsion. Die unterschiedlichen Genexpressionsprofile unterstreichen die Bedeutung von benachbarten intakten Neuronen als relevante eigenständige Gruppe. Neben der Hochregulation bekannter neuropathierelevanter Gene in geschädigten Neuronen konnten wir neue potentielle Targets wie CRH identifizieren.

Gefördert durch das EU-Projekt "ncRNAPain".

Literatur

1. Campbell JN, Meyer RA: Mechanisms of Neuropathic Pain. *Neuron* 2006;52:77
2. Choi D, et al: Fluorescent retrograde neuronal tracers that label the rat facial nucleus: A comparison of fast blue, fluoro-ruby, fluoro-emerald, fluoro-gold and Dil . *J Neurosci Methods* 2002;117:167.

Variable Dehnung reduziert die Freisetzung von Zytokinen bei Lipopolysaccharid-stimulierten Alveolarepithelzellen mittels des extrazellulär regulierten Kinase-1/2-Signalweges

I. Rentzsch · C. L. Santos · R. Huhle · C. Schnabel · E. Koch · T. Koch · M. Gama de Abreu

Klinik und Poliklinik für Anästhesie und Intensivtherapie, Universitätsklinikum Carl Gustav Carus, TU Dresden

Korrespondenz: ines.rentzsch@uniklinikum-dresden.de

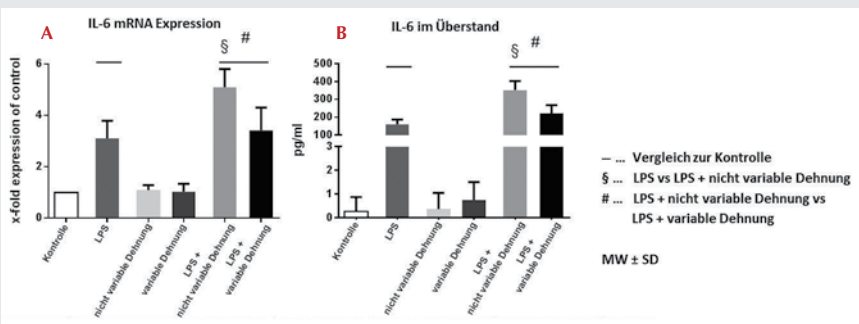
Fragestellung

Es wurde gezeigt, dass variable Beatmung eine Entzündungsreaktion der Lunge reduziert [1]. Während zahlreiche Studien zu den Effekten von nicht variabler, zyklischer Dehnung der Basalmembran von Alveolarepithelzellen (AECs) existieren, fehlen Analysen über die Auswirkung von variabler Dehnung auf AECs. Daher war das Ziel dieser Arbeit die Untersuchung von Dehnungsmustern auf die Freisetzung der Zytokine Interleukin-6 (IL-6), C-C-motif-Ligand-2 (CCL-2) und C-X-C-motif-Ligand-2 (CXCL-2) und die zugrunde liegenden Signalwege in AECs. Wir stellten die Hypothese auf, dass variable im Vergleich zu nicht variabler Dehnung die pro-inflammatorische Antwort von AECs reduziert und somit einen möglichen Wirkmechanismus variabler Beatmung darstellt.

Methodik

Die Alveolarepithelzelllinie L2 wurde auf flexiblen Silikonmembranen kultiviert und mit bzw. ohne Inhibitoren (PD184161, 2µM, 30 min oder JNK Inhibitor II, 20µM, 1 h) und mit bzw. ohne LPS (2µg/ml, 1 h) inkubiert. Anschließend wurden die Zellmembranen in einer eigens entwickelten Zellkulturkammer einer Sinus-artigen, nicht variablen Dehnung (7,5%) oder einer variablen Dehnung (1-15%, MW: 7,5%, SD 2,5%) mit einer Dehnungs-/Relaxations-Ratio von 1:1 und einer Frequenz von 0,5 Hz ausgesetzt. Die Bestimmung der mRNA-Expression bzw. des Proteingehaltes von IL-6, CCL-2 und CXCL-2 erfolgte nach 4 Stunden Dehnung mittels Real-Time-PCR und kommerziell erhältlichen ELISAs. Zur Bestimmung des Phosphorylierungsgrades der extrazellulär regulierten Kinase 1/2 (ERK1/2) und der stress-aktivierten Proteinkinase (SAPK) wurden Western-Blot-Analysen zum Zeitpunkt 0 und nach 15, 30, 45 und 60 min nach Dehnung angewendet. Die statistischen Analysen wurden mittels One-Way-ANOVA, gefolgt durch den Tukey-Post-hoc-Test durchgeführt. Ein p<0,05 wurde als signifikant angenommen, alle Ergebnisse wurden als Mittelwert(MW) ± SD angegeben.

Abbildung 1



mRNA-Expression und Proteingehalt im Zellkulturüberstand von IL-6. Dargestellt ist der MW±SD von n=5 Experimenten.

Tabelle 1

mRNA-Expression und Proteingehalt von CCL-2 und CXCL-2.

Zytokine	Untersuchung von:	Kontrolle	LPS	nicht variable Dehnung	variable Dehnung	LPS + nicht variable Dehnung	LPS + variable Dehnung
CCL-2	mRNA	1	230,3 ± 30,94	1,450 ± 0,435	1,531 ± 0,299	377,0 ± 47,41	216,4 ± 26,57
	Protein in pg/ml	0,104 ± 0,427	64,2 ± 19,18	0,045 ± 0,135	0 ± 0	85,66 ± 16,74	58,39 ± 18,32
CXCL-2	mRNA	1	36,39 ± 0,394	1,745 ± 0,394	1,054 ± 0,378	54,89 ± 6,343	34,49 ± 6,884
	Protein in pg/ml	33,32 ± 20,75	1438 ± 405	46,65 ± 19,9	57,57 ± 36,28	2012 ± 236,4	1329 ± 282,4

Ergebnisse

In nicht stimulierten L2-Zellen konnten weder auf mRNA-Ebene noch im Proteingehalt der untersuchten Zytokine signifikante Unterschiede detektiert werden (Abb. A und B, Tab. 1). Allerdings führte eine nicht variable Dehnung in LPS-stimulierten L2-Zellen sowohl zu einer signifikanten Zunahme der mRNA als auch zu einem signifikanten Anstieg des Proteingehaltes von IL-6, CCL-2 und CXCL-2 im Vergleich zu nicht gedehnten oder variabel gedehnten Zellen (p<0,05; n=4) (Abb. A und B, Tab.1). Die darüber hinaus untersuchte SAPK zeigte eine Erhöhung des Phosphorylierungsgrades nach 15 min sowohl bei nicht variabler als auch bei variabler Dehnung in nicht stimulierten und auch in LPS-stimulierten L2-Zellen. Im Gegensatz dazu konnte eine Erhöhung im Phosphorylierungsgrad von ERK1/2 nach 30 min sowohl bei nicht variabler als auch variabler Dehnung von nicht stimulierten L2-Zellen nachgewiesen werden. Bei LPS-stimulierten Zellen war eine erhöhte Phosphorylierung nur nach 30-minütiger, nicht variabler Dehnung nachweisbar, wohingegen bei variabler Dehnung lediglich die basale Phosphorylierung registriert werden konnte. Die Blockierung der Phosphorylierung der SAPK mit dem JNK Inhib. II in LPS-stimulierten AECs führte zu einer Abnahme in der IL-6 mRNA, unabhängig von der Art der Dehnung. Mit dem Einsatz des

ERK1/2-Inhibitors PD184161 konnte lediglich die IL-6 mRNA-Expression in LPS-stimulierten, nicht variabel gedehnten Zellen unterdrückt werden. In LPS-stimulierten, variabel gedehnten AECs blieb diese Abnahme aus.

Interpretation

Es konnte gezeigt werden, dass in nicht stimulierten L2-Zellen die Art der Dehnung sowohl in Bezug auf die Signalweiterleitung als auch in der Bildung der Zytokine IL-6, CCL-2 und CXCL-2 keine Rolle zu spielen scheint. In LPS-stimulierten L2-Zellen allerdings wurde nachgewiesen, dass variable Dehnung die Bildung und Freisetzung dieser Zytokine im Vergleich zu nicht variabler Dehnung reduziert und diese Wirkung durch den ERK1/2-Signalweg vermittelt wird. Somit stellt die Reduktion der pro-inflammatorischen Antwort bei AECs einen möglichen Mechanismus der Lungenprotektion durch variable Beatmung dar.

Literatur

1. Boker A, Ruth Graham M, Walley KR, McManus BM, Girling LG, Walker E, Lefevre GR, Mutch WAC: Improved Arterial Oxygenation with Biologically Variable or Fractal Ventilation Using Low Tidal Volumes in a Porcine Model of Acute Respiratory Distress Syndrom. Am J Respir Crit Care Med 2002;165:456-62.

Die Cox1-induzierte Thromboxan-synthese vermittelt die Neutrophilen-Rekrutierung, NET-Formation und Pathogenbeseitigung in einem murinen Modell der bakteriellen Pneumonie

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

Klinik für Anästhesiologie, operative Intensivmedizin und Schmerztherapie, Universitätsklinikum Münster

Korrespondenz: rossaint@uni-muenster.de

Fragestellung

Die Pneumonie besitzt eine hohe Inzidenz bei Intensivpatienten und ist mit einer hohen Letalität assoziiert. Hierbei kommt es zu einer Rekrutierung von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMNs) in die Lunge zur Pathogen-Elimination. Im Rahmen der pulmonalen Inflammation interagieren PMNs mit aktivierten Thrombozyten [1]. Diese Interaktion ist wichtig für die vollständige Aktivierung und Rekrutierung von PMNs. Prostaglandine, wie z.B. Thromboxan A₂ (TxA₂), sind entscheidend an der PMN-Rekrutierung beteiligt [2]. Der transzelluläre Austausch von Lipidmetaboliten zwischen PMNs und Thrombozyten sowie der Metabolismus dieser Botenstoffe ist bis zum heutigen Tag jedoch unbekannt. Ziel dieser Studie war die Identifikation der molekularen Regulationsmechanismen der

Prostaglandinsynthese nach Thrombozyten-PMN-Interaktion und die Konsequenzen für den pulmonalen Entzündungsprozess.

Methodik

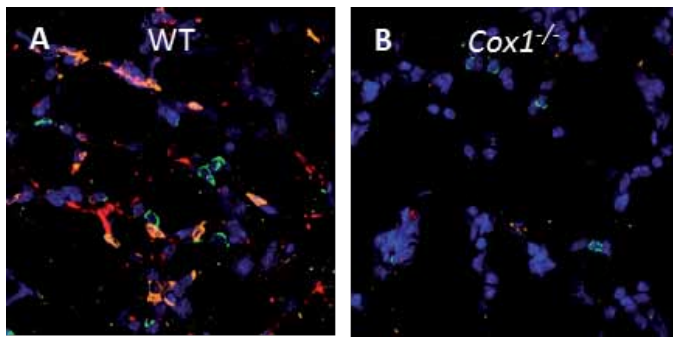
Eine Pneumonie wurde bei Mäusen durch Instillation von *E. coli* induziert [3]. Nach 24 Stunden wurden die Anzahl der PMNs in der bronchoalveolären Lavage (BAL) quantifiziert, die Anzahl der Bakterien in der BAL sowie in der Lunge und der Milz bestimmt und die Anzahl zirkulierender Thrombozyten-PMN-Aggregate analysiert (n=4). Zirkulierende NET-Strukturen im Plasma wurden mit Hilfe eines Myeloperoxidase-DNA-ELISA quantifiziert. Zur Darstellung von NETs wurde eine Immunfluoreszenzfärbung angewandt. Um die PMN-Migration zu untersuchen, wurde die Lunge 4 Stunden nach *E. coli*-Instillation mit Agarose gefüllt, jeweils ein Lungenlappen geteilt und die PMN-Migration mittels eines Spinning-Disc-Mikroskops über 1 Stunde ex vivo visualisiert (n=3). Die ICAM1-Expression von MLMVECs (murine lung microvascular endothelial cells) wurde mittels qRT-PCR, Immunfluoreszenzfärbung und FACS-Analyse in vitro gemessen. Um den transzellulären Metabolismus in vitro zu untersuchen, wurden PMNs mit C¹⁴-markierter Arachidonsäure beladen und mit Thrombozyten inkubiert. Nach Stimulation mit ADP und fMLP wurde C¹⁴-TxB₂ (stabiler Metabolit von C¹⁴-TxA₂) detektiert (n=3). Die Cox1-Aktivität wurde analytisch bestimmt. Die statistische Signifikanz-

Bestimmung erfolgte mittels einfaktorieller ANOVA und anschließenden Student-Newman-Keuls-Tests oder t-Tests. Das Signifikanz-Niveau wurde bei p<0,05 festgesetzt. Alle Tierversuche wurden von der Tierschutzkommission genehmigt.

Ergebnisse

Zunächst zeigten wir, dass das von uns benutzte *E. coli*-induzierte Pneumoniemodell Thrombozyten- und TxA₂-abhängig ist. WT-Mäuse nach Blockade der Adhäsionsmoleküle PSGL-1 oder P-Selektin und Cox1^{-/-}-Mäuse, nicht jedoch Cox2^{-/-}-Mäuse, wiesen eine verminderte PMN-Rekrutierung in die Lunge, eine verminderte Thrombozyten-PMN-Interaktion, eine erhöhte Bakterienanzahl in der Lunge sowie eine verminderte NET-Formation auf (Abb. 1). Diese Veränderungen waren mit einer erhöhten Letalität im Vergleich zu WT-Mäusen nach *E. coli*-Instillation assoziiert (73% vs. 36%, p=0,02). In der Intravitalmikroskopie der Lunge konnte bei Cox1^{-/-}-Mäusen ebenfalls eine verminderte PMN-Rekrutierung und verminderte PMN-Thrombozyten-Interaktionen nachgewiesen werden. Ferner konnte mikroskopisch gezeigt werden, dass die Migrationsstrecke (19,7±1,4µm vs. 9,9±1,5µm, p=0,006) und die Migrationsgeschwindigkeit (0,44±0,056µm/m vs. 0,24±0,028µm/m, p=0,034) von Cox1-defizienten PMNs signifikant reduziert ist im Vergleich zu WT-PMNs. Cox1 in Thrombozyten, jedoch nicht Cox2, war für eine adäquate C¹⁴-TxA₂-Freisetzung

Abbildung 1



NET-Strukturen (rot) in der Lunge von WT-Mäusen (A) und Cox1^{-/-}-Mäusen (B). PMNs grün, Histone H3 rot, zelluläre DNA blau, Myeloperoxidase gelb.

nach Stimulation notwendig. Dieser Vorgang setzte die Bereitstellung von Arachidonsäure-Metaboliten aus PMNs voraus. Die Cox1-Aktivität wurde durch die Interaktion von Thrombozyten und PMNs in vitro erhöht. PSGL1- oder P-Selektin-Blockade verminderten die TxA₂-Synthese und Cox1-Aktivität in Thrombozyten. Des Weiteren war TxA₂

notwendig für die NET-Formation durch aktivierte PMNs und die ICAM1-Expression von murinen Endothelzellen in vitro und in vivo.

Interpretation

Die Ergebnisse zeigen, dass die direkte Interaktion mit PMNs über eine P-Selektin-Bindung an PSGL-1 für die Cox1-abhängige

TxA₂-Synthese in Thrombozyten erforderlich ist. Die hierfür notwendigen Arachidonsäure-Metabolite stammen aus PMNs und werden transzellulär zwischen PMNs und Thrombozyten ausgetauscht. Dies ist notwendig für eine adäquate TxA₂-Freisetzung aus Thrombozyten, die Bildung von NETs, die ICAM1-abhängige PMN-Rekrutierung in die Lunge und die effiziente Pathogen-Elimination im Rahmen bakterieller Pneumonien.

Literatur

1. Zarbock A, Singbartl K, Ley K: Complete reversal of acid-induced acute lung injury by blocking of platelet-neutrophil aggregation. *J Clin Invest* 2006;116:3211-3219.
2. Wiles M.E, Welbourn R, Goldman G, Hechtman H.B, Shepro D: Thromboxane-induced neutrophil adhesion to pulmonary microvascular and aortic endothelium is regulated by CD18. *Inflammation* 1991;15:181-199.
3. Ittner A, Block H, Reichel C.A, Varjosalo M, Gehart H, Sumara G, et al: Regulation of PTEN activity by p38delta-PKD1 signaling in neutrophils confers inflammatory responses in the lung. *J Exp Med* 2012;209:2229-2246.

Das Methylierungsmuster des AQP5-Promotors beeinflusst die AQP5-Expression in Immunzellen und die Prognose von Patienten mit Sepsis

K. Rump^{1,2} · S. Schäfer² · M. Unterberg¹ · M. Kreuzer¹ · A. Gronek² · L. Bergmann^{1,2} · S. Hahn⁴ · W. Siffert³ · J. Peters² · M. Adamzik^{1,2}

1 Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie, Universitätsklinikum Knappschaftskrankenhaus Bochum-Langendreer, Ruhr-Universität Bochum

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

3 Institut für Pharmakogenetik, Universität Duisburg-Essen

4 Abteilung für Molekulare Gastroenterologische Onkologie (MGO), Ruhr-Universität Bochum

Korrespondenz: Katharina.k.rump@rub.de

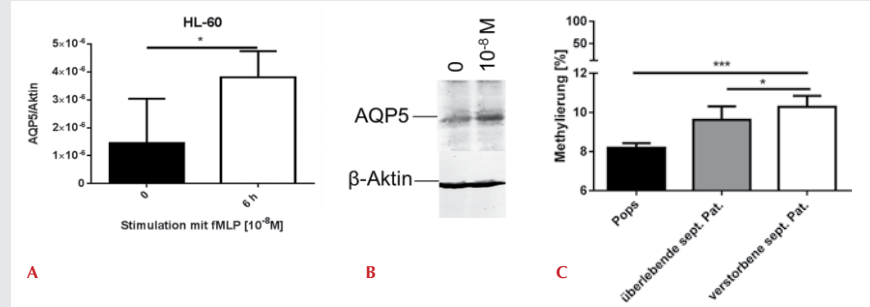
Fragestellung

Das C-Allel des funktionell wirksamen Aquaporin5-(AQP5)-A(-1364)C-Promotorpolymorphismus ist nicht nur mit geringerer AQP5-Expression [1], sondern auch mit geringerer Migration neutrophiler Granulozyten [2] und 30-Tage-Letalität bei schwerer Sepsis assoziiert [3]. Da AQP5-defiziente Mäuse zudem häufigeres Überleben nach Lipopolysaccharid (LPS)-induzierter Inflamationsreaktion im Vergleich zu Wild-Typ-Mäusen [2] zeigen, scheint die AQP5-Expression ein überlebensrelevanter Schlüsselmechanismus bei Sepsis zu sein. Unklar sind allerdings die regulierenden molekularen Mechanismen der AQP5-Transkription in der Sepsis. Da ein möglicher Mechanismus in der Promotor-Methylierung liegen könnte, testeten wir folgende Thesen: **1)** bakterielle Zellwandbestandteile wie fMLP beeinflussen die AQP5-Expression; **2)** die AQP5-Expression wird in Immunzellen über Promotor-Methylierung reguliert; **3)** bakterielle Zellwandbestandteile verändern das Methylierungsmuster des AQP5-Promotors; **4)** das Methylierungsmuster des AQP5-Promotors unterscheidet sich zwischen septischen und nicht-septischen, postoperativen Patienten; **5)** die Methylierung des AQP5-Promotors zwischen Überlebenden und Verstorbenen ist unterschiedlich.

Methoden und Ergebnisse

1) Zellen der Leukozytenzelllinie HL-60 (DSMZ, Braunschweig) wurden mit dem bakteriellen Zellwandbestandteil fMLP (10^{-6} M, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) inkubiert und nach 6 Stunden mittels qPCR (Qiagen, Hilden) und Western-Blot (Bio-Rad, München) analysiert. fMLP führte gegenüber Kontrollen zu einer mehr als 2-fach erhöhten AQP5-mRNA- und AQP5-Protein-Expression (Abb. 1a+b, $p=0,03$; $n=6$).

Abbildung 1



AQP5 mRNA- (A) und Proteinexpression (B) 6 h nach fMLP-Stimulation (10^{-6} M). (C) AQP5-Promotor-methylierung an Pos. -937 bei postoperativen Patienten ohne Sepsis ("Pops") sowie überlebenden und verstorbenen Patienten mit Sepsis (sept. Pat.).

2) Zellen der B-Lymphozytenzelllinie REH (CLS, Eppelheim) wurden für 3 Tage mit $50\mu\text{M}$ und anschließend für weitere 3 Tage nach Zellmediumwechsel mit $10\mu\text{M}$ des DNA-Methyltransferase-Inhibitors 5-Aza-2'-deoxycytidin (ADC, Sigma-Aldrich) inkubiert. Nach 6 Tagen ADC-Inkubation war die AQP5 Promotor-Methylierung (qPCR) um 25% reduziert ($p=0,03$; $n=3$) und ging mit einer um 30% gesteigerten AQP5-Expression ($p=0,04$; $n=3$) einher.

3) Die AQP5-Promotor-Methylierung wurde in der Monozytenzelllinie U937 (DSMZ) nach Inkubation (24h) mit LPS ($1\mu\text{g/ml}$, Sigma-Aldrich) quantifiziert (qPCR). LPS führte zu einer Reduktion der AQP5-Promotor-Methylierung um 12% ($p=0,006$; $n=3$), aber Verdopplung der AQP5-Proteinexpression.

4-5) Nach positivem Votum der Ethikkommission der Universität Duisburg-Essen wurden 100 postoperative und 100 Patienten mit Sepsis in eine Beobachtungsstudie eingeschlossen und DNA aus Vollblut isoliert, um die Methylierung des AQP5-Promotors von Position -571 bis -1081 (Pyrosequenzierung, Qiagen, Hilden) zu ermitteln. Zwar unterschied sich der Methylierungsgrad über den gesamten AQP5-Promotor zwischen septischen und nicht-septischen postoperativen Patienten nicht signifikant, jedoch wurden 4 Positionen (-860; -937; -940; -1013) detektiert, bei denen septische im Vergleich zu postoperativen Patienten eine stärkere Methylierung aufwiesen ($p<0,05$). Ferner war der Promotor an Position -937 bei verstorbenen septischen Patienten im Vergleich zu überlebenden oder postoperativen Patienten deutlich stärker methyliert (Abb. 1c, $p<0,05$). Eine In-silico-Analyse für die Region -920 bis -950 ergab, dass genau um die Position -937 wichtige Transkriptionsfaktoren für die Inflammation (NF κ B, HIF-1 α) und AQP5-Expression (CREB) binden. **Statistik:** Mittelwerte \pm Standardabweichung, Mann-Whitney-U-Test, ungepaarter t-Test, $p<0,05$.

Interpretation

Die AQP5-Expression in der Sepsis scheint auch durch Methylierungsprozesse am AQP5-Promotor reguliert zu werden, denn bakterielle Zellwandbestandteile wie LPS reduzieren in Zellkulturexperimenten nicht nur die Methylierung am AQP5-Promotor, sondern steigern auch die AQP5-Expression. Da die Gesamt-methylierung des AQP5-Promotors zwischen nicht septischen, postoperativen Patienten und Patienten mit schwerer Sepsis nicht unterschiedlich war, aber sich der Methylierungsgrad an nur wenigen Positionen unterschied, scheint die epigenetische Regulation der AQP5-Expression in der Sepsis durch wenige, aber hochspezifische Positionen vermittelt zu werden. Insbesondere die Methylierung an Position -937 scheint große Relevanz zu haben, da die Methylierung an Position -937 bei verstorbenen, septischen Patienten im Vergleich zu überlebenden oder postoperativen Patienten deutlich häufiger war. Ob die Methylierung an Position -937 Einfluss auf die AQP5-Promotoraktivität hat, wird gegenwärtig mit einem CpG-freien Vektor im Reporterassay getestet.

Literatur

- Adamzik M, Frey UH, Bitzer K, et al: A novel-1364A/C aquaporin 5 gene promoter polymorphism influences the responses to salt loading of the renin-angiotensin-aldosterone system and of blood pressure in young healthy men. *Basic Res Cardiol* 2008(11);103: 598-610.
- Rump K, von Busch A, Bergmann L et al: Der AQP5 A(-1364)C Promotorpolymorphismus und die AQP5-Expression beeinflussen die Letalität bei LPS-induzierter Inflammation und die Migration von Immunzellen. *Anästh Intensivmed* 2014;55:22-22.
- Adamzik M, Frey UH, Mohlenkamp S, et al: Aquaporin 5 gene promoter-1364A/C polymorphism associated with 30-day survival in severe sepsis. *Anesthesiol* 2011;04:912-919.

Aktivierung und Sensibilisierung des nozizeptiven Ionenkanals TRPA1 durch die Hauptmetaboliten von Metamizol

S. A. Schenk · F. Dick · M. Eberhardt · A. Leffler

Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin, Medizinische Hochschule Hannover

Korrespondenz: Schenk.Stefan@mh-hannover.de

Fragestellung

Metamizol (MM) ist aufgrund seiner hohen analgetischen Potenz sowie ausgeprägter Spasmyolyse und Antipyrese ein häufig eingesetztes Nicht-Opioid-Analgetikum. Die molekularen Wirkmechanismen dieser klinisch erwünschten Effekte von MM konnten bislang nur unvollständig aufgeklärt werden, wobei eine Hemmung der Zyklooxygenase (COX) durch die reaktiven Metaboliten 4-N-Methylaminoantipyrin (MAA) und 4-Aminoantipyrin (AA) als relevant für die analgetische Wirkung gilt [1]. Für Paracetamol wurde ebenfalls eine COX-Hemmung nachgewiesen, dessen analgetische und antipyretische Wirkung aber auch entscheidend durch eine Aktivierung des Ionenkanals TRPA1 durch reaktive Metaboliten von Paracetamol vermittelt werden soll [2]. In dieser Studie prüften wir die Hypothese, dass TRPA1 durch MM oder dessen Hauptmetaboliten modifiziert wird und somit auch für Effekte von Metamizol eine mögliche molekulare Zielstruktur darstellt.

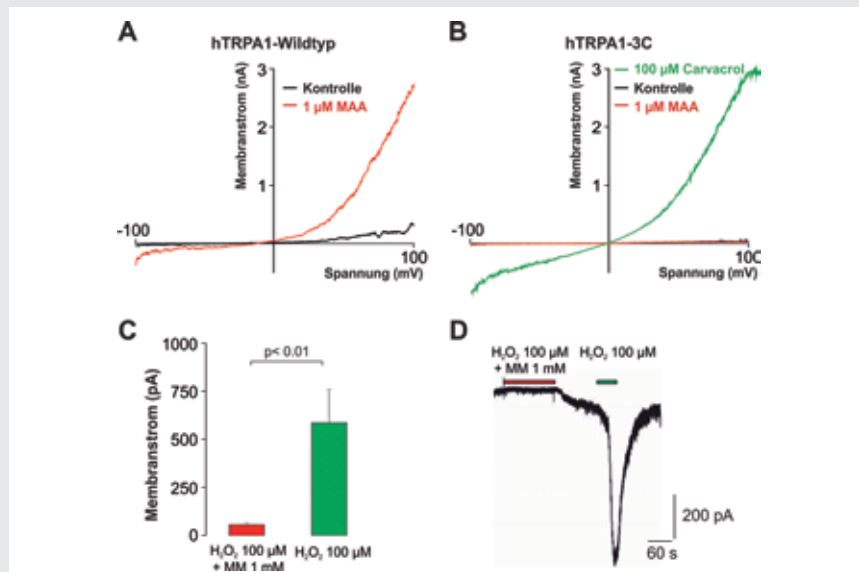
Methodik

An HEK-293-Zellen mit einer stabilen oder transienten Expression der humanen (h) Isoform von TRPA1 wurden Patch-Clamp-Experimente durchgeführt. Reinsubstanzen von MM sowie von dessen Hauptmetaboliten MAA, AA, 4-Formyl-Aminoantipyrin (FAA) sowie 4-Acetyl-Aminoantipyrin (ACAP) wurden von der Firma Sanofi-Aventis zur Verfügung gestellt. Datenverarbeitung und Statistik wurden mit der Origin-Software durchgeführt.

Ergebnisse

Während MM in Konzentrationen bis 1 mM nur minimale Effekte an hTRPA1 bewirkt, können bei Applikation des Metaboliten MAA in Konzentrationen zwischen 100 nM und 100 μ M Membranströme beobachtet werden (Abb. 1A für 1 μ M MAA). Obwohl sich diese Aktivierung als unabhängig von der verabreichten Konzentration darstellt, kann sie vollständig ($n=6$) durch den selektiven hTRPA1-Antagonisten HC-030031 (50 μ M) geblockt werden. In den gleichen Konzentrationen aktivieren auch die Metaboliten AA, FAA und ACAP hTRPA1, diese Effekte werden durch HC-030031 ebenfalls komplett inhibiert. Eine

Abbildung 1



A-B Membranströme von HEK-293-Zellen mit hTRPA1-Wildtyp- (**A**) und der hTRPA1-3C-Mutante (**B**). Die Ströme wurden während einer 500 ms langen Spannungsrampe zwischen -100 und +100 mV aufgenommen, entweder unter Applikation der Kontrolllösung oder 1 μ M MAA.

C Mittlere Spitzenamplituden von Membranströmen, induziert durch Applikation der Kombination H₂O₂ + MM (rot) und nachfolgend H₂O₂ alleine.

D Originale Stromspuren einer HEK-293-Zelle mit hTRPA1. Während es bei der Applikation von H₂O₂ + MM zu keiner Aktivierung von hTRPA1 kommt, induziert die alleinige Applikation von H₂O₂ einen schnellen und reversiblen Einwärtsstrom.

detaillierte Charakterisierung dieser agonistischen Wirkung an hTRPA1 erfolgte mit MAA. Neben einer direkten Aktivierung von hTRPA1 sensibilisiert 1 μ M MAA die Wirkung des TRPA1-Agonisten Carvacrol: Einwärtsströme mittels 100 μ M Carvacrol wurden durch MAA von 370 ± 174 pA auf 1.000 ± 364 pA erhöht ($n=7$; $p < 0.01$, gepaarter t-Test). 1 μ M MAA induziert auch in „On-Cell“-Messungen Membranströme über hTRPA1 ($n=4$). Dieser Effekt ist ein indirekter Hinweis für einen intrazellulären Wirkmechanismus von MAA, wie er für die Aktivierung von TRPA1 durch Oxidation intrazellulär lokalisierter Cysteinreste für viele reaktive TRPA1-Agonisten beschrieben wurde [3]. Bei einer Koapplikation von MAA mit dem Reduktionsmittel Dithiothreitol (DTT, 5 mM) induziert 1 μ M MAA keine Aktivierung von hTRPA1 ($n=5$). Ebenfalls verursacht die Applikation von 5 mM DTT eine schnelle Inaktivierung MAA-induzierter Membranströme ($n=5$). Die Wirkung von MAA wurde jetzt an der Kanalmutante „hTRPA1-3C“ untersucht, bei der drei Cysteinreste (C621, C641, C665) mit Serinresten ausgetauscht wurden. Die aktivierende Wirkung von MAA ist hier komplett aufgehoben, jene von Carvacrol jedoch erhalten ($n=5$; Abb. 1B). Obwohl für die Ausgangssubstanz MM keine direkten Effekte auf hTRPA1 festgestellt werden konnten, wurde die Eigenschaft von MM als „Scavenger“ reaktiver TRPA1-Agonisten wie H₂O₂ untersucht.

Während die Kombination von 100 μ M H₂O₂ und 1 mM MM nur kleine Einwärtsströme induziert (63 ± 14 pA), bewirkt die alleinige Applikation von H₂O₂ große Einwärtsströme (643 ± 14 pA, $n=7$; $p < 0.01$ gepaarter t-Test; Abb. 1C, D).

Interpretation

Klinisch relevante Konzentrationen der Hauptmetaboliten von MM aktivieren und sensibilisieren den Ionenkanal TRPA1. Diese Modifikation von hTRPA1 ist reversibel und wird durch eine Oxidation intrazellulär lokalisierter Cysteinreste vermittelt. MM selbst könnte auch anhand einer chemischen Modifikation reaktiver und endogen vorliegender TRPA1-Agonisten wie H₂O₂ die Aktivierung von hTRPA1 indirekt beeinflussen.

Literatur

1. Hinz B, Cheremina O, Bachmakov J, Renner B, Zolk O, Fromm MF, et al: FASEB J 2007;21:2343-2351
2. Andersson DA, Gentry C, Alenmyr L, Killander D, Lewis SE, Andersson A, et al: Nat Commun 2011;2:551
3. Hinman A, Chuang HH, Bautista DM, Julius D: Proc Natl Acad Sci USA. 2006 (19):103:19564-19568.

Repulsive Guidance Molecule A (RGM-A) fördert die Entzündungsresolution während einer experimentell induzierten murinen Peritonitis

M. Schlegel¹ · A. Körner¹ · S. Wiese¹ · M. Giera² · V. Mirakaj¹

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

² Center for Proteomics and Metabolomics, Leiden University Medical Center, Niederlande

Korrespondenz:

Martin.Schlegel@uni-tuebingen.de

Fragestellung

Die akute Entzündungsreaktion ist die Antwort des Organismus auf eine Schädigung der Integrität durch z.B. ein Trauma oder einen mikrobiellen Reiz. Dabei kommt es in der initialen Phase zu einer Einwanderung von Leukozyten ins geschädigte Gewebe. Die Elimination dieser Entzündungszellen ist von zentraler Bedeutung, um das Gewebe in Homöostase zurückzuführen. Diese sogenannte Resolution der Inflammation ist ein aktiver Prozess, der von spezialisierten Lipidmediatoren koordiniert wird [1,2]. Kriterien der Entzündungsresolution sind die Reduktion der proinflammatorischen Zytokine, die Verminderung der Einwanderung der polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) und die Stimulation der Makrophagen zur Phagozytose von apoptotischen PMN und inflammatorischem Material. Neuere Arbeiten konnten einen antiinflammatorischen Effekt des neuronalen Guidance Proteins „Repulsive Guidance Molecule A“ (RGM-A) in der Frühphase der akuten Inflammation zeigen [3]. Die Rolle von RGM-A im Rahmen der Entzündungsresolution ist bisher nicht bekannt.

Methodik

In vitro wurde die Phagozytose apoptotischer PMN durch Makrophagen nach Stimulation mit RGM-A untersucht. In Makrophagen wurde die Transkription der Resolvin-Rezeptoren ALX und GPR32 nach Stimulation mit RGM-A und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) mittels RT-PCR evaluiert (n=8-12). Die Tierversuchsgenehmigung des zuständigen Regierungspräsidiums lag vor. In vivo wurde in einem durch Zymosan A (ZyA) induzierten Peritonitis-Modell an Wildtyp (WT)- und Neogenin-Knock Out (KO)-Mäusen (ZyA +/- RGM-A Peptid) eine Zeitkinetik (4 h, 12 h, 24 h, 48 h) (n=7-10/ pro Gruppe und pro Zeitpunkt) durchgeführt. In einer weiteren Gruppe wurde das RGM-A-Peptid WT-Mäusen therapeutisch 4 h nach Zymosan A Gabe, zum Maximum der Inflammation, appliziert. Aus der gewonnenen Peritoneallavage wurden

zu den verschiedenen Zeitpunkten mittels Durchflusszytometrie die Rekrutierung und Differenzierung immunmodulatorischer und proresolutionärer Leukozyten sowie die Phagozytose der apoptotischen PMN untersucht. Zusätzlich wurden die proinflammatorischen Zytokinkonzentrationen von Interleukin (IL)-1 β , IL-6, TNF- α und keratinozyte-derived chemokine (KC) mittels ELISA gemessen. Die In-vivo-Versuche wurden mittels Student's t-Test, und die In-vitro-Versuche wurden mit einfaktorieller ANOVA und anschließender Bonferroni-Korrektur evaluiert.

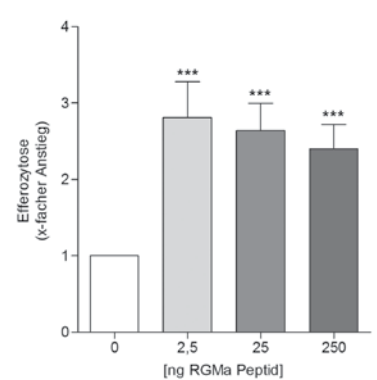
Ergebnisse

In vitro führte die Stimulation der Makrophagen mit RGM-A zu einem signifikanten Anstieg der Phagozytose apoptotischer PMN (Abb. 1). Die Transkription der Resolvin-Rezeptoren ALX und GPR32 wurde durch Stimulation mit TNF- α und RGM-A in Makrophagen signifikant erhöht. In vivo führte die Gabe des RGM-A sowohl prophylaktisch als auch therapeutisch nach Induktion der akuten Peritonitis zu einer signifikant reduzierten Leukozytenzahl im Peritoneum (Zellzahl $\times 10^7$ ZyA: 4 h $1,8 \pm 0,2$; 12 h $1,6 \pm 0,2$; 24 h $1,2 \pm 0,1$; 48 h $0,79 \pm 0,07$; RGMa-Peptid prophylaktisch: 4 h $1,1 \pm 0,1$ (**); 12 h $0,95 \pm 0,06$ (**); 24 h $0,81 \pm 0,02$ (*); 48 h $0,65 \pm 0,08$ (ns) RGMa-Peptid therapeutisch: 12 h $1,0 \pm 0,1$ (**); 24 h $0,9 \pm 0,08$ (**); 48 h $0,5 \pm 0,03$ (**); n=8-10; ** p<0,01, *p<0,05) und einer signifikanten Reduktion der PMN. Darüber hinaus führte in vivo die Applikation von RGM-A zu einer signifikanten Reduktion der klassischen inflammatorischen Ly6C^{hi}-Monozyten, einem signifikanten Anstieg der antiinflammatorischen Ly6C^{lo}-Monozyten und einer signifikant vermehrten Phagozytose von apoptotischen PMN. Auch die Konzentration der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6 und KC in der Peritoneallavage war nach prophylaktischer und therapeutischer Gabe signifikant reduziert. Bei Neogenin-KO-Mäusen führte die Gabe von RGM-A weder zu einer Reduktion der Inflammation mit Verminderung der Zellzahl und der Zahl neutrophiler Granulozyten noch zu einem Unterschied in der Differenzierung der pro- und antiinflammatorischen Monozyten oder einem Unterschied in der Efferozytose.

Interpretation

RGM-A reduziert die Zellzahl sowie die Expression der proinflammatorischen Zytokine während der akuten Peritonitis bei der Maus. RGM-A erhöht die Transkription der Resolvin-Rezeptoren auf Makrophagen, führt zu einer vermehrten Rekrutierung antiinflammatorischer Monozyten und erhöht die Efferozytose. Der Resolutionsindex zeigt eine Verkürzung der Resolutionsphase durch RGM-A. Diese RGM-A-vermittelten Effekte sind bei

Abbildung 1



RGM-A erhöht die Phagozytose apoptotischer PMN im In-vitro-Efferozytose-Assay (alle Daten als Mittelwert \pm SEM; n=11 pro Gruppe, ***p<0,001).

Neogenin-KO-Tieren nicht vorhanden. Demzufolge besitzt RGM-A antiinflammatorische, aber auch proresolutionäre Funktionen während einer experimentell induzierten murinen Peritonitis. Diese Wirkung scheint größtenteils über Neogenin vermittelt zu werden.

Literatur

1. Serhan CN, Savill J: Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol* 2005;6:1191-1197.
2. Serhan CN: Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature* 2014;510:92-101.
3. Mirakaj V, Brown S, Laucher S, Steinel C, Klein G, Kohler D, et al: Repulsive guidance molecule-A (RGM-A) inhibits leukocyte migration and mitigates inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:6555-6560.

Einfluss von freiem Häm auf Mikro-zirkulation und zelluläre Integrität der Leber unter Stressbedingungen

F. Schleser¹ · R.A. Seidel^{1,2} · S. Weis¹ · M. Clemens³ · S.H. Heinemann⁴ · M. Bauer¹

¹ Center for Sepsis Control and Care, Universitätsklinikum Jena

² Institut für Anorganische und Analytische Chemie, Friedrich-Schiller-Universität Jena

³ Department of Biological Sciences, University of North Carolina, Charlotte/USA

⁴ Institut für Biochemie und Biophysik, Friedrich-Schiller-Universität Jena & Universitätsklinikum Jena

Korrespondenz:

Franziska.Schleser@med.uni-jena.de

Fragestellung

Im Rahmen der Wirtsreaktion auf Infektionen kann es durch eine gesteigerte Hämolyse zur Akkumulation von Abbauprodukten des Hämoglobins sowohl im Blut als auch im Gewebe kommen. Erniedrigte Haptoglobin- bzw. Hämoexinspiegel, welche Hämoglobin und Häm detoxifizieren, sind mit einer schlechteren Prognose assoziiert [1]. Tierstudien haben gezeigt, dass die Konzentration von freiem Häm bei Sepsis auf ein Vielfaches des Plasmanormalwertes ansteigt [2]. Demzufolge können Hämoglobin, Häm und deren Abbauprodukte zur Schädigung beitragen, wobei die Signalwege noch nicht vollständig bekannt sind. Die Leber nimmt sowohl im Hämstoffwechsel als auch in der metabolischen Stressantwort eine Schlüsselfunktion ein. Daher untersuchten wir den Einfluss von freiem Häm auf die hepatische Mikro-zirkulation sowie die hepatozelluläre Integrität im gesunden und kranken Organismus.

Methodik

Das Modell der isoliert perfundierten Leber wurde zur Bewertung der hepatischen

Mikrozirkulation und hepatozellulärer Schädigungsmechanismen angewandt. Nach Genehmigung der zuständigen Behörde wurden männliche Wistar-Ratten entweder in einem nicht-rezirkulierenden System (n=4-5 pro Konzentration) für 10 min oder in einem rezirkulierenden für 60 min mit unterschiedlichen Dosen Hämin unter kontinuierlicher Messung des portalvenösen Drucks, und in ausgewählten Experimenten des Lebergewichts, perfundiert. Die Tiere wurden in drei Gruppen eingeteilt, wie folgt vorbehandelt und anschließend mit Hämin perfundiert: Kontrolle (keine Intervention; n=5), PCI (polymicrobial contamination and infection; 1,25 µl Faeces/g KG i.p., 24 Stunden vor Perfusion; Volumengabe 6 Stunden s.c. nach PCI Induktion; n=5), LPS (Lipopolysaccharid; 1 mg/kg KG i.p., 2 Stunden vor Perfusion; n=4). Des Weiteren wurde untersucht, ob die Verfügbarkeit von Albumin im Perfusat einen Einfluss auf die vasoaktiven Eigenschaften des Häms hat (n=4). Die In-vitro-Analyse zur hepatischen Gewebeschädigung und Zytotoxizität wurde mittels Laktatdehydrogenase (LDH)-Bestimmung quantifiziert. Für Zellkulturassays wurden parenchymatöse und nicht-parenchymatöse Leberzelllinien verwendet. Diese wurden unter Standardbedingungen kultiviert und mit Hämin, rekombinantem TNF-α und/oder Albumin stimuliert. Statistische Analysen wurden mittels Kruskal-Wallis (mit Post-hoc-Dunn's-Test) durchgeführt. Signifikante Unterschiede wurden bei p<0,05 angenommen.

Ergebnisse

Freies Häm (1,4 und 10 µM) verursachte in der isoliert perfundierten Rattenleber eine dosisabhängige Erhöhung des portalvenösen Drucks um 30-40 % (Abb.1 a). Sowohl Tiere mit einer Endotoxinämie als auch Tiere mit einer polymikrobiellen Sepsis zeigten während der Perfusion mit 10 µM Hämin keinen

Unterschied im portalvenösen Druckanstieg. Jedoch ließ sich eine deutliche Beeinflussung der parenchymatösen Zellschädigung im PCI-Modell nachweisen (Abb. 1 b). Die Sinusoide, insbesondere deren Perizyten, wurden durch Intravitalmikroskopie (Abb. 1 c) und Gravimetrie der Leber als verantwortliche Struktur für die Druckerhöhung identifiziert. Neben seiner vasokonstriktorischen Eigenschaft zeigte Häm auch eine zytotoxische Wirkung auf Sternzellen sowie auf Parenchymzellen. Dieser Effekt war noch ausgeprägter in Anwesenheit von TNF-α. Eine Neutralisation von Häm mit humanem Serumalbumin verhinderte sowohl eine Vasokonstriktion als auch eine Gewebsschädigung.

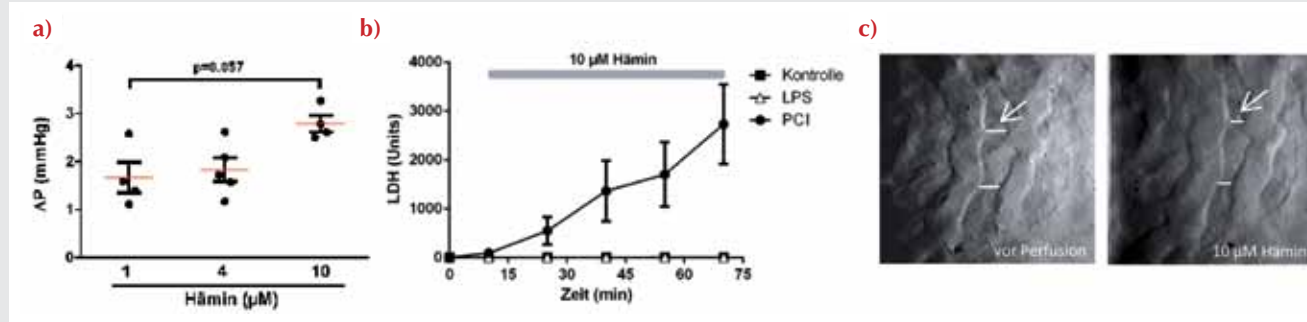
Interpretation

Häm spielt eine kritische Rolle in der Vermittlung des Gewebeschadens bei Sepsis. Häm führt in der Leber sowohl zu einer verminderten Perfusion als auch zu einer Gewebsschädigung, welche bei Sepsis potenziert ist. Die Verfügbarkeit von Albumin schützt die Leber vor Häm-vermittelter Toxizität und Mikro-zirkulationsversagen.

Literatur

1. Janz, et al: Association between haptoglobin, hemopexin and mortality in adults with sepsis. Critical Care 2013;17:R272; DOI: 10.1186/cc13108
2. Larsen, et al: A Central Role for Free Heme in the Pathogenesis of Severe Sepsis. Sci Transl Med 2, 51ra71 (2010); DOI: 10.1126/scitranslmed.3001118.

Abbildung 1



- (a) Änderung des portalvenösen Drucks (Mittelwert ± SEM dargestellt, n=4-5) in der isoliert perfundierten Rattenleber mit Hämin (1,4 und 10 µM).
 (b) LDH-Freisetzung in Perfusat während 60-minütiger Perfusion mit Hämin (10 µM); Mittelwert ± SEM. Kontrolle (n=5, keine Intervention), PCI (n=5, 1,25 µl Faeces/g KG 24 Std vor Perfusion), LPS (n=4, 1 mg/kg KG LPS 2 Std vor Perfusion).
 (c) Repräsentative intravitalmikroskopische Aufnahmen der Lebersinusoide einer Ratte vor und während Perfusion mit Hämin (10 µM).

TLR2-defiziente hämatopoetische Zellen vermitteln eine Reduktion der Neointima im vaskulären Heilungsprozess nach arterieller Gefäßverletzung

J. C. Severitt¹ · A. Butschkau² · L. Bierhansl¹ · B. Vollmar² · G. E. F. Nöldge-Schomburg¹ · 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

Die Bildung einer Neointima nach arterieller Gefäßverletzung stellt ein initiales Ereignis in der Entstehung atherosklerotischer Gefäßläsionen dar [1]. Zahlreiche Studien attestieren einer Defizienz für den Immunrezeptor Toll-like-Rezeptor 2 (TLR2) vaskuloprotektive Eigenschaften [2,3]. Ziel der vorliegenden Studie war es, die Bedeutung des TLR2 in der frühen Entstehungsphase der Atherosklerose zu untersuchen. Auch sollte der differentielle Beitrag zellulärer Mechanismen in der Gefäßwand im Vergleich zu denen am vaskulären Heilungsprozess beteiligten hämatopoetischen Stammzellen identifiziert werden.

Methodik

Nach Genehmigung gemäß Tierschutzgesetz wurden TLR2-defiziente (TLR2^{-/-}), Wildtyp (C57B6/J, WT), mit TLR2-blockierendem Antikörper (T2.5, 5 µg/g) behandelte WT- sowie TLR2^{-/-}/WT-chimäre Mäuse nach Knochenmarktransplantation (KMT) einer Gefäßverletzung der Art. carotis communis mittels

10%iger Eisenchlorid (FeCl₃)-Lösung unterzogen und neointimale Läsionen nach drei Wochen immunhistochemisch mittels Image-ProPlus Software analysiert. Glatte Muskelzellen (Smooth Muscle Cells, SMC) wurden durch Färbung von α -smooth muscle actin identifiziert. Hämatopoetische Stammzellen wurden anhand der Expression von CD117 (cKit) aus Knochenmark von TLR2^{-/-} und WT-Mäusen isoliert und deren Einfluss auf die migratorische Aktivität von SMC in In-vitro-Ko-Kultur-Assays untersucht. Statistik: Student's t-Test bzw. univariate Varianzanalyse und Bonferroni-Korrektur; Mean \pm SEM.

Ergebnisse

Drei Wochen nach Gefäßverletzung der A. carotis communis zeigten TLR2^{-/-}-Mäuse eine reduzierte Neointimabildung im Vergleich zu WT-Mäusen (Dicke [µm] P<0,01 bzw. Fläche [µm²] P<0,001, n=8; Abb. 1A, B). Dies war mit einer reduzierten Zahl eingewanderter glatter Muskelzellen in neointimale Läsionen (P<0,05, n=8) sowie reduzierter luminaler Stenose der A. carotis communis ([%] P<0,001, n=8) im Vergleich zu WT-Kontrolltieren assoziiert. Vergleichbare Ergebnisse auf den vaskulären Heilungsprozess ließen sich beim WT-Tier durch Applikation von TLR2-blockierenden Antikörpern erzielen (P<0,05, n=4). Bei WT/TLR2^{-/-}-Genotyp chimären Mäusen zeigte sich nach Transplantation von WT-Knochenmark bei TLR2^{-/-}-Tieren (KMT^{WT→TLR2^{-/-}}) ein mit KMT^{WT→WT}-Kontrolltieren vergleichbarer mit einer verstärkten Neointimabildung assoziierter Phänotyp (Abb. 2). Im Gegensatz dazu konnte die Transplantation TLR2^{-/-}-Knochenmarks bei WT-Tieren (KMT^{TLR2^{-/-}→WT}) den reduzierten vaskulären Heilungsprozess des WT-Tieres hin zu einer Vergleichbarkeit mit dem günstigen Phänotyp der KMT^{TLR2^{-/-}→TLR2^{-/-}}

Kontrolltiere beeinflussen (Neointimafläche, -dicke sowie luminaler Stenose P<0,05-0,001 in KMT^{TLR2^{-/-}→WT} vs. KMT^{WT→TLR2^{-/-}}, n=5). Erste Ergebnisse aus In-vitro-Ko-Kultur-Analysen deuten darauf hin, dass TLR2^{-/-} hämatopoetische Stammzellen im Vergleich zu knochenmarkstämmigen WT-Stammzellen eine reduzierte migratorische Aktivität glatter Muskelzellen vermitteln (P<0,05 vs. WT-Stammzellen, n=7).

Interpretation

Die Befunde der Studie deuten darauf hin, dass dem TLR2 eine entscheidende Rolle in der Entstehung neointimaler Läsionen nach arterieller Gefäßläsion zukommen könnte und bestätigen den für die vaskuläre Homöostase günstigen Phänotyp einer TLR2-Defizienz. Das Fehlen TLR2-vermittelter Signaltransduktion auf hämatopoetischen Zellen konnte im Gegensatz zu TLR2-Defizienz von Zellen der Gefäßwand als einer der Vermittler dieser günstigen Effekte identifiziert werden. Insgesamt deuten die Befunde auf eine zelluläre Interaktion hämatopoetischer Zellen mit der Gefäßwand hin. Eine therapeutische Modulation TLR2-vermittelter pro-inflammatorischer Signaltransduktion könnte somit einen Einfluss auf den vaskulären Heilungsvorgang ausüben, die Perfusion beeinflussen und langfristig die Gefahr einer Progression zur Atherosklerose reduzieren.

Literatur

1. Daniel JM, et al: Arterioscler Thromb Vasc Biol 2010;30:1890-1896
2. Lin E, et al: Cardiovasc Ther 2009;27:117-123
3. Lee GL, et al: Arterioscler Thromb Vasc Biol 2012;32:2751-60.

Abbildung 1 + 2

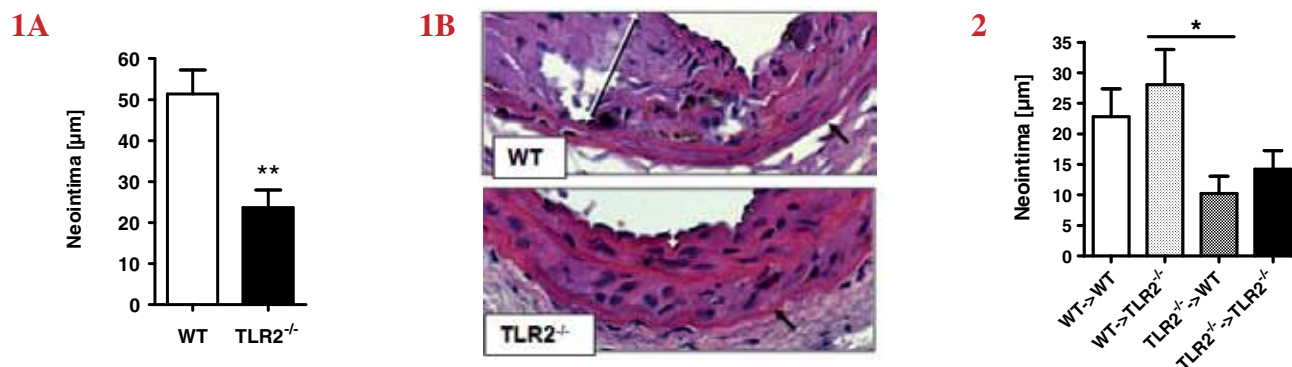


Abb. 1A Quantitative Darstellung der Neointimadicke von WT im Vergleich zu TLR2^{-/-}-Mäusen. **P<0,01, n=8. **Abb. 1B** Repräsentative Beispiele neointimaler Läsionen bei WT- und TLR2^{-/-}-Mäusen drei Wochen nach Gefäßläsion. **Weißer Pfeil:** Abstand Lumen/Lamina elastica interna (Intima/Neointima), **schwarzer Pfeil:** Lamina elastica externa. Hämatoxylin/Eosin-Färbung, Vergrößerung 1.000x. **Abb. 2** Quantitative Darstellung der Analysen der Neointimadicke bei WT/TLR2^{-/-}-chimären Mäusen nach Knochenmarktransplantation und Gefäßverletzung. *P<0,05, n=5.

Mitochondriale DNA ist ein Ligand des zytosolischen cGAS-STING-Signalwegs

F. Steinhagen¹ · S. Frede¹ · V. Hornung² · G. Baumgarten¹ · C. Bode¹

¹ Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin,

² Institut für Molekulare Medizin, Universitätsklinikum Bonn

Korrespondenz:

Folkert.Steinhagen@ukb.uni-bonn.de

Fragestellung

Als Auslöser perioperativer, steriler Entzündungsreaktionen gelten endogene Moleküle, die im Rahmen einer gestörten Zellintegrität freigesetzt werden und als „danger-associated molecular patterns“ (DAMPs) bezeichnet werden. Hierbei rückt mitochondriale DNA (mtDNA) als wichtiges DAMP zunehmend in den Fokus [1,2]. Bei abdominalchirurgischen oder orthopädischen Operationen konnten signifikant erhöhte Serumkonzentrationen von mtDNA nachgewiesen werden. Ferner wurde gezeigt, dass systemische mtDNA sowohl eine pulmonale Inflammation als auch eine Immunparalyse induzieren kann [1]. Wie genau mtDNA das Immunsystem moduliert, ist dabei unzureichend verstanden. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeiten mit bakterieller DNA (CpG-haltig) wurde bislang lediglich der endosomale Toll-like-Rezeptor 9 (TLR9) als Zielstruktur für mtDNA beschrieben [1,2]. Jedoch existieren weitere DNA-Sensoren, die einen potentiellen Rezeptor für mtDNA darstellen. So wurde jüngst über den zytosolischen DNA-Rezeptor „cyclic GMP-AMP-synthase“ (cGAS) berichtet, der nach Bindung doppelsträngiger DNA zu einer Aktivierung des STING-TBK1-IRF3-Signalwegs führt und die Induktion von Interferon- β (IFN- β) bedingt [3]. Hierbei wird STING durch das von cGAS generierte zyklische Di-Nukleotid GMP-AMP (cGAMP) direkt aktiviert. In der vorliegenden Studie bestand die Frage, ob mtDNA von cGAS erkannt und somit eine proinflammatorische Immunreaktion auslöst wird.

Methodik

mtDNA wurde aus humanen HepG2-Zellen isoliert und auf Endotoxin getestet. Humane THP-1-cGAS-KO-Zellen (Monozyten) wurden mittels dem CRISPR/Cas9-System generiert. THP-1-Wildtyp- und KO-Zellen wurden mit aufsteigenden mtDNA-Konzentrationen (0.125–2 μ g/ml) zytosolisch mittels Lipofektamin 2.000 transfiziert und für 2, 6 und 24 Stunden inkubiert. Als Kontrollen wurde doppelsträngige „hering testis“ DNA (HT-DNA), cGAMP (2'-5') sowie CpG-B verwendet. Die

Expression von IFN- β wurde per Real-Time-PCR (qPCR) bestimmt. Die Proteine IP-10 wurden im Überstand mittels Elisa gemessen. Mittels Western-Blot (WB) wurde die Aktivierung/Phosphorylierung von IRF3 bestimmt.

Ergebnisse

(1) Zytosolisch transfizierte mtDNA führte in THP-1-Zellen dosis- und zeitabhängig zu einer Induktion von IFN- β mit Gipfel nach 6 Stunden (bis zu 1.450-fach, Abb. 1A). Die Applikation gleicher Mengen (1 μ g/ml) von mtDNA und HT-DNA führte zu einer vergleichbaren Steigerung der Genexpression von IFN- β (310- vs. 390-fach, Abb. 1A), wobei eine Inkubation mit 10 μ g/ml CpG zu keiner Induktion von IFN- β führte.

(2) Nach 24 Stunden Stimulation mit zytosolischer mtDNA konnte das IFN-abhängige Protein IP-10 im Überstand von THP-1-Zellen nachgewiesen werden (815 \pm 84 pg/ml, n=3). (3) Nach Inkubation mit 2 μ g/ml mtDNA und HT-DNA ließ sich bereits nach einer Stunde aktiviertes IRF-3 (pIRF3) als Ausdruck einer Aktivierung des cGAS-STING Signalwegs mittels WB nachweisen.

(4) Nach Stimulation von cGAS-KO-Zellen mit mtDNA und HT-DNA war die IFN- β -Induktion im Vergleich zum Wildtyp mehr als 10-fach supprimiert. Um die Funktionalität der KO-Zellen zu testen, wurde mittels cGAMP ein Ligand verwendet, der „downstream“ von cGAS zur Aktivierung von STING führt. Hierbei zeigte sich keine Supprimierung der IFN- β -Induktion (Abb. 1B).

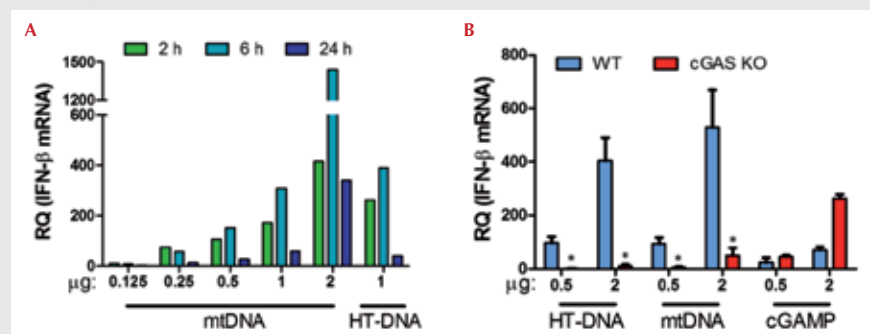
Interpretation

Erstmals konnte gezeigt werden, dass mtDNA zu einer Aktivierung der zytosolischen cGAS-STING-Signalkaskade mit konsekutiver Induktion von IFN- β führt. Somit beschreiben wir mit cGAS einen weiteren Sensor (neben TLR9), der die immunmodulatorischen Eigenschaften von mtDNA im Zytosol vermitteln kann. Da TLR9 beim Menschen im Gegensatz zur Maus nur in zwei Zelltypen funktionell exprimiert ist (B-Lymphozyten und plasmazytoiden dendritischen Zellen), könnte cGAS auch in anderen Zelltypen (hier exemplarisch Monozyten) eine mtDNA-abhängige Immunreaktion vermitteln. Somit könnte der durch mtDNA-induzierte cGAS-STING-Signalweg für die perioperative Immunreaktion von Bedeutung und therapeutischem Interesse sein.

Literatur

1. Zhang Q, et al: Nature 2010;464:104-7
2. Oka T, et al: Nature 2012;485:251-5
3. Lijun S, et al: Science 2013;339:786-91.

Abbildung 1



Zytosolisch transfizierte mtDNA induziert IFN- β abhängig von cGAS.

A) THP-1-Zellen wurden 2, 6 und 24 h mit ansteigenden Dosen zytosolisch transfizierter mtDNA inkubiert und anschließend die Expression von IFN- β mittels qPCR (normalisiert mit 18S rRNA) ermittelt. Dargestellt ist die relative Quantifizierung (RQ) im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen. Der Datensatz ist repräsentativ für vier unabhängige Versuche.

B) Zusätzlich wurde der Einfluss von cGAS (mittels KO-Zellen) auf die Expression von IFN- β nach 6 h Inkubation der angegebenen Liganden ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Versuchen \pm SEM. * p < 0.05 (t-Test).

Permeation des Lidocainderivates QX-314 durch die humanen Isoformen von TRPV1 und TRPA1 vermittelt eine Inhibition neuronaler Natriumkanäle und Zytotoxizität

T. Stüber · M. Eberhard · C. Hadamitzky · A. Jangra · S. Schenk · A. Leffler

Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin, Medizinische Hochschule Hannover

Korrespondenz:

Stueber.Thomas@mh-hannover.de

Fragestellung

Lokalanästhetika (LA) sind unselektive Inhibitoren aller bekannten spannungsabhängigen Natriumkanäle und ermöglichen daher keine selektive sensorische Blockade, die für periphere Nervenblockaden und die Therapie chronischer Schmerzen wünschenswert wäre. Eine Strategie zur Etablierung selektiver sensorischer Blockaden ist das Einschleusen membran-impermeabler Natriumkanalblocker durch die Kanalpore der beiden Ionenkanäle TRPV1 und TRPA1, die primär in nozizeptiven Nervenfasern exprimiert werden. Diese Strategie konnte mit dem nicht-membrangängigen Lidocainderivat QX-314 in murinen Modellen *in vivo* und *in vitro* bestätigt werden [1,2]. Die periphere Injektion von QX-314 im Rattenmodell führte allerdings zu einer ausgeprägten Neurotoxizität [3]. Die Bestätigung dieser Ergebnisse an den humanen (hTRP) Isoformen beider Ionenkanäle ist bisher ausstehend. In der vorliegenden Studie prüften wir die Hypothese, dass hTRPV1 und hTRPA1 eine Permeation von QX-314 in das Zytosol und damit eine Blockade von Natriumkanälen vermitteln. Darüber hinaus gingen wir der Frage nach, ob TRPV1 oder TRPA1 als molekulare Mechanismen an der QX-314-induzierten Zytotoxizität beteiligt sind.

Methodik

Als zelluläres Modell dienten HEK-293-Zellen mit einer stabilen Expression von hTRPA1 oder hTRPV1. Die Permeation von QX-314 (Chlorid) wurde mittels Patch-Clamp durch die frequenzabhängige Blockade (10 Hz) von Natriumströmen in Zellen mit dem neuronalen Natriumkanal Nav1.7 untersucht. Direkte Effekte von QX-314 an beiden TRP-Kanälen wurden durch Patch-Clamp und ratiometrisches Calcium-Imaging erfasst. Experimente zu zytotoxischen Eigenschaften von QX-314 erfolgten mittels durchflusszytometrischer Analyse nach Färbung mit Propidiumiodid und FITC-Annexin V.

Abbildung 1+2

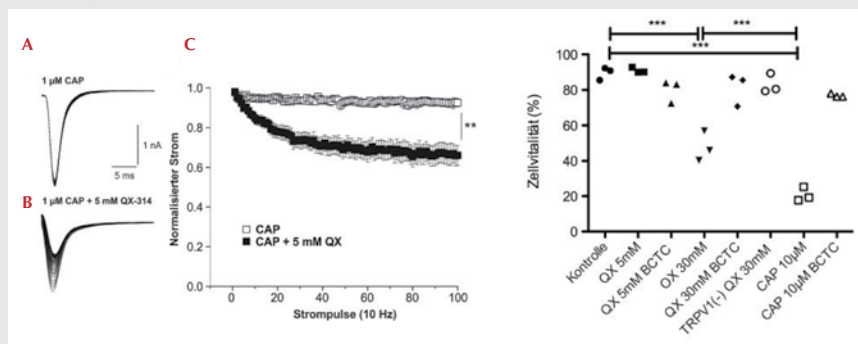


Abb. 1: Frequenzabhängige Blockade von Nav1.7 in HEK293-Zellen mit hTRPV1 nach Applikation von Capsaicin (CAP) (A) und von Capsaicin + 5 mM QX-314 (B). Zellen wurden bei -120 mV gehalten und Einwärtsströme mit 10 Hz aktiviert. (C) Mittlerer frequenzabhängiger Block während 100 Stimpulsen bei 10 Hz ohne und mit 5 mM QX-314. ** $p < 0,01$.

Abb. 2: Zellvitalität in HEK293-Zellen mit und ohne (-) hTRPV1. Inkubation mit QX314, Capsaicin sowie dem TRPV1-Antagonisten BCTC (10 µM) für 15 min. 24h nach Applikation Anfärbung und FACS-Analyse ($n = 3$). *** $p < 0,001$.

Ergebnisse

Die externe Applikation von 5 und 30 mM QX-314 auf Zellen ohne TRP-Expression führt zu keiner Natriumkanalblockade. In hTRPV1-Zellen induzierte die Co-Applikation des TRPV1-Agonisten Capsaicin (1 µM) mit QX-314 (5 mM) eine signifikante Natriumkanalblockade im Vergleich zu Capsaicin alleine ($33\% \pm 5\%$ versus $7\% \pm 2\%$ Block, $n = 13$; $p < 0,01$ Kruskal-Wallis/Dunn; Abb. 1). Ähnlich induzieren der TRPA1-Agonist Carvacrol (200 µM) mit 5 mM QX-314 eine Natriumstromreduktion in hTRPA1-Zellen ($32\% \pm 3\%$ versus $2\% \pm 2\%$ Block durch Carvacrol alleine, $n = 9$; $p < 0,001$ Kruskal Wallis/Dunn). Entgegen Studien an murinen Spinalganglienzellen vermittelt 5 mM QX-314 auch ohne TRP-Kanal Agonisten eine signifikante Natriumkanalblockade über hTRPA1 ($40\% \pm 7\%$, $n = 7$ Kruskal Wallis/Dunn). Als Mechanismus dieser Agonisten-unabhängigen Permeation von QX-314 konnte eine Direktaktivierung beider hTRP-Kanäle durch QX-314 in Patch-Clamp- und Calcium-Imaging-Experimenten festgestellt werden. 30 mM QX-314 induziert ebenso wie 10 µM Capsaicin zytotoxische Effekte über hTRPV1, die durch den TRPV1-Blocker BCTC inhibiert werden (ANOVA und Tukey-Test, $n = 3$, $p \leq 0,001$, Abb. 2). Im Gegensatz zum TRPA1-Agonisten Acrolein induziert 30 mM QX-314 eine geringfügige Zytotoxizität in hTRPA1-Zellen, die durch den TRPA1-Antagonisten HC-030031 (50 µM) nicht beeinflusst wird. Lidocain induziert im Unterschied zu QX-314 eine TRP-unabhängige Zytotoxizität.

Interpretation

Die humanen Isoformen von TRPV1 und TRPA1 sind permeabel für QX-314 und ermöglichen damit eine Natriumkanalblockade durch membran-impermeable Substanzen. Hierfür ist im Gegensatz zu murinen TRP-Isoformen keine Porenöffnung durch klassische Agonisten notwendig, da QX-314 selbst sowohl hTRPA1 als auch hTRPV1 direkt aktiviert. Die QX-314-induzierte Zytotoxizität wird vorwiegend durch hTRPV1 vermittelt.

Literatur

1. Binshtok AM, Bean BP, Woolf CJ: Inhibition of nociceptors by TRPV1-mediated entry of impermeant sodium channel blockers. *Nature* 2007;449:607-610
2. Peters CM, Ririe D, Houle TT, Aschenbrenner CA, Eisenach JC: Nociceptor-selective peripheral nerve block induces delayed mechanical hypersensitivity and neurotoxicity in rats. *Anesthesiology* 2014;120:976-986
3. Roberson DP, Gudes S, Sprague JM, Patoski HA, Robson VK, Blas F, et al: Activity-dependent silencing reveals functionally distinct itch-generating sensory neurons. *Nature Neuroscience* 2013;16:910-918.

Suppression der zellulären Inflammation als Mechanismus der AT1-vermittelten Verringerung des posttraumatischen Hirnschadens im Modell der Maus

R. Timaru-Kast¹ · S. P. Coronel-Castello^{1,2} · A. V. Hugonnet¹ · C. Gözl¹ · T. Krämer¹ · A. Sebastiani¹ · M. K.E. Schäfer^{1,2} · 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

Die Inhibition der Angiotensin-II-Typ-1-Rezeptoren (AT1) führt nach experimentellem Schädel-Hirn-Trauma (SHT) zu einer Reduktion des sekundären Hirnschadens und der zerebralen Inflammation [1]. Die zugrundeliegenden Mechanismen der über AT1-Inhibition vermittelten Neuroprotektion sind nicht endgültig geklärt. Neben intrazellulären und zerebrovaskulären protektiven Effekten reduziert die AT1-Hemmung die zerebrale Invasion neutrophiler Granulozyten [2]. Ziel der aktuellen Studie ist es, die Modulation der zellulären Immunantwort als möglichen Mechanismus der neuroprotektiven Wirkung der AT1-Inhibition nach SHT zu charakterisieren. Hierfür wurde zunächst der Stellenwert neutrophiler Granulozyten (Studie A) und der Lymphozyten (Studie B) für den Hirnschaden nach SHT ermittelt. Danach wurde die Wirkung der AT1-Inhibition über neutrophile Granulozyten (Studie C) und über Lymphozyten (Studie D) auf Hirnschaden und Neuroinflammation untersucht.

Methodik

Nach Zustimmung der Tierschutzkommission wurden männliche C57B6-Mäuse in Behandlungsgruppen randomisiert (n=12/Gruppe) und unter Anästhesie einer kontrollierten kortikalen Kontusion (CCI) unterzogen. In den Studien A und C wurde vor CCI eine Neutropenie mittels spezifischen Antikörpers induziert (antiLy6G; ND), im Vergleich zu entsprechendem Kontrollantikörper (IgG2A3; ctrl). In den Studien B und D wurden RAG1-Knockout-Mäuse (recombination-activating gene; RAG) im Vergleich zu Wildtypmäusen untersucht. RAG1-defiziente Mäuse besitzen keine muren B- und T-Lymphozyten. In den Studien C und D erhielten die Tiere zusätzlich den spezifischen AT1-Blocker Candesartan (0,1mg/kg) oder die Trägerlösung subkutan, 30 min, 24 und 48 h nach SHT. Dabei wurde

peri- und postoperativ der Blutdruck kontrolliert. 24 Stunden (Studien A, B) bzw. 3 Tage (Studien C, D) nach CCI wurden Differentialblutbild und zerebrales Kontusionsvolumen (Nissl-Färbung), zusätzlich in Studien C und D die perikontusionale Aktivierung der Mikroglia (Iba1-Färbung) sowie die Genexpression der Zytokine IL1 β und IL6 mittels quantitativer Real-time-PCR bestimmt.

Statistik: Mann-Whitney Rangsummentest für paarweise Vergleiche und Korrektur nach Bonferroni-Holm bei Mehrfachtestung, $p < 0,05$.

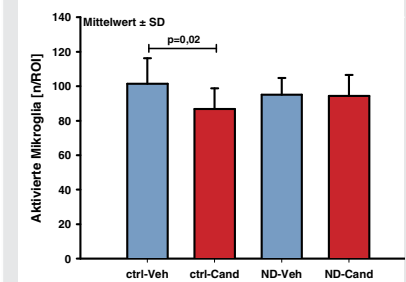
Ergebnisse

Studien A, B: Sowohl bei neutropenen als auch bei RAG-Mäusen kam es zu einer Reduktion des Hirnschadens gegenüber Wildtypmäusen 1 Tag nach SHT ($29,2 \pm 2,8$ vs. $43,6 \pm 7,8$ mm³ sowie $27,1 \pm 4,1$ vs. $32,4 \pm 5,6$ mm³; $p < 0,05$). Studien C, D: Die niedrigdosierte Candesartanbehandlung beeinflusste weder perin noch postoperativ den Blutdruck. Studie C: Candesartan behandelte nicht-neutropene Kontrollmäuse wiesen 3 Tage nach SHT ein reduziertes Kontusionsvolumen (ctrl-Cand: $24,0 \pm 3,3$ mm³, ctrl-Veh: $27,1 \pm 3,0$ mm³; $p < 0,05$), eine geringere Anzahl aktivierter Mikroglia (Abb. 1) und niedrigere IL6-Expression im Vergleich zu Vehikel-Kontrolltieren auf. Bei neutropenen Mäusen beeinflusste die AT1-Inhibition weder das Ausmaß des Hirnschadens (ND-Cand: $25,8 \pm 4,9$ mm³ ND-Veh: $25,0 \pm 5,4$ mm³) noch die Aktivierung der Mikroglia und Zytokinexpression im Vergleich zur neutropenen Vehikelgruppe. Studie D: Vehikel-behandelte RAG-Mäuse wiesen ein signifikant größeres Kontusionsvolumen (RAG-Veh: $32,2 \pm 4,6$ mm³, RAG-Cand: $26,1 \pm 4,1$ mm³; $p < 0,05$) und eine vermehrte Mikrogliaaktivierung (Abb. 2) nach 3 Tagen im Vergleich zu Candesartan-behandelten RAG-Tieren auf. Die Zytokinexpression zeigte keine Unterschiede.

Interpretation

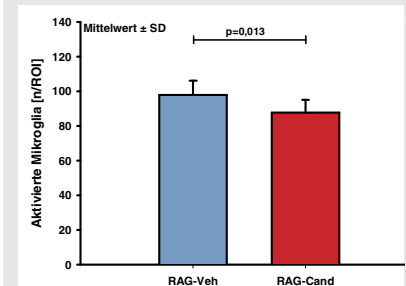
Analog zu vorherigen Untersuchungen konnte die aktuelle Studie zeigen, dass die Depletion neutrophiler Granulozyten neuroprotektiv nach SHT ist, möglicherweise über eine geringere Bildung reaktiver Sauerstoffspezies [3]. Der protektive Effekt bei RAG-Tieren konnte erstmals nach CCI gezeigt werden. Im Gegensatz zu nicht deplierten Wildtyp- und RAG-Mäusen führte die AT1-Inhibition bei neutropenen Mäusen zu keiner Reduktion des sekundären Hirnschadens und der aktivierten Mikroglia. Dieses deutet darauf hin, dass die neuroprotektive Wirkung der AT1-Blockade über neutrophile Granulozyten vermittelt wird. Da die AT1-Inhibition

Abbildung 1



Die perikontusionale Aktivierung der Mikroglia wurde in Iba1-gefärbten Schnitten bestimmt (ROI: $0,52 \times 0,65$ mm²). In Kontrolltieren führte die AT1-Inhibition 3 Tage nach SHT zu einer Reduktion der Mikrogliaaktivierung im Vergleich zu Vehikel-behandelten Kontrollmäusen (ctrl-Cand vs. ctrl-Veh, $p < 0,05$). Nach Depletion der neutrophilen Granulozyten (ND) beeinflusste die AT1-Inhibition nicht die Mikroglia-Aktivierung.

Abbildung 2



Die AT1-Inhibition reduziert signifikant die perikontusionale Aktivierung der Mikroglia bei lymphopenen RAG1-defizienten Mäusen (RAG; ROI: $0,52 \times 0,65$ mm²; $p < 0,05$).

bei RAG-Mäusen, d.h. ohne mature B- und T-Lymphozyten, weiterhin protektiv wirkte, scheint der neuroprotektive Effekt der AT1-Blockade unabhängig von der lymphozytären Immunantwort zu sein. Die vorliegenden Ergebnisse deuten deshalb darauf hin, dass die protektive Wirkung einer AT1-Inhibition nicht nur direkt zerebral antiinflammatorisch, sondern peripher über eine Modulation neutrophiler Granulozyten vermittelt wird.

Literatur

1. Timaru-Kast R, et al: Crit Care Med 2012;40(3):935-944
2. Benicky J, et al: Neuropsychopharmacol 2011;36(4):857-70
3. Kenne E, et al: J Neuroinflamm 2012;9:17.

Die topische Applikation von Nitroglycerin (NO) oder Iloprost (PGI₂) verbessert die Oxygenierung der gastralen Mukosa während milder Hämorrhagie an Hunden

R. Truse¹ · A. Weber² · I. Bauer¹ · O. Picker¹ · C. Vollmer¹

- 1 Klinik für Anästhesiologie, Universitätsklinikum Düsseldorf
- 2 Institut für die Biochemie der Pflanzen, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Korrespondenz:

richard.truse@med.uni-duesseldorf.de

Fragestellung

Die topische Therapie, z.B. die Applikation von Prostaglandinen zur regionalen Vasodilatation bei pulmonaler Hypertonie [1], ist bereits an einzelnen Organen etabliert. Ob diese Therapieform auch zur Behandlung von regionalen Perfusions- und Oxygenierungsstörungen des Gastrointestinaltrakts geeignet ist, wie sie z.B. im septischen oder hämorrhagischen Schock vorliegen [2], ohne dabei systemisch unerwünschte Wirkungen auszulösen, ist bislang unbekannt. Ziel dieser Studie war es daher, erstmals zu untersuchen, welchen Einfluss lokal appliziertes Iloprost (PGI₂-Analogon) oder Nitroglycerin (NO-Donator) auf die mikrozirkulatorische Perfusion (μ flow) und Oxygenierung (μ HbO₂) der gastralen und oralen Mukosa unter physiologischen Bedingungen und während eines hämorrhagischen Schocks hat.

Methodik

Nach Genehmigung durch die zuständige Behörde wurden die Experimente an fünf anästhesierten, beatmeten, weiblichen Foxhounds in wiederholter, randomisierter Reihenfolge im Abstand von mindestens 14 Tagen (6 Gruppen, n=5 pro Gruppe) durchgeführt. Die Tiere erhielten gastral 25 μ g/kg Nitroglycerin (NO) als Bolus (2 ml/kg), gefolgt von einer oralen und gastralen Dauerinfusion (8,3 μ g/kg/min, Infusionsrate: oral 0,66 ml/kg/h; gastral 2 ml/kg/h), bzw. gastral 100 ng/kg Iloprost-(PGI₂)-Bolus (2 ml/kg), gefolgt von 30 ng/kg/min (Infusionsrate: oral

0,66 ml/kg/h; gastral 2 ml/kg/h) und in der Kontrollgruppe physiologische Kochsalzlösung (2 ml/kg, gefolgt von 2 ml/kg/h), jeweils mit oder ohne nachfolgende milde Hämorrhagie (Entzug von 20% des Blutvolumens für 60 min) sowie anschließende Retransfusion des entnommenen Blutes. Die orale und gastrale μ HbO₂ sowie Flussrate (μ flow) und -geschwindigkeit (μ velo) wurden mittels Reflexionsspektrofotometrie bzw. Laser-Doppler (O2C, LEA Medizintechnik, Gießen) erfasst und kontinuierlich aufgezeichnet. 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, Two-Way-ANOVA + Dunnett für multiple Vergleiche ($p < 0,05$).

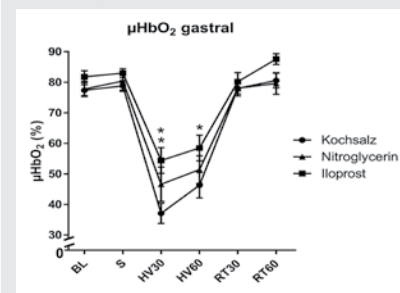
Ergebnisse

Die lokale Applikation von NO, nicht aber von PGI₂, erhöhte unter physiologischen Bedingungen den gastralen μ flow von 95 ± 12 aU auf 141 ± 24 aU ($p < 0,05$). Die μ HbO₂ blieb unter beiden Substanzen unverändert. Unter Hämorrhagie fiel die gastrale μ HbO₂ in der Kontrollgruppe von $78 \pm 2\%$ auf $37 \pm 3\%$ ($p < 0,05$) ab. Im Gegensatz dazu fiel die μ HbO₂ im Schock unter Gabe von Nitroglycerin lediglich von $80 \pm 2\%$ auf $47 \pm 6\%$ ($p < 0,05$) und unter Iloprost von $82 \pm 1\%$ auf $54 \pm 4\%$ ($p < 0,05$) und war in beiden Gruppen signifikant höher als in der Kontrollgruppe (Abb. 1). Oral war dieser Effekt nicht nachweisbar. Die mikrozirkulatorische Flussrate und -geschwindigkeit fielen im Schock in allen Gruppen gleichartig ab. Unabhängig von den regionalen Effekten unterschieden sich die systemischen Kreislaufvariablen nicht zwischen den Gruppen. HZV und DO₂ fielen unter Hämorrhagie in allen Gruppen gleichartig ab.

Interpretation

Unter physiologischen Bedingungen scheint weder lokal appliziertes NO noch PGI₂ die Oxygenierung (μ HbO₂) der Mund- oder Magenschleimhaut zu beeinflussen. Lediglich NO führt im Magen unter diesen Bedingungen zu einer lokalen Vasodilatation (μ flow).

Abbildung 1



Hämoglobinoxxygenierung (μ HbO₂) unter Ausgangsbedingungen (BL), +/- Nitroglycerin/Iloprost (S), Hypovolämie (HV) und Retransfusion (RT) für 30 bzw. 60 min; * = $p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe.

Im Gegensatz dazu wird unter Hämorrhagie die Oxygenierung der gastralen Mukosa sowohl durch lokale NO- als auch PGI₂-Applikation verbessert. Bei gleichermaßen vermindertem regionalem O₂-Angebot im Schock könnte dies auf einen reduzierten regionalen O₂-Verbrauch durch NO oder PGI₂ hindeuten, z.B. über eine Hemmung der mitochondrialen Atmungskette, wie bereits für NO beschrieben [3]. Demnach kann durch topische Therapie die mikrozirkulatorische Perfusion (μ flow) und Oxygenierung (μ HbO₂) der gastralen Schleimhaut moduliert werden.

Finanzierung

Die Studie wurde gefördert durch den Strategischen Forschungsfonds der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Antrag-Nr. 1229).

Literatur

1. Olschewski H, Simonneau G, Galiè N, Higenbottam T, Naeije R, Rubin LJ: Inhaled Iloprost for severe pulmonary hypertension. N Engl J Med 2002;347:322-329
2. Jakob SM, Takala J: Gut perfusion in the critically ill. Intensive Care Med 2000;26:813-815
3. Torres J, Darley-Usmar V, Wilson MT: Inhibition of cytochrome c oxidase in turnover by nitric oxide: mechanism and implications for control of respiration. Biochem J 1995;312:169-173.

Argon vermittelt in vitro in neuronalen Zellen zytoprotektive Effekte über den Toll-like-Rezeptor 4

F. Ulbrich · F. Wellner · H. Buerkle · T. Loop · U. Goebel

Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin, Universitätsklinikum Freiburg

Korrespondenz:

felix.ulbrich@uniklinik-freiburg.de

Fragestellung

Traumatische und ischämische Schädigungen des Zentralnervensystems sind mit einer hohen Letalität und häufig mit einem neurologischen Defizit assoziiert [1]. Da Neurone in vivo nach zerebraler Ischämie vermehrt Toll-like-Rezeptoren ausbilden [2] und das Edelgas Argon nach eigenen Ergebnissen neuroprotektive Effekte besitzt, die über eine Hemmung des Transkriptionsfaktors NF- κ B vermittelt werden [3], haben wir die Hypothese aufgestellt, dass anti-apoptotische Effekte von Argon über den Toll-like-Rezeptor 4 und über den Transkriptionsfaktor NF- κ B vermittelt werden.

Methodik

In neuronalen SH-SY5Y-Zellen wurde zunächst die Apoptose mittels Rotenon (Ro) (20 μ M für 4h) induziert und anschließend Argon (Ar) (Ar 75 Vol%, 21% O₂, Rest N₂ für 2h) appliziert. Die Apoptose wurde durchflusszytometrisch nach AnnexinV/Propidiumjodid (AV/PI)-Färbung quantifiziert. Die NF- κ B-Phosphorylierung und die Toll-like-Rezeptor 4 (TLR4)-Proteinexpression wurden mittels Western-Blot und die NF- κ B-Aktivierung mittels Reporter-Gen-Assay analysiert. Die pharmakologische Inhibition von TLR4 erfolgte mit TAK-242 (3 μ M) 30 min vor der Rotenon-Inkubation. Die Messwerte wurden statistisch durch eine Varianzanalyse (ANOVA mit Post-hoc-SNK-Test) verglichen (Signifikanzniveau $p < 0,05$; Mittelwerte \pm Standardabweichung).

Ergebnisse

Argon inhibierte die Rotenon-induzierte Apoptose (Abb. 1; Kontrolle $8.6 \pm 1.3\%$ vs. Ro $19.4 \pm 0.7\%$ vs. Ro+Ar $13.1 \pm 1.4\%$, ***= $p < 0.001$). Argon hemmte sowohl die Phosphorylierung (Abb. 2; Kontrolle 0.43 ± 0.06 vs. Ro 0.85 ± 0.24 vs. Ro+Ar 0.44 ± 0.16 ; ***= $p < 0.001$) als auch die transkriptionelle Aktivierung von NF- κ B (Abb. 3; Kontrolle 0.15 ± 0.014 vs. Ro 0.27 ± 0.013 vs. Ro+Ar 0.174 ± 0.018 ; ***= $p < 0.001$). Argon verminderte die Rotenon-induzierte TLR4-Expression signifikant (Abb. 4; Kontrolle 0.74 ± 0.15 vs. Ro 0.98 ± 0.35 ; *= $p < 0.05$; Ro 0.98 ± 0.35 vs. Ro+Ar 0.43 ± 0.18 ; **= $p < 0.01$). TAK-242 hob sowohl die Argon-vermittelte

Abbildung 1-4

Abb. 1

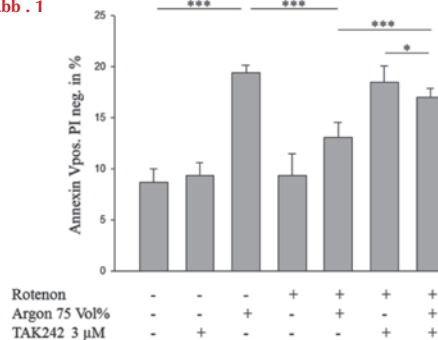


Abb. 2

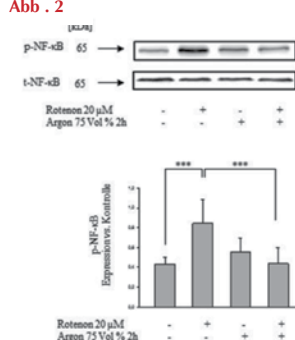


Abb. 3

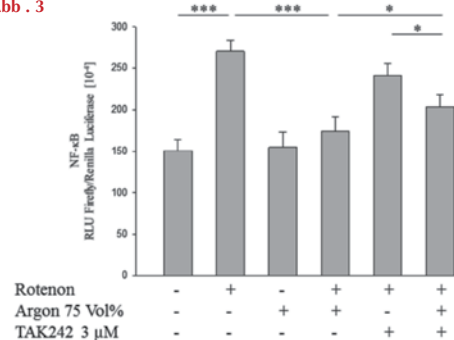
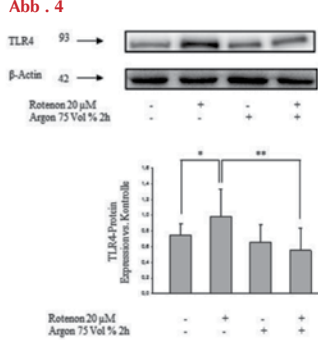


Abb. 4



Reduktion der NF- κ B-Aktivierung (Abb. 3; Ro+Ar 0.174 ± 0.017 vs. TAK-242+Ro+Ar 0.204 ± 0.014 *= $p < 0.05$) als auch die anti-apoptotischen Effekte von Argon auf (Abb. 1: Ro+Ar $13.1 \pm 1.4\%$ vs. TAK-242+Ro+Ar $17.0 \pm 0.9\%$; ***= $p < 0.001$).

Interpretation

Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass auf molekularer Ebene die anti-apoptotischen Effekte von Argon über eine Reduktion der TLR4-Expression und eine daraus resultierende, verminderte NF- κ B-Aktivität vermittelt werden.

Literatur

1. Ng JL, et al: Anesthesiology 2011;115:879-890
2. Tang SC, et al: Proc Natl Acad Sci USA 2007;104:13798-803
3. Ulbrich F, et al: PLo ONE 2014;9:e115984.

Der Aquaporin-5-Gen-Promotor A(-1364)C-Polymorphismus ist mit dem akuten Nierenversagen nach schwerem „acute respiratory distress syndrome“ (ARDS) assoziiert

M. Unterberg¹ · S. Schäfer¹ · K. Rump^{1,3} · W. Siffert² · J. Peters¹ · M. Adamzik^{1,3}

¹ Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin, Universitätsklinikum & Universität Duisburg-Essen

² Institut für Pharmakogenetik, Universität Duisburg-Essen

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

Korrespondenz:

Matthias.Unterberg@kk-bochum.de

Fragestellung

Die große interindividuelle Variabilität des Krankheitsverlaufs beim schweren, akuten Lungenversagen lässt sich durch bekannte Risikofaktoren nicht hinreichend erklären. Vielmehr scheinen auch genetische Faktoren Krankheitsverlauf und Letalität zu beeinflussen. Da das C-Allel des funktionell wirksamen Aquaporin5 (AQP5) A(-1364)C-Promotorpolymorphismus nicht nur mit geringerer AQP5-Expression [1], geringerer Migration von neutrophilen Granulozyten [1] und geringerer 30-Tage-Letalität bei schwerer Sepsis assoziiert [2] ist, testeten wir die Hypothese, dass der SNP A(-1364)C im AQP5-Promotor mit Krankheitsverlauf und Letalität bei schwerem ARDS assoziiert ist.

Methodik

Nach Votum durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät zu Essen wurden 143 Patienten (Alter: 43 Jahre \pm 15 (Mittel-

wert \pm Standardabweichung; $p=0,55$, Welch-Test); 81 Männer, 62 Frauen) mit schwerem ARDS eingeschlossen. Bronchoalveoläre Lavagen (BAL) wurden innerhalb der ersten 24-48 h nach Aufnahme und Erfüllung der ARDS-Kriterien standardisiert durchgeführt. Protein- und Albuminkonzentration (Biuret-Methode) sowie LDH-Aktivität wurden im BAL-Überstand gemessen. Die Patienten wurden weitgehend standardisiert im Bezug auf Flüssigkeits- und Katecholamintherapie sowie Nierenersatztherapie behandelt. Neben Flüssigkeitsbilanz und Laborvariablen wurde zur Beurteilung der Nierenfunktion über 30 Tage täglich der AKIN-Score [3] bestimmt. Zudem wurde aus Vollblut DNA extrahiert und bezüglich des AQP5 A(-1364)C-Polymorphismus genotypisiert [2].

Ergebnisse

Der A(-1364)C-Promotorpolymorphismus ($n=143$; AA=68,5%; AC/CC=31,5%) war weder mit Schweregrad (lung injury score, $p=0,80$; SAPS, $p=0,73$; SOFA, $p=0,26$; ungepaarter t-Test) noch der 30-Tage-Letalität ($p=0,81$, ungepaarter t-Test) assoziiert. Gleichwohl war bei AA-Genotyp-Trägern das C-reaktive Protein (CRP) am Aufnahmetag um 29% (AA: 21 mg/dl \pm 15 vs. AC/CC: 15 \pm 10; $p=0,03$; ungepaarter t-Test) höher als bei Patienten mit einem C-Allel. Ferner war die Protein- (AA: 3,2 mg/ml \pm 4,9 vs. AC/CC 0,8 \pm 1,1; $p=0,0004$; Welch-Test) und Albuminkonzentration (AA: 1,0 mg/ml \pm 2,1 vs. AC/CC: 0,26 \pm 0,45; $p=0,007$; Welch-Test) im BAL-Überstand bei AA-Genotypen 4-fach größer als bei C-Allelträgern, obwohl sich die Albuminkonzentration ($p=0,44$; ungepaarter t-Test) und Proteinkonzentration ($p=0,29$, ungepaarter t-Test) im Serum zwischen den Genotypträgern nicht unterschieden. Die LDH-Aktivität in der BAL der AA-Genotypträger (330 \pm 779 U/l) war um 62% ($p=0,014$; Welch-Test) höher als bei C-Allelträgern (125 \pm 154 U/l). Die LDH-Akti-

vitäten im Blut hingegen waren ebenfalls nicht unterschiedlich ($p=0,16$; Welch-Test). Obwohl sich die Art der Flüssigkeitstherapie (kristalloid vs. kolloidal) und die tägliche Flüssigkeitsbilanzierung ($p=0,08-0,93$, Mann-Whitney-U-Test, Abb. 1B) sowie die dialysefreien Tage (AA: 9,7 \pm 10 vs. AC/CC 10 \pm 10,6 Tage) nicht zwischen den Genotypträgern unterschieden, zeigten C-Allelträger 30 Tage nach Diagnose eines schweren ARDS zweimal häufiger ein akutes Nierenversagen im AKIN-Stadium ≥ 1 als Patienten mit dem AA-Genotyp (AA: 27% vs. AC/CC: 61%; $p=0,018$; ungepaarter t-Test, Abb.1A).

Interpretation

Das C-Allel im Aquaporin5(-1364)-A/C-Polymorphismus ist ein Risikofaktor für das akute Nierenversagen nach Diagnose eines ARDS. Das C-Allel war mit einer 2-fach schlechteren Erholung der Nierenfunktion nach 30 Tagen im Vergleich zum AA-Genotypen assoziiert, obwohl Biomarker der Inflammation im Blut (CRP) und Marker der Lungenschädigung in der BAL (Albumin und LDH) beim AA-Genotypen ausgeprägter nachweisbar waren.

Literatur

1. Rump K, von Busch A, Bergmann L, Menon A, Schäfer S, Siffert W, et al: Der AQP5 A(-1364)C-Promotorpolymorphismus und die AQP5-Expression beeinflussen die Letalität bei LPS-induzierter Inflammation und die Migration von Immunzellen. *Anästh Intensivmed* 2014;55:2(41):22-.
2. Adamzik M, Frey UH, Möhlenkamp S, Scherag A, Waydhas C, Marggraf G, et al: Aquaporin 5 gene promoter-1364A/C-polymorphism associated with 30-day survival in severe sepsis. *Anesthesiology* 2011;114(4): 912-7
3. Lopes JA, Jorge S.: The RIFLE and AKIN classifications for acute kidney injury: a critical and comprehensive review. *Clin Kidney J* 2013;6: 8-14.

Abbildung 1

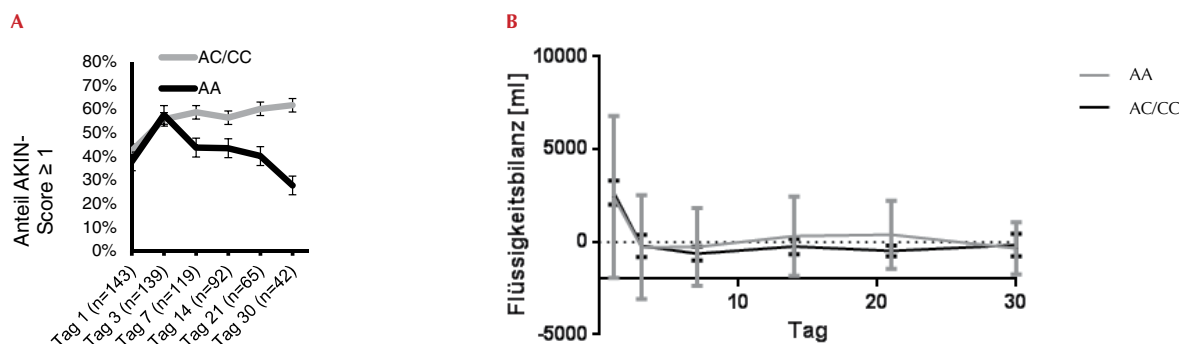


Abb. A: AKIN-Score in Abhängigkeit vom A(-1364)-Promotor-Polymorphismus im Behandlungsverlauf; signifikant schlechtere Nierenfunktion der C-Allelträger am Tag 30 mit einem AKIN-Score >1 ($p=0,018$). **Abb. B:** Mittlere Flüssigkeitstagesbilanz in Abhängigkeit vom A(-1364)C-Promotorpolymorphismus. Es zeigen sich an den Behandlungstagen 1,3,7,14,21 und 30 keine signifikanten Unterschiede in der täglichen Flüssigkeitsbilanz in Abhängigkeit vom Genotyp ($p=0,08-0,93$).

Effekte von Levosimendan auf die Calciumhomöostase des Kardiomyozyten nach Sepsisinduktion bei der Ratte

S. Wagner^{1,3,4} · C. Weber² · R. Galmbacher³ · S. Hein³ · S. Schürmann⁴ · J. Fechner¹ · J. Schüttler¹ · O. Friedrich⁴

- 1 Anästhesiologische Klinik, FAU Erlangen-Nürnberg
- 2 Institut für Physiologie und Pathophysiologie, RKU Heidelberg
- 3 Klinik für Anästhesiologie, RKU Heidelberg
- 4 Institut für Medizinische Biotechnologie, FAU Erlangen-Nürnberg

Korrespondenz:

soeren.wagner@kfa.imed.uni-erlangen.de

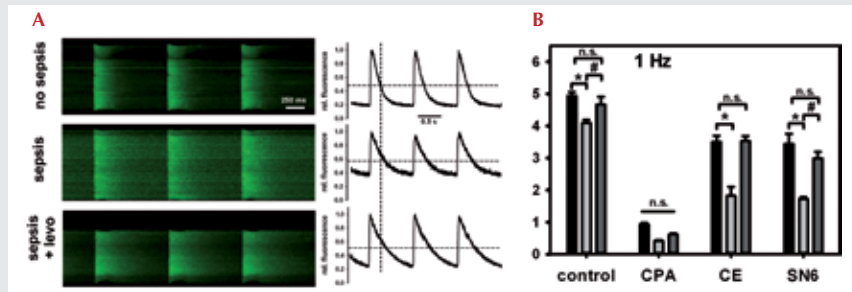
Fragestellung

Im septischen Schock dominiert eine reduzierte linksventrikuläre Ejektionsfraktion sowie eine diastolische Relaxationsstörung. Auf zellulärer Ebene führt Sepsis zu einer gestörten Calciumhomöostase, weshalb Calciumsensitizer, z.B. Levosimendan, einen positiven Therapieeffekt zeigen könnten. Allerdings ist die pharmakologische Wirkung von Levosimendan auf die Calciumhomöostase des septischen Kardiomyozyten nur rudimentär bekannt. Wir haben deshalb in einem tierexperimentellen Modell nach Sepsisinduktion durch LPS einige Effekte von Levosimendan auf die zelluläre Calciumregulation untersucht.

Methodik

Bei Wistar-Ratten Typ Hannover (ca. 300 g ± 6 g) wurde durch i.v.-Applikation von 15 mg LPS über 20 Minuten eine Sepsis induziert. Gruppe 1 (Kontrollgruppe, K) blieb ohne LPS-Behandlung, Gruppe 2 (S) erhielt LPS und Gruppe 3 (SL) LPS und Levosimendan (Bolusdosis von 24 µg/kg über 20 min, Erhaltungsdosis von 0,3 µg/kg/min über 100 min). Nach 6 Std. Verlaufsbeobachtung wurden das Herz explantiert und Kardiomyozyten isoliert. Durch selektive In-vitro-Blockierung der SERCA2a (Cyclopiazonsäure 2 µM), des NCX (SN6 20 µM) und der Plasmamembran-gebundenen Calcium-ATPase (Carboxyeosin 5 µM) wurden die diastolischen Ratenkonstanten der aufgezeichneten Calcium-Transienten bei elektrischer Feldstimulation (0,5; 1 und 2 Hz) mittels Konfokalmikroskopie bestimmt [1]. Ferner wurden atriales und ventrikuläres Myosin von K und S für ein sog. „Motility-Assay“ aufgereinigt. Papillarmuskel-Streifen aller drei Gruppen wurden zur Calciumsensitivitätsmessung isoliert und die graduelle Calcium-Kraft-Beziehung wurde gemessen [2]. Die statische Auswertung erfolgte mittels ANOVA-Test mit Bonferroni-Korrektur, $p < 0,05$, Ergebnisse dargestellt als Mittelwert (Standardfehler).

Abbildung 1



Ergebnisse

Die Ratenkonstanten des Decays der Ca^{2+} -Transienten waren in S signifikant geringer als in K. In SL zeigten sich die Ratenkonstanten wieder vergleichbar zu den Kontrollwerten bei K (1 Hz: K: $4,94 \pm 0,11$ 1/s; S: $4,09 \pm 0,09$ 1/s; SL: $4,66 \pm 0,23$ 1/s). Dieser Effekt war in unterschiedlicher Ausprägung bei den drei untersuchten Frequenzen und dem eingesetzten Calciumkanalblocker nachweisbar (Abb. 1). Die Aktin-Filament-Gleitgeschwindigkeit durch extrahiertes kardiales Myosin von S im Vergleich zu K war signifikant erniedrigt (Ventrikel: K: $5,4 \pm 0,1$ µm/s, S: $4,8 \pm 0,1$ µm/s; $p < 0,001$, Atrium: K $4,9 \pm 0,2$ µm/s, S $3,2 \pm 0,16$ µm/s; $p < 0,001$). Im Vergleich zu K ergab sich in der Calciumsensitivitätsmessung (Abb. 2) für S eine Rechtsverschiebung zu signifikant niedrigeren pCa -Werten, was eine reduzierte myofibrilläre Calciumsensitivität zeigt (K: $5,37 \pm 0,05$, S: $5,11 \pm 0,06$, $p = 0,02$). In SL hingegen war die Calciumsensitivität wieder normalisiert und mit K vergleichbar (SL: $5,41 \pm 0,07$).

Interpretation

Nach Gabe von Levosimendan ist die myofibrilläre Calciumsensitivität des Myokards bei septischen Ratten gesteigert. Die Aktin-Myosin-Interaktionsgeschwindigkeit ist am septischen Präparat signifikant reduziert, was auf gestörte kontraktile Parameter auf der Ebene des Querbrückenzyklus hindeutet. Unsere Daten lassen ferner vermuten, dass Levosimendan in der Sepsis die veränderte diastolische Calciumhomöostase positiv beeinflusst.

Literatur

1. Friedrich O, Wagner S, Battle AR, Schürmann S, Martinac B: Mechano-regulation of the beating heart at the cellular level – mechanosensitive channels in normal and diseased heart. Prog Biophys Mol Biol 2012;110(2-3):226-38
2. Wagner S, Knipp S, Weber C, Hein S, Schinkel S, Walther A: The heart in Duchenne muscular dystrophy: early detection of contractile performance alteration. J Cell Mol Med 2012;16(12):3028-36.

Abbildung 2

