

## Inhalt

<b>Selektive und nicht-selektive Betarezeptorblockade in einem Schafmodell des septischen Schocks</b> P.-H. Arnemann · M. Heßler · T. Kampmeier · L. Seidel · S. Rehberg · C. Ertmer	375
<b>Einfluss des Anästhesieverfahrens auf die ischämische Fern-Präkonditionierung des Herzens bei der Ratte in vivo</b> F. Behmenburg · A. Heinen · M.W. Hollmann · R. Huhn	376
<b>Charakterisierung respiratorischer und hämodynamischer Effekte von Lungenrekrutierungsmanövern nach der PROVHILO- und iPROVE-Studie an Schweinen ohne Lungenschädigung</b> T. Bluth · R. Huhle · J. Herold · L. Vivona · M. Herzog · M. Scharffenberg · T. Kiss · T. Koch · M. Gama de Abreu	378
<b>Glykokalyx-vermittelte Luftstrom-induzierte Mechanorezeption und -transduktion in Alveolarepithelzellen</b> M. Brand · C. Olotu · M. Kiefmann · I. Rentsch · E. Koch · P. Spieth · T. Koch · A. E. Goetz · R. Kiefmann	379
<b>Humane stammzellabgeleitete Nozizeptoren als Modellsystem für Schmerzsyndrome am Beispiel der Nav1.9-bedingten Small-Fiber-Neuropathie</b> E. Eberhardt · D. Schmidt · M. Maroni · B. Namer · Z. Kohl · I. P. Kleggetveit · E. Jørum · A. Lampert · B. Winner · J. Schüttler	380
<b>Der Ionenkanal TRPV4 ist eine wichtige Komponente der Paracetamol-induzierten Hepatotoxizität</b> M. Eberhardt · F. Echtermeyer · L. Risser · F. Vondran · A. Leffler	382
<b>Kinetik von Biomarkern der pulmonalen Schädigung und Inflammation bei chirurgischen Patienten mit und ohne postoperative pulmonale Komplikationen</b> A. Güldner · T. Bluth · T. Kiss · A. Serpa Neto · S. NT Hemmes · P. Pelosi · M. J. Schultz · T. Koch · M. Gama de Abreu	383
<b>Iloprost und Nitroglycerin vermindern den mitochondrialen O<sub>2</sub>-Verbrauch und steigern die Effektivität der oxidativen Phosphorylierung im Colonhomogenat ohne Einfluss auf die Barriereintegrität von Caco-2-Monolayern in vitro</b> A. Herminghaus · C. Vollmer · R. Eberhardt · R. Truse · J. Schulz · I. Bauer · O. Picker	384
<b>Der inhibitorische MHCI-Rezeptor Ly49Q auf neutrophilen Granulozyten ist notwendig für die Immunantwort bei der durch Klebsiella pneumoniae induzierten bakteriellen Pneumonie bei der Maus</b> J. Hillen · J. Rossaint · A. Zarbock · H. Block	385
<b>Einfluss von miRNAs auf die MHCI-Oberflächenexpression von Meljuso-Zellen, einem Modellsystem für dendritische Zellen und Monozyten</b> M. Houseman · M. Staiger · P. Kunath · F. Stüber · C. Lippuner	388
<b>Micro-RNA 125a inhibiert Chemotaxis und endotheliale Adhäsion humaner Monozyten in der Sepsis</b> M. Hübner · S. Hinske · S. Kreth	389
<b>Pharmakologische und genetische Inhibition von ADAM10 verringert den sekundären Hirnschaden nach traumatischer Hirnverletzung bei der Maus</b> R. Hummel · L. Dangel · M. Weidemeier · M. Treiber · R. Postina · C. Werner · K. Engelhard · K. Endres · M.K. Schäfer	390
<b>Nav1.7 Knockout verstärkt die Effektivität von Opioiden, während die Serotonin-induzierte Sensitivierung synergistisch reduziert ist</b> J. Isensee · L. Krahé · K. Moeller · V. Pereira · J. E. Sexton · X. Sun · E. Emery · J. N. Wood · T. Hucho	391
<b>Amisulprid senkt das Auftreten von postoperativer Übelkeit und postoperativem Erbrechen im Rahmen einer perioperativen Kombinationsprophylaxe</b> Y. Jelting · T. J. Gan · G. Fox · L. Eberhart · P. Diemunsch · S. Weibel · M. Kredel · P. Kranke	392
<b>Sonoelastographisches Monitoring der muskulären Reaktion nach lokaler Halothan-Applikation bei Schweinen mit Veranlagung zur malignen Hyperthermie</b> S. Johannsen · I. Türkmeneli · S. Isbary · N. Roewer · F. Schuster	393
<b>Rosuvastatin reduziert zerebralen oxidativen Stress und Inflammation im experimentellen akuten Lungenschaden im Schweinemodell</b> J. Kamuf · A. Garcia Bardon · A. Ziebart · M. Dib · A. Daiber · S.C. Thal · E.K. Hartmann	394
<b>Einfluss von Spontanatmungsaktivität auf die mittels Positronen-Emissions-Tomographie gemessene pulmonale neutrophilische Inflammation im tierexperimentellen schweren akuten Lungenversagen</b> T. Kiss · T. Bluth · A. Braune · R. Huhle · M. Herzog · A. Güldner · T. Koch · M. Gama de Abreu	395

## Abstracts der 31. Wissenschaftlichen Arbeitstage der DGAI

24. - 25.02.2017, 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 24. - 25.02.2017 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 2018 der Fresenius-Stiftung und das DGAI-Forschungsstipendium der Fresenius-Stiftung finden Sie auf der Seite 374.



### Ausschreibung des DGAI-Forschungsstipendiums der Fresenius-Stiftung

Die 32. Wissenschaftlichen Arbeitstage der Deutschen Gesellschaft für Anästhesiologie und Intensivmedizin (DGAI) werden vom **23.-24.02.2018** 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.

2018 wird das DGAI-Forschungsstipendium der Fresenius-Stiftung für eine hervorragende Forschungsarbeit mit 15.000 € dotiert. Grundlagenforschung und klinische Forschung sollen gleichermaßen gefördert werden.

#### Einsendeschluss:

**06.01.2018**

#### Nähere Informationen:

[www.anaesthesie.uk-wuerzburg.de/wat-wissenschaftliche-arbeitstage.html](http://www.anaesthesie.uk-wuerzburg.de/wat-wissenschaftliche-arbeitstage.html)  
E-Mail: [wat\\_wuerzburg@klinik.uni-wuerzburg.de](mailto:wat_wuerzburg@klinik.uni-wuerzburg.de)

#### Anschrift:

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

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

- Der Transkriptionsfaktor EGR-1 reguliert die GRK2-Transkription und vermittelt den Crosstalk zwischen kardialen Gq- und Gs-Signalweg**  
S. Klenke · A. Engler · D. Eggert · M. Fleck · C. Ochsenfarth · M. Thielmann · W. Siffert · J. Peters · U. H. Frey 396
- Protektiver Einfluss von Semaphorin 7A auf die murine Sepsis**  
A. Körner · M. Schlegel · J. Theurer · V. Gudernatsch · M. Giera · V. Mirakaj 397
- Die  $\beta$ -D-Endoglykosidase Heparanase ist eine vom Genotyp abhängige potenzielle Zielstruktur in der Therapie der septischen Kardiomyopathie**  
L. Martin · J. Chen · E. Zechendorf · F. Chiazza · S. Oggero · M. Collino · G. Marx · T. Schuerholz · C. Thiemermann 398
- Die Implementierung der KDIGO-Leitlinien reduziert die Inzidenz der akuten Nierenschädigung bei Biomarker-definierten Hochrisiko-Patienten nach herzchirurgischen Eingriffen**  
M. Meersch · C. Schmidt · J. Gerss · A. Zarbock 399
- Extrazelluläre Matrix verstärkt Schmerzsensitivierungssignalkaskade**  
K. Moeller · C. Loos · J. Isensee · J. Hasenauer · T. Hucho 400
- miRNA-223 schützt das Darmepithel im murinen akuten Darmversagen durch Inhibition des NLRP3-Inflammasoms**  
V. Neudecker · P. Jedlicka · M. E. Gerich · E. N. McNamee · H. K. Eltzhig 401
- Barriereschädigung und Allodynie via microRNA-21 bei Neuropathie bei Mäusen**  
A.-K. Reinhold · B. Schwab · R. S. Sauer · N. Roewer · H. L. Rittner 402
- Sulfonamide reduzieren die AQP5-Expression und Immunzellmigration**  
K. Rump · M. Unterberg · Z. Bazzi · M. Adamzik 403
- Erhöhte Durchlässigkeit der Blutrückenmarksbarriere und Perizytenmangel bei peripherer Neuropathie bei Ratten und Mäusen**  
R.-S. Sauer · J. Kirchner · S. Yang · L. Hu · N. Roewer · A. Brack · H. L. Rittner 404
- Einfluss von Xenonbeatmung auf die Lungenmechanik und die Verteilung der Lungenbelüftung bei lungengesunden Patienten**  
M. S. Schäfer · J. Gauch · T. A. Treschan · P. Kienbaum 405
- G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase 2 moduliert das Signalverhalten gängiger Opiode am  $\mu$ -Opioidrezeptor**  
B. Schmid · S. Mayer · T. Schmitt · U. Zabel · J. van Unen · J. Geodhart · T. Ozawa · A. Bock · M. Brede · C. Hoffmann 406
- Der Beatmungsmodus „Expiratory Ventilation Assistance“ verbessert die Oxygenierung beim gesunden Schwein**  
J. Schmidt · S. Spassov · J. Haberstroh · S. Wirth · S. Schumann 407
- Analyse der zerebralen Resting-state-Aktivität in einem Tiermodell für postoperative Schmerzen unter Modulation des spinalen GABAergen Systems**  
D. Segelcke · N. Just · C. Faber · E. M. Pogatzki-Zahn 408
- Identifikation essentieller Regulationsmechanismen der GRK6-Expression und mögliche Bedeutung für die Inflammation**  
M. Stegen · A. Engler · C. Ochsenfarth · I. Manthey · W. Siffert · J. Peters · U. H. Frey 409
- Therapeutisches Potential des H2S-Metaboliten Thiosulfat beim Ischämie-Reperfusionssyndrom**  
L. Ungelenk · A. Medyukhina · A. T. Press · S. Weis · S. Nietzsche · M. G. Clemens · A. Lupp · R. Wang · M. T. Figge · M. Bauer 410
- Der Aquaporin-5-Gen-Promotor A(-1364)C-Polymorphismus beeinflusst epigenetische Regulationsmechanismen und die Genexpression in Immunzellen in der Sepsis**  
M. Unterberg · T. Spellenberg · K. Rump · L. Bergmann · Z. Bazzi · M. Adamzik 411
- Perioperativ gewonnenes Serum kardiologischer Patienten beeinflusst die kardiomyozytäre Kontraktilität in vitro**  
M. Velten · M. Falk · C. Klein · G. D. Duerr · T. Hilbert · S. Frede · A. Hoefl · G. Baumgarten · R. Meyer 412
- Patientenkontrollierte Analgesie (PCA) mit Remifentanil versus alternative parenterale Methoden zur geburtshilflichen Analgesie: Ein systematischer Cochrane-Review mit Metaanalyse**  
S. Weibel · Y. Jelting · A. Afshari · N. L. Pace · L. H.J. Eberhart · N. Roewer · P. Kranke 413

## Selektive und nicht-selektive Betarezeptorblockade in einem Schafmodell des septischen Schocks

P.-H. Arnemann<sup>1</sup> · M. Heßler<sup>1</sup> · T. Kampmeier<sup>1</sup> · L. Seidel<sup>1</sup> · S. Rehberg<sup>2</sup> · C. Ertmer<sup>1</sup>

- 1 Klinik für Anästhesiologie, operative Intensivmedizin und Schmerztherapie, Universitätsklinikum Münster
- 2 Klinik für Anästhesiologie, Universitätsmedizin Greifswald

**Korrespondenz:** arnemann@anit.uni-muenster.de

### Fragestellung

Die Relevanz kardialer Komplikationen der Sepsis wird häufig unterschätzt. Eine Ökonomisierung der Herzarbeit durch Herzfrequenzkontrolle mittels selektiver Betarezeptorblockade konnte in einer Pilotstudie den Katecholaminbedarf und die Letalität senken [1]. Auch die nicht-selektive Betarezeptorblockade weist aus pathophysiologischen Überlegungen neben der Frequenzkontrolle potentielle Vorteile wie z.B. Modulation von Hypermetabolismus und Kapillarleck auf. Die vorliegende Arbeit soll den Einfluss einer selektiven und nicht-selektiven Betarezeptorblockade auf Katecholamin- und Volumenbedarf sowie Organschädigung und -funktion untersuchen.

### Methodik

30 weibliche Schafe wurden nach Genehmigung durch die zuständige Tierschutzbehörde in Allgemeinanästhesie instrumentiert. Es erfolgte eine mediane Laparotomie, und Faeces wurden aus dem Caecum entnommen. Nach Verschluss des Darms und der Bauchdecke wurden die Faeces in den Bauchraum instilliert. Nach Eintreten eines septischen Schocks (definiert als mittlerer arterieller Druck (MAD) <60 mmHg und Laktatkonzentration >1,8 mmol/L) erfolgte eine leitlinienorientierte Therapie für 12 Stunden. Die Tiere erhielten eine antimikrobielle Therapie (Meropenem und Vancomycin), und es erfolgte eine supportive Volumen- und Katecholamintherapie. Nach der initialen Stabilisierung (eine Stunde nach Therapiebeginn) wurden die Tiere in 3 Gruppen randomisiert und erhielten eine Dauerinfusion mit NaCl 0,9% als Placebo (n=10), Metoprolol (bis max. 0,3 mg·kg<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>; n=10) oder Propanolol (bis max. 0,3 mg·kg<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>; n=10). Ziel war in allen Gruppen eine Herzfrequenz im Bereich von 80-90 min<sup>-1</sup>. Stündlich wurden hämodynamische Parameter, Blutgasanalysen und Katecholamin- und Volumenbedarf dokumentiert und zu definierten Zeitpunkten Blut- und Urinproben entnommen. Alle Daten werden als Median (25. ; 75. Perzentile) dargestellt. Wiederholt

gemessene Parameter wurden mittels Generalized Estimating Equations verglichen, einmal erhobene mittels Kruskal-Wallis-Test.

### Ergebnisse

Der MAD sank durch Induktion der Sepsis in allen Gruppen, während die Herzfrequenz in allen Gruppen anstieg (jeweils p<0,05). Im MAD ergaben sich keine signifikanten Unterschiede über die Zeit zwischen den Gruppen. Die Herzfrequenz in der Metoprolol- und Propanololgruppe war nach Beginn der Therapie geringer als in der Kontrollgruppe (jeweils p<0,05) (Abb. 1). Keine signifikanten Unterschiede zeigten sich im kumulativen Katecholamin- (Kontrolle: 37,8 mg (30,5 ; 48,6); Metoprolol: 54,7 mg (43,0 ; 80,9); Propanolol: 47,2 mg (37,4 ; 75,1); p=0,235) und Volumenbedarf (Kontrolle: 4.036 mL (2.445 ; 5.250), Metoprolol: 5300 mL (3.900 ; 7.000), Propanolol: 4.600 mL (3.000 ; 5.355); p=0,479). Es zeigten sich weder in der Kreatinin-Clearance als Surrogat-Parameter der Nierenfunktion noch in der mittels EMTI-Score [2] untersuchten ultrastrukturellen Nierenschädigung relevante Gruppenunterschiede.

### Interpretation

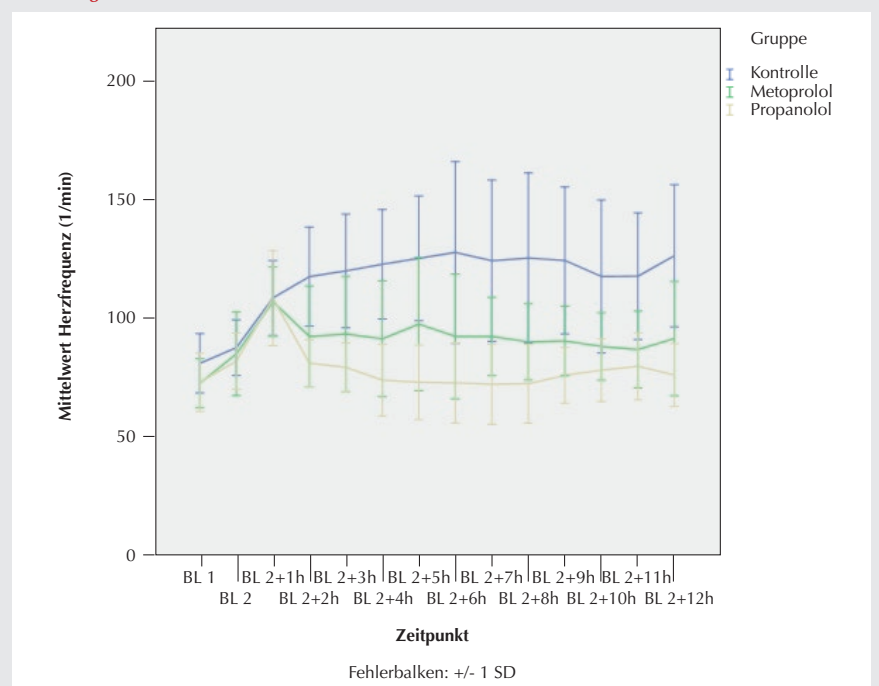
Sowohl durch Gabe von Metoprolol als auch Propanolol konnte die Herzfrequenz effektiv

kontrolliert werden. In der vorliegenden Untersuchung konnte keine Reduktion des Katecholaminbedarfs gezeigt werden. Dies könnte u.U. durch den Zeitpunkt des Beginns der Betarezeptorblockertherapie erklärbar sein, der deutlich früher als in der oben zitierten Studie gewählt wurde [1]. Die vorliegende Untersuchung zeigte keine negativen Auswirkungen der Betarezeptorblockertherapie auf Hämodynamik oder Surrogatparameter der Organfunktionen. Bezogen auf die dargestellten Parameter ist eine frühzeitige Herzfrequenzkontrolle durch Betarezeptorblocker in der Sepsis sicher.

### Literatur

1. Morelli A, Ertmer C, Westphal M, Rehberg S, Kampmeier T, Ligges S, et al: Effect of heart rate control with esmolol on hemodynamic and clinical outcomes in patients with septic shock: a randomized clinical trial. JAMA 2013;310(16):1683-91
2. Ertmer C, Kampmeier TG, Rehberg S, Morelli A, Köhler G, Lange M, et al: Effects of balanced crystalloid vs. 0.9% saline-based vs. balanced 6% tetra starch infusion on renal function and tubular integrity in ovine endotoxemic shock. Crit Care Med 2011;39(4):783-92.

Abbildung 1



### Herzfrequenz

BL1: Instillation der Faeces, BL2: Zeitpunkt des septischen Schocks.

### Einfluss des Anästhesieverfahrens auf die ischämische Fern-Präkonditionierung des Herzens bei der Ratte in vivo

F. Behnenburg<sup>1</sup> · A. Heinen<sup>2</sup> · M.W. Hollmann<sup>2</sup> · R. Huhn<sup>1</sup>

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

#### Korrespondenz:

Friederike.Behnenburg@med.uni-duesseldorf.de

#### Fragestellung

Eine ischämische Fernpräkonditionierung (RIPC) reduziert unter tierexperimentellen Bedingungen den myokardialen Ischämie-/Reperfusionsschaden in erheblichem Umfang. Demgegenüber konnte in aktuellen klinischen Studien (RIPHeart und ERRICA) bei herzchirurgischen Patienten kein klinisch relevanter kardioprotektiver Effekt durch RIPC nachgewiesen werden [1,2]. Diese Diskrepanz erklärt sich möglicherweise durch eine Interaktion zwischen protektivem Signalweg und den bei diesem Patientenkollektiv eingesetzten Anästhetika. Gegenstand einer aktuellen Diskussion ist, dass das intravenöse Anästhetikum Propofol einen blockierenden Einfluss auf den RIPC-Effekt [3] und damit auch auf die Ergebnisse von RIPHeart und ERRICA gehabt haben könnte.

In dieser Studie testeten wir deshalb die Hypothese, dass eine Anästhesie bestehend aus der Kombination aus Propofol und Remifentanyl im Gegensatz zu einer Anästhesie mit Sevofluran und Remifentanyl oder einer tierexperimentell eingesetzten Narkose mit Pentobarbital einen negativen Einfluss auf die Kardioprotektion durch RIPC hat.

#### Methodik

Mit Genehmigung der zuständigen Behörde (Aktenzeichen 84-02.04.2013.A279) wurden 36 männliche Wistar-Ratten (301 ± 17 g) operiert. Nach einmaliger intraperitonealer Pentobarbitalinjektion (80 mg/kg) wurden die Tiere kontrolliert beatmet und für eine kontinuierliche arterielle Blutdruckmessung (A. carotis com.) und Medikamentengabe (V. jugularis int.) instrumentiert. Anschließend wurde nach Minithorakotomie ein Hauptast der linken Koronararterie für 25 min okkludiert und danach das zuvor ischämische Areal für 2 h reperfundiert. Am Versuchs-

ende wurden die Herzen entnommen und die Infarktgröße in Prozent des Risikogebietes mittels Triphenyltetrazoliumchlorid-Färbung bestimmt. Die Tiere wurden in 6 Gruppen randomisiert. Die Kontrolltiere (Con, jeweils n=6) erhielten neben Ischämie und Reperfusion keine weitere Behandlung. Die ischämische Fernpräkonditionierung erfolgte durch 4 Zyklen 5-minütiger beidseitiger Hinterlaufischämie mit Reperfusion (RIPC, jeweils n=6). Es wurden drei unterschiedliche Anästhesieverfahren untersucht. Im weiteren Verlauf erhielten die Tiere entweder eine Mononarkose mit Pentobarbital (Pento, 40 mg/kg/h) oder eine balancierte Anästhesie mit Sevofluran (Sevo, 1 MAC) oder Propofol (Prop, 12 mg/kg/h), jeweils kombiniert mit Remifentanyl (0,5 µg/kg/min).

Statistik: Mittelwerte ± Standardabweichung, Varianzanalyse und Tukey-post-hoc-Test, p<0,05. Die notwendige Fallzahl wurde so berechnet, dass eine Effektgröße von 20% mit einem  $\alpha$ -Fehler von 0,05 nachgewiesen werden könnte.

#### Ergebnisse

Herzfrequenz und mittlerer arterieller Druck unterschieden sich nicht zwischen den Gruppen. RIPC induzierte eine signifikante Kardioprotektion in Pentobarbital-anästhesierten Ratten (Pento-RIPC: 30 ± 9% vs. Pento-Con: 65 ± 6%; P<0,05, Abb. 1). Die Kombinationen aus Sevofluran und Remifentanyl bzw. Propofol und Remifentanyl selbst hatten keinen Ein-

fluss auf die Infarktgröße (Sevo-Con: 61 ± 8%, Prop-Con: 59 ± 8%; n.s. vs. Pento-Con). Unter Sevofluran-Remifentanyl-Anästhesie reduzierte RIPC die Infarktgrößen signifikant (Sevo-RIPC: 31 ± 6% vs. Sevo-Con), während dieser kardioprotektive Effekt unter Propofol-Remifentanyl vollständig aufgehoben war (Prop-RIPC: 59 ± 6% n.s. vs. Prop-Con).

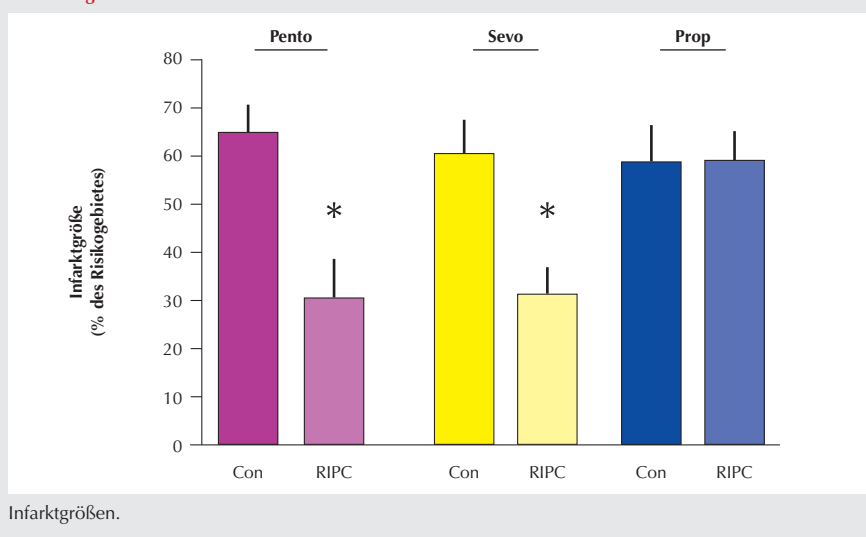
#### Interpretation

Diese Ergebnisse zeigen, dass mit einem klinisch eingesetzten Anästhesieverfahren bestehend aus Propofol und Remifentanyl eine Kardioprotektion durch RIPC bei Ratten gehemmt wird. Somit unterstützen unsere Daten die Aussage, dass Propofol bei herzchirurgischen Patienten für die fehlende Wirksamkeit von RIPC verantwortlich sein könnte.

#### Literatur

1. Meybohm P, Bein B, Brosteau O, Cremer J, Gruenewald M, Stoppe C, et al: A Multicenter Trial of Remote Ischemic Preconditioning for Heart Surgery. *N Engl J Med* 2015;373(15):1397-407
2. Hausenloy DJ, Candilio L, Evans R, Ariti C, Jenkins DP, Kolvekar S, et al: Remote Ischemic Preconditioning and Outcomes of Cardiac Surgery. *N Engl J Med* 2015;373(15):1408-17
3. Kottenberg E, Thielmann M, Bergmann L, Heine T, Jakob H, Heusch G, et al: Protection by remote ischemic preconditioning during coronary artery bypass graft surgery with isoflurane but not propofol – a clinical trial. *Acta Anaesthesiol Scand* 2012;56(1):30-8.

Abbildung 1





### Charakterisierung respiratorischer und hämodynamischer Effekte von Lungenrekruitierungsmanövern nach der PROVHILO- und iPROVE-Studie an Schweinen ohne Lungenschädigung

T. Bluth<sup>1</sup> · R. Huhle<sup>1</sup> · J. Herold<sup>1</sup> · L. Vivona<sup>2</sup> · M. Herzog<sup>1</sup> · M. Scharffenberg<sup>1</sup> · T. Kiss<sup>1</sup> · T. Koch<sup>1</sup> · M. Gama de Abreu<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie, Universitätsklinikum Carl Gustav Carus, Dresden

<sup>2</sup> Department of Anesthesia and Intensive Care, University of Naples, Neapel, Italien

#### Korrespondenz:

thomas.bluth@uniklinikum-dresden.de

#### Fragestellung

Lungenrekruitierungsmanöver (RM) und positiver endexpiratorischer Druck (PEEP) werden unter Allgemeinanästhesie eingesetzt, um Atelektasen zu vermeiden. Diese Studie verglich die RM der Multicenterstudien PROVHILO [1] und iPROVE [2] in Hinblick auf deren kurzzeitige Effektivität, gemessen an lungenfunktionellen Parametern. Wir stellten die Hypothese, dass aufgrund höherer transpulmonaler Drücke und längerer Dauer ein RM nach iPROVE zu einer besseren Lungenfunktion 15 Minuten nach Rekrutierung im Vergleich zum PROVHILO-RM führt.

#### Methodik

Die zugehörige Behörde genehmigte die randomisierte Crossover-Studie (DD24-5131/338/28) an 20 anästhesierten Hausschweinen in Rückenlage ohne Lungenschädigung (30-45 kg). Drei speziell gefertigte Drucksensoren wurden thorakoskopisch in Schwerkraft-abhängigen und -unabhängigen Regionen des linken Pleuraspalts platziert (ventral, dorsal und dorso-kaudal). Vor jedem RM wurden die Tiere vom Respirator getrennt und 5 Minuten volumenkontrolliert (PEEP 5 cmH<sub>2</sub>O, Tidalvolumen (VT) 8 ml/kg) beatmet (Baseline). Das PROVHILO-RM bestand aus einer stufenweisen Steigerung der VT über einen PEEP von 12 cmH<sub>2</sub>O bis zu einem Plateaudruck von 30-35 cmH<sub>2</sub>O für drei Atemzüge, gefolgt von einer volumenkontrollierten Beatmung mit PEEP von 12 cmH<sub>2</sub>O. Das iPROVE-RM bestand aus dem druckkontrollierten Anstieg des PEEP (10, 15 und 20 cmH<sub>2</sub>O) bei konstantem Driving Pressure (20 cmH<sub>2</sub>O) für jeweils 10-15 Atemzüge, gefolgt von einer PEEP-Titration, um den PEEP mit der höchsten Compliance des respiratorischen Systems (Crs) zu bestimmen (sog. bester PEEP). Anschließend folgte ein erneutes RM und die volu-

menkontrollierte Beatmung mit individuell bestem PEEP+2 cmH<sub>2</sub>O. Während der RM, sowie 1 bzw. 15 Minuten nach dem letzten RM wurden Variablen von Gasaustausch, Lungenmechanik und Hämodynamik sowie Ventilationsverteilung mittels elektrischer Impedanztomographie (PulmoVista V500, Fa. Dräger) aufgezeichnet. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe parametrischer Tests (t-Test; zweifaktorielle Anova mit Messwiederholung für Zeitpunkte 1 bzw. 15 min nach RM). Statistische Signifikanz wurde für p<0,05 angenommen.

#### Ergebnisse

Die PEEP-Niveaus nach RM unterschieden sich zwischen beiden Gruppen nicht (p=0,56). Das Produkt aus appliziertem Atemwegsdruck und Dauer des RM (PTP) war niedriger unter PROVHILO gegenüber iPROVE (58±11 vs. 81±10 cmH<sub>2</sub>O\*min, p<0,001); ebenso wie der maximale dorsale transpulmonale endinspiratorische Druck (17±3 vs. 19±3 cmH<sub>2</sub>O, p<0,001). Die dorsalen und dorso-kaudalen endexpiratorischen transpulmonalen Drücke waren unter iPROVE nach einer Minute leicht erhöht (5,8±3,5 vs. 4,4±2,6 cmH<sub>2</sub>O, p<0,05; bzw. 3,4±3,7 vs. 2,2±2,9 cmH<sub>2</sub>O, p<0,05), unterschieden sich nach 15 Minuten aber nicht mehr. Nach 15 Minuten war die Crs nach iPROVE-RM im Vergleich

zu PROVHILO-RM höher, aber der arterielle Sauerstoffpartialdruck sowie das Ventilationszentrum entlang der ventro-dorsalen Achse unterschieden sich nicht. Im Vergleich zu PROVHILO-RM war der mittlere arterielle Blutdruck unter iPROVE-RM reduziert (77±11 vs. 60±14 mmHg, p<0,001), zeigte 15 Minuten nach dem Manöver aber keinen Unterschied.

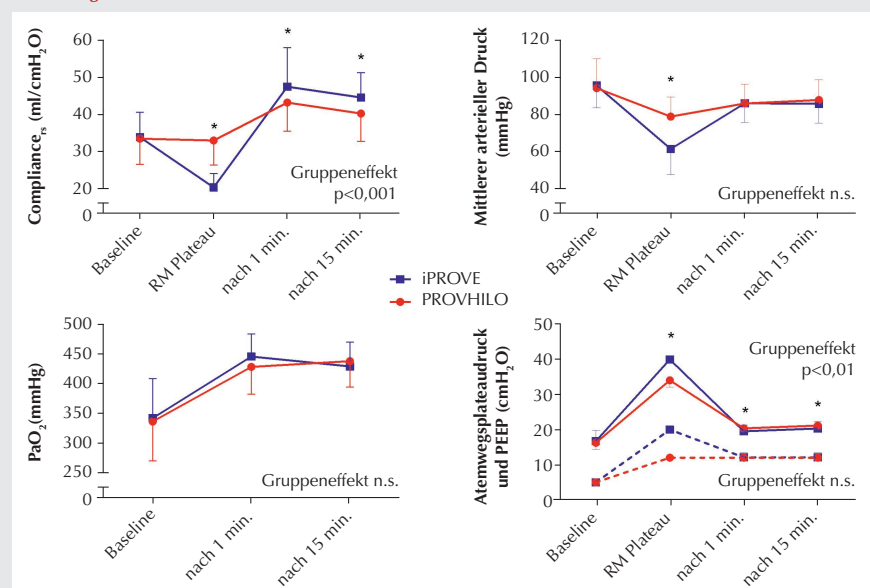
#### Interpretation

Unter Allgemeinanästhesie bei nicht geschädigten Lungen führte ein RM-Manöver nach iPROVE im Vergleich zu PROVHILO zu höheren transpulmonalen Drücken, jedoch ausgeprägter Beeinträchtigung der Hämodynamik. Die Oxygenierung sowie Ventilationsverteilung unterschieden sich 15 Minuten nach RM nicht.

#### Literatur

1. PROVE Network Investigators. High versus low positive end-expiratory pressure during general anaesthesia for open abdominal surgery (PROVHILO trial): a multicentre randomised controlled trial. *Lancet* 2014;384, 495-503
2. Ferrando C, et al: Rationale and study design for an individualized perioperative open lung ventilatory strategy (iPROVE): study protocol for a randomized controlled trial. *Trials* 2015; 16,193.

Abbildung 1



Zeitverläufe ausgewählter Variablen nach iPROVE-Lungenrekruitierung (blau) und PROVHILO-Rekrutierung (rot). PaO<sub>2</sub>, arterieller Sauerstoffpartialdruck; PEEP, positiv endexpiratorischer Druck, \* signifikanter Unterschied zum Zeitpunkt (T-Test)

### Glykokalyx-vermittelte Luftstrom-induzierte Mechanorezeption und -transduktion in Alveolarepithelzellen

M. Brand<sup>1</sup> · C. Olotu<sup>1</sup> · M. Kiefmann<sup>1</sup> ·  
I. Rentzsch<sup>2</sup> · E. Koch<sup>2</sup> · P. Spieth<sup>2</sup> · T. Koch<sup>2</sup> ·  
A. E. Goetz<sup>1</sup> · R. Kiefmann<sup>1</sup>

- 1 Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Hamburg
- 2 Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie, Universitätsklinikum Carl Gustav Carus, Dresden

**Korrespondenz:** mariembrand@gmail.com

#### Fragestellung

Der beatmungssassoziierte Lungenschaden (Ventilator-associated lung injury, VALI) ist eine schwerwiegende Komplikation bei Intensivpatienten. Als Ursache wird ein durch mechanischen Stress initiiertes Entzündungsprozess der Alveolen diskutiert [1]. In zahlreichen experimentellen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass Alveolarepithelzellen (AEC) auf mechanische Reize (wie z.B. Dehnung) mit einer Signaltransduktion reagieren [2], die über zytosolisches Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) und mitochondriale reaktive Sauerstoffspezies (ROS) vermittelt wird. Während der Beatmung wirkt in den Atemwegen bis hin zu den Alveolen ein Luftstrom-induzierter Scherstress [3], über dessen Wirkung noch wenig bekannt ist. Ziel dieser Arbeit war daher die erstmalige Untersuchung einer Mechanorezeption und -transduktion von Luftstrom-induziertem Scherstress in AEC. Die Funktion der epithelialen Glykokalyx als potentiell mechanosensitive Struktur und Veränderungen des Aktinzytoskeletts nach Luftstromexposition wurden überprüft.

#### Methodik

Kultivierte AEC (Zelllinie L2) wurden entweder nach Färbung mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiven Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 zur Messung der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$  oder nach Transfektion mit dem redoxsensitiven genetischen Fluoreszenzmarker roGFP zur Messung der mitochondrialen ROS (mROS)-Produktion in einer speziellen Luftstromkammer einer laminaren, periodischen Luftströmung ausgesetzt (7,2 mPa Scherstress). Die Messung der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$  oder der

mROS-Produktion erfolgte kontinuierlich mittels Epifluoreszenzmikroskopie. Zur weiteren Untersuchung des  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ -Signals wurden AEC vor Versuchsbeginn u.a. im  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Medium (EGTA, 0,5 mM, 10 min) oder mit dem Glykokalyx-degradierenden Enzym Heparinase I (30 mU/ml, 60 min) inkubiert. Außerdem erfolgte nach 60-minütiger Luftstromexposition eine Immunfluoreszenz (IF)-Färbung der F-Aktin-filamente der AEC.

#### Ergebnisse

Während der Luftstromexposition kam es zu einer Zunahme der mittleren  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ -Oszillationsamplitude (A  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ ) um  $(5,3 \pm 0,9)$  nM bzw.  $(40,9 \pm 8,5)$  % ( $n=19$ ,  $p<0,05$ ). Unter extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Bedingungen war kein Anstieg mehr nachweisbar ( $n=16$ ,  $p<0,05$ ). Auch die Degradierung der Glykokalyx inhibierte die Luftstrom-induzierte Zunahme der A  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$  ( $n=10$ ,  $p<0,05$ ). Die Änderung der roGFP-Fluoreszenzintensitätsratio pro Zeitintervall als Ausdruck der mROS-Produktion lag unter Ausgangsbedingungen bei  $(0,2 \pm 0,1)$  1/h und stieg während Luftstromexposition auf  $(1,1 \pm 0,2)$  1/h an ( $n=5$ ,  $p<0,05$ ). Im Vergleich zur Kontrollbedingung waren nach Luftstromexposition die Aktinfilamente in AEC verdichtet, und es wurden vermehrt Stressfasern sichtbar (Abb. 1).

#### Interpretation

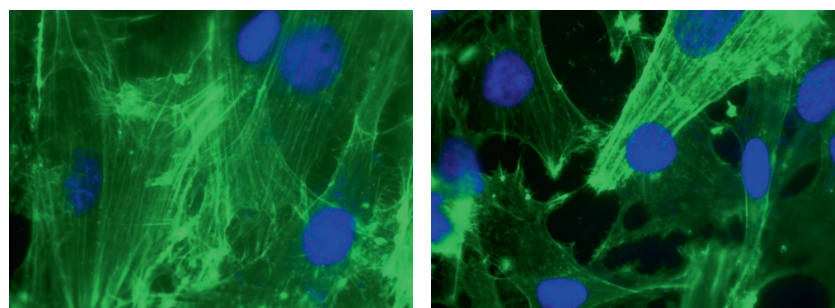
Die Ergebnisse zeigen, dass AEC auf Luftstromexposition mit einem spezifischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal und einer mROS-Produktion im Sinne

einer Mechanotransduktion reagierten. Da unter  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Bedingungen das Luftstrom-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal ausblieb, kann davon ausgegangen werden, dass dieses durch einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom aus dem Extrazellularraum generiert wird. Die Abschwächung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals nach Glykokalyx-Degradierung weist auf eine Beteiligung der Glykokalyx bei der Mechanorezeption von Luftstrom-induziertem Scherstress in AEC hin. Darüber hinaus führte Luftstrom-induzierter Scherstress in AEC zu einem Umbau im Aktinfilamentgerüst mit vermehrter Stressfaserbildung. Die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen dem  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ -Signal, der mROS-Produktion und den Aktinfilamentveränderungen sowie die Frage, inwieweit diese Mechanotransduktionsprozesse zur Pathogenese des VALI beitragen, werden Gegenstand weiterer Forschung sein.

#### Literatur

1. Slutsky AS, Ranieri VM: Ventilator-Induced Lung Injury. *N Engl J Med* 2013;369(22):2126-36
2. Waters C, et al: Mechanobiology in lung epithelial cells: measurements, perturbations, and responses. *Comprehensive Physiology* 2012;2(1):1-29
3. Nucci G, et al: Modeling airflow-related shear stress during heterogeneous constriction and mechanical ventilation. *J Appl Physiol* 2003;95(1):348-56.

**Abbildung 1**



IF-Aufnahme der Aktinfilamente (grün) und Zellkerne (blau) eines AEC-Monolayers unter Kontrollbedingung (links) und nach 60-minütiger Luftstromexposition (rechts).

## Humane stammzellabgeleitete Nozizeptoren als Modellsystem für Schmerzsyndrome am Beispiel der Nav1.9-bedingten Small-Fiber-Neuropathie

E. Eberhardt<sup>1</sup> · D. Schmidt<sup>2</sup> · M. Maroni<sup>1,2</sup> · B. Namer<sup>3</sup> · Z. Kohl<sup>4</sup> · I. P. Kleggetveit<sup>5</sup> · E. Jørum<sup>5</sup> · A. Lampert<sup>6</sup> · B. Winner<sup>2</sup> · J. Schüttler<sup>1</sup>

1 Anästhesiologische Klinik, Universitätsklinikum Erlangen

2 Stammzellbiologische Abteilung, Universitätsklinikum Erlangen

3 Institut für Physiologie und Pathophysiologie Universität Erlangen-Nürnberg

4 Molekulare Neurologie, Universitätsklinikum Erlangen

5 Universitätsklinikum Oslo, Norwegen

6 Institut für Physiologie, RTWH Aachen

### Korrespondenz:

esther.eberhardt@kfa.imed.uni-erlangen.de

### Fragestellung

Monogene Schmerzkrankungen durch Mutationen in tetrodotoxin-sensitiven (TTXs) und TTX-resistenten (TTXr) spannungsabhängigen Natriumkanälen (Navs) haben in den letzten Jahren zum Verständnis der molekularen Mechanismen der Schmerzstehung wesentlich beigetragen. Die Differenzierung und Charakterisierung stammzellabgeleiteter Nozizeptoren ermöglichen es, Schmerzrezeptoren von Patienten in großer Zahl zu untersuchen [1,2]. Ein neuer Nav1.7- (TTXs) Inhibitor (PF-05089771) wurde bereits an diesem System getestet und führte in der Patientengruppe zur Schmerzreduktion [3]. Für mutationsinduzierte Schmerzkrankungen durch Nav1.8 und Nav1.9 (TTXr) gibt es bisher keine Untersuchungen in patienten-abgeleiteten Nozizeptoren. Ziel dieser Arbeit ist es, den zellulären Phänotyp einer Nav1.9-bedingten Schmerzkrankung zu modellieren, zu charakterisieren und in vitro pharmakologisch zu revidieren.

### Methodik

Nach Genehmigung (EK 4120 Erlangen; REC 2012/2297 Norwegen) und schriftlicher Einwilligung wurden humane induzierte pluripotente Stammzellen (hiPSCs) aus Fibroblasten einer Hautbiopsie von Patienten mit Nav1.9-bedingter Small-Fiber-Neuropathie (SFN) und gesunden Probanden reprogrammiert und anschließend durch Zugabe definierter Faktoren

zu humanen stammzellabgeleiteten Nozizeptoren differenziert. Diese wurden hinsichtlich der Expression von Markergenen molekularbiologisch analysiert sowie funktionell und pharmakologisch mit Microelectrode Array (MEA)- und Patch-Clamp-Technik charakterisiert.

### Ergebnisse

Untersucht wurden zwei SFN-Patienten mit den Nav1.9-Mutationen p.N1169S (Pat 1) und p.I1293V (Pat 2). Beide leiden an Spontanschmerzen mit Erythemen und Überwärmung der distalen Extremitäten und Kühlen führt zur Schmerzreduktion (Abb. 1A). Stammzell-abgeleitete Nozizeptoren der Patienten zeigten im Gegensatz zu denen gesunder Probanden Spontanaktivität mit unterschiedlichen Aktivitätsmustern. Bei Pat 1 fand sich kontinuierliche Spontanaktivität mit erhöhter Anzahl an repetitiven Entladungen. Die Häufigkeit dieser Entladungen war bei Pat 2 vergleichbar mit der Kontrollgruppe, aber deren Frequenz und Dauer waren signifikant erhöht. (Abb. 1B). Die Applikation von 500 µM Lacosamid führte bei Nozizeptoren beider Patienten zu einer signifikanten Reduktion der Aktivität im Gegensatz zu denen der Kontrollen (Abb. 1C).

Die langsame Inaktivierung gilt als modifizierender Faktor für das Ausmaß einer Übererregbarkeit von Navs und wird durch Lacosamid verstärkt. Patch-Clamp-Messungen ergaben bisher keinen signifikanten Unter-

schied zwischen der langsamen Inaktivierung der TTXr-Kanäle der Patienten- und Kontrollgruppen.

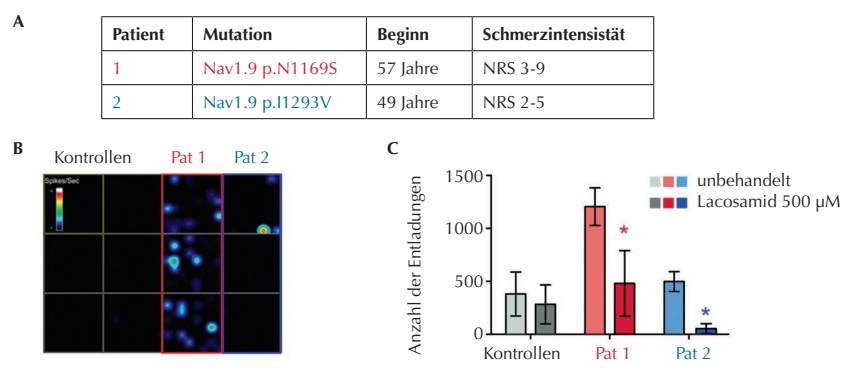
### Interpretation

Die in dieser Studie charakterisierten Nav1.9-Mutationen zeigen in Übereinstimmung mit dem klinischen Bild und der Schmerzintensität beider SFN-Patienten eine in Häufigkeit oder Frequenz und Dauer vermehrte Spontanaktivität in patientenabgeleiteten Nozizeptoren. Unsere Daten legen außerdem nahe, dass Lacosamid eine mögliche therapeutische Option bei TTXr Nav-bedingten Schmerzkrankungen sein könnte.

### Literatur

1. Chambers SM, Qi Y, Mica Y, Lee G, Zhang XJ, Niu L, et al: Combined small-molecule inhibition accelerates developmental timing and converts human pluripotent stem cells into nociceptors. *Nat Biotechnol* 2012;30(7):715-20
2. Eberhardt E, Havlicek S, Schmidt D, Link AS, Neacsu C, Kohl Z, et al: Pattern of functional TTX-resistant sodium channels reveals developmental stage of human iPS- and ES cell-derived nociceptors. *Stem Cell Reports* 2015;5(3):305-13
3. Cao L, McDonnell A, Nitzsche A, Alexandrou A, Saintot PP, Loucif AJC, et al: Pharmacological reversal of a pain phenotype in iPSC-derived sensory neurons and patients with inherited erythromelalgia. *Sci Transl Med* 2016;8(335):335ra56.

Abbildung 1



A Patienteneigenschaften; B Momentaufnahme der Spontanaktivität im MEA mit Farbcodierung der Entladungen/Sekunde an aktiven Elektroden der Messplatte. C Lacosamid (500 µM) kann in vitro die Spontanaktivität (gemittelte Entladungen pro well in 2 min) beider Nav1.9-Mutanten reduzieren (\* p<0,05 Kruskal-Wallis Test).



### Der Ionenkanal TRPV4 ist eine wichtige Komponente der Paracetamol-induzierten Hepatotoxizität

M. Eberhardt<sup>1</sup> · F. Echtermeyer<sup>1</sup> · L. Risser<sup>1</sup> · F. Vondran<sup>2</sup> · A. Leffler<sup>1</sup>

1 Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin,

2 Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie,

Medizinische Hochschule Hannover

#### Korrespondenz:

eberhardt.mirjam@mh-hannover.de

Preisträgerin des DGAI-Forschungsstipendiums der Fresenius-Stiftung 2017

#### Fragestellung

Hepatotoxizität ist eine gravierende Nebenwirkung bei einer Überdosierung mit Paracetamol (PCM). PCM wird in der Leber durch das Cytochrom P450-System anteilig zu N-Acetyl-p-benzochinonimin (NAPQI) verstoffwechselt, und dieser hochreaktive Metabolit gilt als hauptverantwortlich für die Hepatotoxizität, da er nach Depletion der Gluthationspeicher mit Proteinen reagiert und oxidativen Stress verursacht [1]. Dennoch sind die NAPQI-induzierten Mechanismen bislang schlecht verstanden, wobei kürzlich eine Rolle des Ionenkanals TRPM2 bei PCM-induziertem Leberschaden nachgewiesen werden konnte [2]. In dem vorliegenden Projekt identifizierten wir den Ionenkanal TRPV4 als Target für NAPQI und wiesen die Expression von TRPV4 in Hepatozyten nach. Folglich wurde die Hypothese überprüft, ob TRPV4 an PCM-induzierter Hepatotoxizität beteiligt ist.

#### Methodik

Hepatozyten wurden mit der 2-Schritt-Kollagenase-Perfusionsmethode aus Wildtyp- und TRPV4<sup>-/-</sup>-Mäusen gewonnen. Humane Hepatozyten wurden aus Präparaten nach Leberteilresektionen extrahiert. Die Expression von TRPV4 in Hepatozyten wurde mittels rtPCR, Western-Blot und Immunhistochemie bestimmt. Calcium-Imaging wurde an Fura2-beladenen, TRPV4-exprimierenden HEK293-Zellen und Hepatozyten durchgeführt. Hepatotoxizität wurde mit 10 mg/ml PCM sowie dem TRPV4-Blocker HC067047 (1 µM) für 24 h (Maus) und 48 h (human) induziert und die Zellnekrose über den Anteil der Propidium-Iodid-positiven Zellen bestimmt. Oxidativer Stress wurde nach 0, 4, 24 und 48 h mit Hilfe von H2DCF im ELISA bei OD488nm gemessen. Wildtyp- und TRPV4<sup>-/-</sup>-Mäusen wurde eine Überdosis PCM (400 mg/kg) i.p.

appliziert. Nach 24 h wurde die Leberschädigung anhand von Leberenzymen (ALT, AST) im Blut sowie über histochemische (H&E) und immunhistochemische (Nitrotyrosine, GR1-positive Neutrophile) Färbung von Leberschnitten bestimmt. Die statistische Analyse erfolgte mittels unabhängigem zweiseitigem t-Test sowie bei multiplen Gruppen und Normalverteilung mit ANOVA und Bonferroni-post-hoc-Test. Die Experimente wurden mit Genehmigung der Tierschutz- und Ethikkommission durchgeführt (TVA 33.12-42502-04-16/2269).

#### Ergebnisse

Eine Expression von TRPV4 konnte auf RNA- und Proteinebene in primären Hepatozyten nachgewiesen werden. Im Calcium-Imaging induzierten weder der TRPV4-Agonist GSK 1016790A noch NAPQI einen signifikanten Calcium-Influx in Hepatozyten, was gegen eine funktionelle Expression von TRPV4 in der Zellmembran spricht. Rekombinante TRPV4-Kanäle in HEK293-Zellen dagegen werden sowohl durch GSK als auch durch NAPQI aktiviert. Der TRPV4-Blocker HC067047 reduziert die PCM-induzierte Nekrose sowohl in murinen (von 96 ± 10% auf 21 ± 7%, n=7; p<0,05) als auch in humanen (von 23 ± 11% auf 6 ± 5%, n=6; p<0,05) Hepatozyten in vitro. Ferner ist die PCM-induzierte Nekrose in Hepatozyten der TRPV4<sup>-/-</sup>-Maus vermindert (31 ± 17%, n=4; p<0,05). Die Entstehung von oxidativem Stress durch PCM in Hepatozyten wird durch HC067047 signifikant nach 24h (von 6460 ± 1490 U auf 2438 ± 512 U, n=9; p<0,05) und 48 h (von 15043 ± 708 U auf 9652 ± 2013 U, n=9; p<0,05) gesenkt. In vivo verursacht PCM eine geringere Leberschädigung bei TRPV4<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp, gemessen an den Leberenzymen ALT (WT 9464 ± 1271 U/L, TRPV4<sup>-/-</sup> 3140 ± 534 U/L, n=9, p<0,05) und AST (WT

9575 ± 2231 U/L, TRPV4<sup>-/-</sup> 3132 ± 774 U/L, n=9, p<0,05). Auch histologisch sind Anzahl und Ausmaß der geschädigten Leberzellen um die Zentralvenen in TRPV4<sup>-/-</sup>-Lebern im Vergleich zum Wildtyp signifikant reduziert. Die PCM-induzierte Leberzellnekrose wird u.a. durch eine Nitrierung von Proteinen durch Peroxynitrit verursacht [3]. Diese zeigte sich durch Nachweis von Nitrotyrosin in Lebern von TRPV4<sup>-/-</sup>-Mäusen signifikant vermindert (8 ± 3% Fläche des HPF) im Vergleich zum Wildtyp (52 ± 7% Fläche des HPF, n=9, p<0,05). Auch die Anzahl an rekrutierten neutrophilen Granulozyten nach einer PCM-Überdosierung ist in TRPV4<sup>-/-</sup>-Mäusen signifikant reduziert im Vergleich zum Wildtyp (WT 393 ± 75, TRPV4<sup>-/-</sup> 226 ± 25 GR1-pos. Zellen/HPF, n=9, p<0,05).

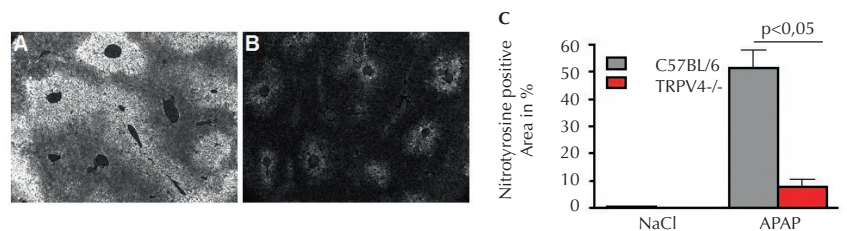
#### Interpretation

Unsere Daten identifizieren TRPV4 als wichtige Komponente der PCM-induzierten Hepatotoxizität. Als Mechanismus scheint eine NAPQI-induzierte Aktivierung von TRPV4 mit einer konsekutiven Produktion von Peroxynitrit möglich. Selektive TRPV4-Inhibitoren könnten somit eine therapeutische Option für die Behandlung der PCM-induzierten Hepatotoxizität darstellen.

#### Literatur

1. Du K, Ramachandran A, Jaeschke H: Oxidative stress during acetaminophen hepatotoxicity: Sources, pathophysiological role and therapeutic potential. *Redox Biol* 2016;10:148-156
2. Kheradpezhohu E, Ma L, Morphet A, Barritt GJ, Rychkov GY: TRPM2 channels mediate acetaminophen-induced liver damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111(8):3176-81
3. Knight TR, Ho YS, Farhood A, Jaeschke H: Peroxynitrite is a critical mediator of acetaminophen hepatotoxicity in murine livers: protection by glutathione. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;303(2):468-75.

Abbildung 1



Nitrotyrosin-Färbung (helle Bereiche) nach PCM-Überdosierung ist in WT- (A) deutlich stärker ausgeprägt als in TRPV4<sup>-/-</sup>-Lebern (B). (C) Graphische Darstellung der Nitrotyrosin-positiven Fläche.

## Kinetik von Biomarkern der pulmonalen Schädigung und Inflammation bei chirurgischen Patienten mit und ohne postoperative pulmonale Komplikationen

A. Güldner<sup>1</sup> · T. Bluth<sup>1</sup> · T. Kiss<sup>1</sup> · A. Serpa Neto<sup>2</sup> · S. NT Hemmes<sup>3</sup> · P. Pelosi<sup>4</sup> · M. J. Schultz<sup>3</sup> · T. Koch<sup>1</sup> · M. Gama de Abreu<sup>1</sup>

- 1 Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie, Universitätsklinikum Carl Gustav Carus, Dresden
- 2 Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, Brasilien
- 3 Academic Medical Center, Universität Amsterdam, Niederlande
- 4 Universität Genua, Italien

### Korrespondenz:

Andreas.Gueldner@uniklinikum-dresden.de

### Fragestellung

Postoperative pulmonale Komplikationen (PPC) tragen zur Erhöhung von Morbidität und Mortalität nach chirurgischen Eingriffen bei [1]. PPC sind mit Veränderungen der Plasmaspiegel von Biomarkern der pulmonalen Schädigung und Inflammation assoziiert. Bisher ist jedoch unklar, ob Patienten, die PPC entwickeln, durch Biomarker identifiziert werden können. Ziel dieser Untersuchung war es, die Kinetik ausgewählter Biomarker der pulmonalen Schädigung und Inflammation im Hinblick auf deren Fähigkeit zur Identifikation dieser Patienten zu untersuchen. Zudem sollte der Einfluss des intraoperativ verwendeten positiv endexpiratorischen Drucks (PEEP) auf die Kinetik dieser Biomarker evaluiert werden.

### Methodik

Die Untersuchung wurde als Substudie einer randomisierten kontrollierten Studie zum Einfluss der intraoperativen Anwendung von

PEEP auf die Inzidenz von PPC durchgeführt (clinicaltrials.gov, NCT01441791) [2]. Es wurden Patienten, welche ein hohes Risiko für PPC gemäß Risikoscore [1] aufwiesen und sich einem offenen abdominalchirurgischen Eingriff unterzogen, eingeschlossen. Sie wurden randomisiert einer der beiden Gruppen mit folgenden Beatmungseinstellungen für die intraoperative Beatmung zugewiesen: 1) einem PEEP von 12 cm H<sub>2</sub>O mit Lungenrekruitierungsmanövern und 2) einem PEEP von 2 cm H<sub>2</sub>O ohne dieselben. In beiden Gruppen wurde ein Tidalvolumen von 7 ml/kg angewendet. Vor OP-Beginn, nach OP-Ende und am fünften postoperativen Tag wurden die Plasmaspiegel folgender Biomarker der pulmonalen Schädigung und Inflammation bestimmt: Tumornekrosefaktor (TNF)- $\alpha$ , Interleukin (IL)-6 und IL-8, lösliche Form des Receptors for Advanced Glycation End-products (sRAGE), Surfactant Protein (SP)-D, Clarazellprotein (CC)-16 und Krebs von den Lungen 6 (KL6). PPC wurden als kombinierter Endpunkt aus einem oder mehreren der folgenden Ereignisse definiert: moderate und schwere Hypoxämie, Atelektase, Pleuraerguss, Bronchospasmus, pulmonale Infiltrate, pulmonale Infektion, Aspirationpneumonitis, ARDS, Lungenödem und Pneumothorax. Unterschiede in der Kinetik der Plasmaspiegel der untersuchten Biomarker zwischen Patienten ohne und mit PPC sowie zwischen hohem und niedrigem PEEP wurden sowohl für absolute Werte als auch relative Werte im Verhältnis zum Ausgangswert vor OP-Beginn untersucht. Die prognostische Genauigkeit der untersuchten Biomarker wurde wiederum sowohl für absolute als auch relative Werte mittels ROC-AUC evaluiert.

### Ergebnisse

Es wurden 242 Patienten, 120 in der Gruppe mit hohem PEEP bzw. 122 in der Gruppe mit

niedrigem PEEP, eingeschlossen, für welche eine Inzidenz von PPC von 65,5% bzw. 50,9% gemessen wurde. In allen Patienten stiegen die Plasmaspiegel für TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 und CC-16 postoperativ im Vergleich zum präoperativen Ausgangswert an, während jene für SP-D und KL6 abfielen. Der Plasmaspiegel für sRAGE veränderte sich nicht. Patienten mit PPC zeigten im Vergleich zu Patienten ohne PPC postoperativ einen stärkeren Anstieg der Plasmaspiegel für TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-8 (Abb. 1A) sowie einen stärkeren Abfall desselben für SP-D. Keiner der untersuchten Biomarker zeigte eine ROC-AUC größer als 0,7. Die Anwendung eines hohen PEEP war mit einem stärkeren postoperativen Anstieg von CC-16 assoziiert (Abb. 1B).

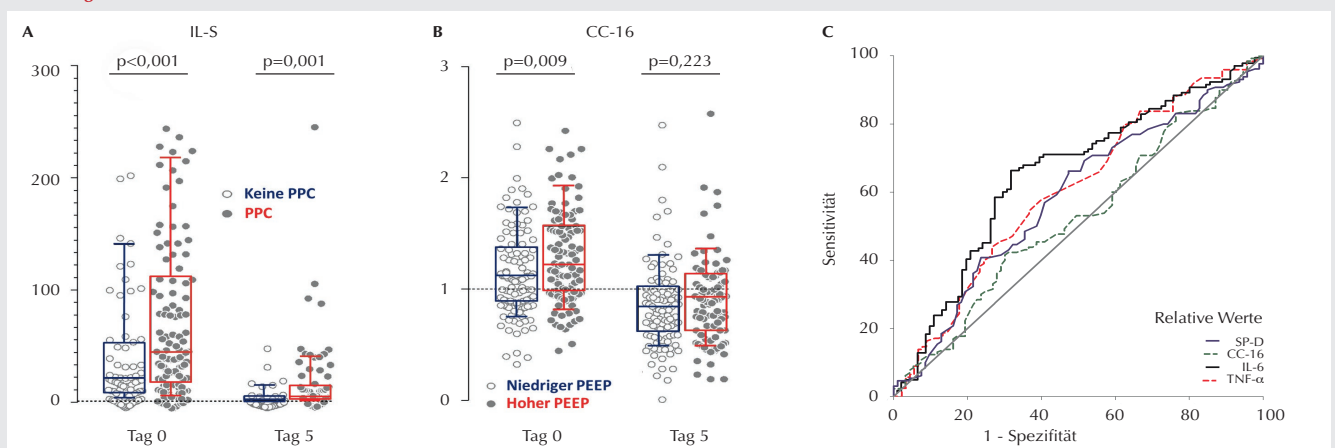
### Interpretation

Patienten, die sich einem offenen abdominalchirurgischen Eingriff unterziehen und PPC entwickeln, zeigen Veränderungen der Plasmaspiegel der Biomarker der pulmonalen Schädigung und Inflammation. Keiner der untersuchten Biomarker zeigt dabei eine ausreichende prognostische Genauigkeit, um diese Patienten direkt postoperativ zu identifizieren. Die Anwendung von hohem im Vergleich zu niedrigem PEEP ist dabei mit einem postoperativen Anstieg eines Biomarkers der pulmonalen Schädigung assoziiert.

### Literatur

1. Mazo V, Sabate S, Canet J, et al: Prospective external validation of a predictive score for postoperative pulmonary complications. *Anesthesiology* 2014;121:219-31
2. Hemmes SN, Gama de Abreu M, Pelosi P, et al: High versus low positive end-expiratory pressure during general anaesthesia for open abdominal surgery (PROVHILO trial): A multi-centre randomised controlled trial. *Lancet* 2014;384:495-503.

Abbildung 1



Relative Werte für IL-6 im Vergleich von Patienten mit und ohne PPC (A) und für CC-16 im Vergleich von hohem und niedrigem PEEP (B) sowie ROC-AUC Analysen relativer Werte für SP-D, CC-16, IL-6 und TNF- $\alpha$  (C).

### Iloprost und Nitroglycerin vermindern den mitochondrialen O<sub>2</sub>-Verbrauch und steigern die Effektivität der oxidativen Phosphorylierung im Colonhomogenat ohne Einfluss auf die Barriereintegrität von Caco-2-Monolayern in vitro

A. Herminghaus · C. Vollmer · R. Eberhardt · R. Truse · J. Schulz · I. Bauer · O. Picker

Klinik für Anästhesiologie, Universitätsklinikum Düsseldorf

#### Korrespondenz:

anna.herminghaus@med.uni-duesseldorf.de, christian.vollmer@med.uni-duesseldorf.de

#### Fragestellung

Die topische Gabe von Nitroglycerin (NG) verbessert sowohl die eingeschränkte gastrale mikrozirkulatorische Oxygenierung ( $\mu\text{HbO}_2$ ) als auch die Barrierefunktion der Schleimhaut bei milder Hämorrhagie am Hund [1]. Topisches Iloprost (Ilo) hingegen verbessert nur die  $\mu\text{HbO}_2$ . Unklar ist, wie diese Effekte vermittelt werden. Eine Steigerung der im Wesentlichen postkapillär gemessenen Oxygenierung [1] könnte auf einen reduzierten O<sub>2</sub>-Verbrauch hindeuten: durch Hemmung der mitochondrialen Atmungskette oder durch Steigerung der Effizienz der oxidativen Phosphorylierung [2,3]. Die unveränderte Barrierefunktion unter Ilo trotz verbesserter  $\mu\text{HbO}_2$  könnte durch einen direkten Einfluss auf die Barrierefunktion, z.B. eine Schädigung der Tight junctions, bedingt sein. Ziel dieser Studie war es daher, in vitro zu untersuchen, 1. inwieweit Ilo und NG die intestinale mitochondriale Funktion und 2. die Barrierefunktion direkt, und damit unabhängig von einer Wirkung auf die Mikrozirkulation, beeinflussen.

#### Methodik

Die Bestimmung der mitochondrialen Respiration erfolgte mittels einer Clark-Elektrode (Mitocell 782, Strathkelvin Instruments, Glasgow, Scotland) in Homogenaten aus Colongewebe von 16 gesunden männlichen Wistar-Ratten (240-280 g) (Organentnahme, internes AZ: O27/12). Es wurden die maximale mitochondriale Atmung (State 3) und der Sauerstoffverbrauch nach ADP-Gabe ( $\Delta\text{O}$ ) nach Stimulation über Komplex I und II gemessen. Die Messung erfolgte vor (Ausgangswert, (AW)) und nach 15-minütiger Inkubation mit Ilo (0,1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  und 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) oder mit NG (25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  und 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) (je n=8), entsprechend der höchsten applizierten Konzentration im Hundemodell und zusätzlich in 0,1-facher Konzentration, um die In-vivo-Situation (Verdünnung im Magen) darzustellen [1]. Der ADP/O-Quotient als Maß für die Effektivität der oxidativen Phosphorylierung wurde aus

den gemessenen Werten berechnet ( $\text{ADP-Menge}/\Delta\text{O}$ ). Die direkte Wirkung der o.g. Konzentrationen von Ilo und NG oder Zellkulturmedium alleine auf die Barrierefunktion wurde 48 h nach Inkubation mittels parazellulärer Fluorescein-5(6)-sulfonsäure-(FS)-Diffusion über eine Caco-2-Monolayer (humane epitheliale Colon-Adenokarzinomzelllinie) in der Transwell-Kammer als In-vitro-Modell der Darmschleimhaut untersucht (n=6 pro Gruppe). Die FS-Konzentration wurde spektrophotometrisch erfasst und angegeben als prozentuales Verhältnis basolateral/apikal. Die Daten sind angegeben als MW $\pm$ SD, 1-way ANOVA + Dunnett für multiple Vergleiche (\*p<0,05 vs. AW).

#### Ergebnisse

Ilo und NG reduzierten die maximale mitochondriale Atmung (State 3) bei der Stimulation über Komplex I und II konzentrationsunabhängig (Komplex I (Abb.1A): AW: 100%/2,0 $\pm$ 0,32 nmol/min/mg, Ilo 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ : 73 $\pm$ 13%\*/1,5 $\pm$ 0,35 nmol/min/mg, NG 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ : 62 $\pm$ 10%\*/1,2 $\pm$ 0,29 nmol/min/mg; AW: 100%/ 2,31 $\pm$ 0,51 nmol/min/mg, Ilo 0,1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ : 75 $\pm$ 11%\*/1,8 $\pm$ 0,45 nmol/min/mg, NG 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ : 77 $\pm$ 11%\*/1,8 $\pm$ 0,43 nmol/min/mg; Komplex II: AW: 100%/2,8 $\pm$ 0,98 nmol/min/mg, Ilo 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ : 70 $\pm$ 23%\*/1,9 $\pm$ 0,68 nmol/min/mg, NG 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ : 65 $\pm$ 13%\*/1,8 $\pm$ 0,75 nmol/min/mg; AW: 100%/2,96 $\pm$ 0,61 nmol/min/mg, Ilo 0,1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ : 72 $\pm$ 13%\*/2,0 $\pm$ 0,38 nmol/min/mg, NG 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ : 65 $\pm$ 9%\*/1,9 $\pm$ 0,43 nmol/min/mg). Ilo erhöhte den ADP/O-Quotienten in der niedrigeren Konzentration für Komplex II und in der höheren für beide Komplexe, NG erhöhte den ADP/O-Quotienten konzentrationsabhängig nur für Komplex I (Komplex I (Abb 1B): AW: 100%/1,6 $\pm$ 0,50, Ilo 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ : 148 $\pm$ 56%\*/2,2 $\pm$ 0,91, NG 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ : 166 $\pm$ 34%\*/2,5 $\pm$ 0,53, AW: 100%/1,4 $\pm$ 0,39, Ilo 0,1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ : 150 $\pm$ 57%\*/2,1 $\pm$ 0,85, NG 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ : 187 $\pm$ 135%\*/2,7 $\pm$ 1,79, Komplex II:

AW: 100%/1,3 $\pm$ 0,44, Ilo 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ : 150 $\pm$ 47%\*/1,9 $\pm$ 0,82, NG 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ : 130 $\pm$ 43%\*/1,7 $\pm$ 0,7, AW 100%/1,3 $\pm$ 0,33, Ilo 0,1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ : 189 $\pm$ 51%\*/2,4 $\pm$ 0,78, NG 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ : 149 $\pm$ 43%\*/1,9 $\pm$ 0,59). Beide Substanzen hatten keinen direkten Einfluss auf die FS-Permeabilität der Caco-2-Monolayer.

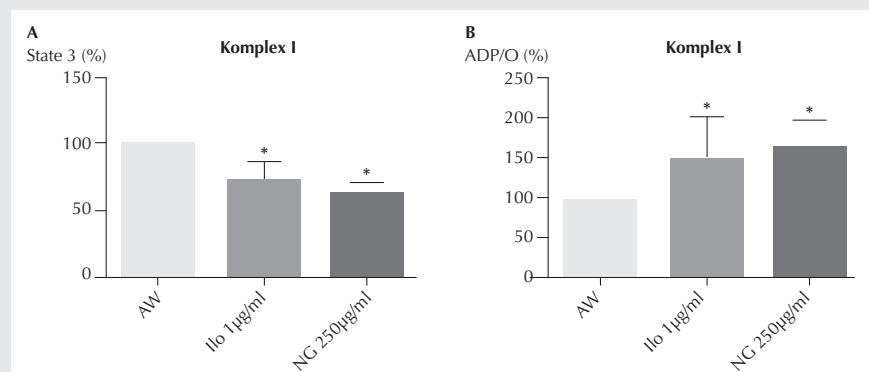
#### Interpretation

Ilo und NG reduzieren die ADP-induzierte Atmung, vermindern den mitochondrialen O<sub>2</sub>-Verbrauch und verbessern die Effektivität der oxidativen Phosphorylierung in intestinalen Mitochondrien. Eine verbesserte  $\mu\text{HbO}_2$  unter topischer Therapie mit Ilo und NG könnte somit durch die modifizierte mitochondriale Funktion bedingt sein. Ilo und NG haben keinen direkten Einfluss auf die FS-Permeabilität. Die in vivo beobachteten Effekte sind somit möglicherweise nicht durch einen direkten, schädigenden Einfluss von Ilo auf die Barrierefunktion bedingt. Die Verbesserung der Effektivität der oxidativen Phosphorylierung könnte teilweise die in vivo beobachtete Verbesserung der intestinalen Barrierefunktion durch NG erklären. Unklar bleibt, ob und ggf. wodurch dieser Effekt bei Ilo aufgehoben wird.

#### Literatur

1. Truse R, Weber A, Bauer I, Picker O, Vollmer C: Die topische Applikation von Nitroglycerin (NO) oder Iloprost (PGI<sub>2</sub>) verbessert die Oxygenierung der gastralen Mukosa während milder Hämorrhagie an Hunden. Anästh Intensivmed 2015;56:38
2. Okabe K, Malchesky PS, Nose Y: Protective effect of Prostaglandin I<sub>2</sub> on hepatic mitochondrial function of the preserved rat liver. Tohoku J Exp Med 1986;150:373-79
3. Dungal P, Haindl S, Behling T, Mayer B, Redl H, Kozlov AV: Neither nitrite nor nitric oxide mediate toxic effects of nitroglycerin on mitochondria. J Biochem Molecular Toxicology 2011;25:297-302.

Abbildung 1



A: State 3 für Komplex I, B: ADP/O für Komplex I. Daten sind dargestellt als prozentualer Anteil des Ausgangswerts (AW): MW $\pm$ SD, \*p<0,05 vs. AW.

### Der inhibitorische MHCI-Rezeptor Ly49Q auf neutrophilen Granulozyten ist notwendig für die Immunantwort bei der durch Klebsiella pneumoniae induzierten bakteriellen Pneumonie bei der Maus

J. Hillen · J. Rossaint · A. Zarbock · H. Block

Klinik für Anästhesiologie, operative Intensivmedizin und Schmerztherapie, Universitätsklinikum Münster

**Korrespondenz:** janhillen@uni-muenster.de

#### Fragestellung

Die bakterielle Pneumonie ist eine häufige Erkrankung bei kritisch kranken Patienten und geht mit einer hohen Letalität einher [1]. Hierbei kommt es zur Aktivierung des Immunsystems und zur Rekrutierung von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) in die Lunge [1]. Die Aktivierung von Integrinen (z.B. LFA1) auf PMNs ist hierfür essentiell. Die Bindung von Selektinen auf entzündeten Endothelzellen an den Rezeptor PSGL-1 auf PMNs führt zur Integrinaktivierung mit Induktion einer halboffenen Konformation, welche durch Bindung an das endotheliale Adhäsionsmolekül ICAM-1 die Rollgeschwindigkeit der PMNs auf dem Endothel vermindert. Die weitere Stimulation von PMNs mit Chemokinen induziert die offene Konformation der Integrine, welche durch eine höhere Bindungsaffinität zur festen Adhäsion der PMNs auf den Endothelzellen führt [2]. Anschließend erfolgt das intravasculäre Crawling der PMNs vor der Transmigration in das perivasculäre Gewebe [2]. Der inhibitorische MHC I Rezeptor Ly49Q ist vornehmlich auf PMNs exprimiert. Das Transmembranprotein Ly49Q enthält an seinem intrazellulären Schwanz eine inhibitorische ITIM- (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif-) Domäne, welche eine wichtige Funktion in der Regulation von intrazellulären Signalkaskaden im Rahmen der Immunantwort hat [3]. Die genaue Bedeutung von Ly49Q in diesem Prozess ist jedoch bis dato unbekannt. Ziel dieser

Studie war es, die Rolle von Ly49Q in der Integrinaktivierung und PMN-Rekrutierung sowie die funktionale Bedeutung für die Immunantwort zur Bekämpfung der bakteriellen Pneumonie zu untersuchen.

#### Methodik

Eine Pneumonie wurde bei Mäusen durch Instillation von *K. pneumoniae* induziert. Nach 24 Stunden wurden die Anzahl der PMNs in der bronchoalveolären Lavage (BAL) und im Lungengewebe sowie die Anzahl der Bakterien in der BAL, Lunge und Milz quantifiziert (n=4). Um die Leukozytenrekrutierung im M. cremaster in vivo zu untersuchen, wurden bei Wildtyp-Mäusen und Ly49Q<sup>-/-</sup> Mäusen die Rollgeschwindigkeit sowie die Anzahl der adhärenen und transmigrierten Leukozyten mit Hilfe der Intravitalmikroskopie 2 Stunden nach intrakrotaler Injektion von TNF $\alpha$  untersucht. In weiteren Experimenten wurde den Mäusen CXCL1 über einen Katheter intravasculär appliziert und der Leukozyten-Arrest über einen Zeitraum von 15 Minuten analysiert. Das Leukozyten-Crawling wurde in vivo mit Hilfe der Intravitalmikroskopie des M. cremaster unter CXCL1-Superperfusion sowie in vitro mit CXCL1-stimulierten PMNs in Flusskammern untersucht. Die statistische Signifikanz-Bestimmung erfolgte mittels One-way ANOVA und anschließendem Student-Newman-Keuls-Test oder t-Test. Das Signifikanz-Niveau wurde bei p<0,05 festgesetzt. Alle Tierversuche wurden von der Tierschutzkommission genehmigt.

#### Ergebnisse

Die Induktion einer bakteriellen Pneumonie führte bei Ly49Q<sup>-/-</sup> Mäusen zu einer vermehrten Rekrutierung von PMNs in die Lunge mit jedoch signifikant verminderter Transmigration in den Alveolarraum. In der Folge war bei Ly49Q<sup>-/-</sup> Mäusen die Bakterienlast in der BAL, im Lungengewebe und in der Milz signifikant höher als bei Wildtyp-Mäusen. In der Intravitalmikroskopie des M. cremaster zeigten Leukozyten bei Ly49Q<sup>-/-</sup> Mäusen verglichen mit WT Mäusen eine verminderte Rollgeschwindigkeit (6,2  $\pm$  1,2 vs. 2,3  $\pm$  0,7  $\mu$ m/s, p<0,001), eine

vermehrte Anzahl intravasculär adhärenter Leukozyten (782  $\pm$  167 vs. 1420  $\pm$  89 Zellen/mm<sup>2</sup>, p<0,01) bei gleichzeitig reduzierter Transmigration (10  $\pm$  2 vs. 4  $\pm$  1 Zellen/1,5  $\times$  104  $\mu$ m<sup>2</sup>, p<0,01). Die reduzierte Rollgeschwindigkeit von Ly49Q<sup>-/-</sup> PMNs konnte auch in vitro in Experimenten mit E-Selektin/ICAM-1 beschichteten Flusskammern bestätigt werden. Ly49Q<sup>-/-</sup> PMNs wiesen sowohl in vivo im M. cremaster als auch in vitro in Flusskammerexperimenten einen erhöhten Chemokin-induzierten Arrest auf. Das sich an den PMN-Arrest anschließende Crawling war bei Ly49Q<sup>-/-</sup> PMNs sowohl in vivo als auch in vitro vermindert. Des Weiteren war in vitro die Bindung von ICAM-1 an das Integrin LFA1 auf PMNs nach CXCL1-Stimulation in Ly49Q<sup>-/-</sup> PMNs erhöht.

#### Interpretation

Die Ergebnisse dieser Studie legen nahe, dass Ly49Q für eine regulierte PMN-Rekrutierung im Rahmen inflammatorischer Prozesse notwendig ist. In Abwesenheit von Ly49Q kommt es zu einer überschießenden Aktivierung des Integrins LFA1 mit verminderter Rollgeschwindigkeit und erhöhter intravasculärer Adhärenz von PMNs. Da aber im weiteren Verlauf auch das Lösen dieser initialen Integrin-Liganden-Bindung für das weitere Crawling und die Transmigration der PMNs in das entzündete Gewebe notwendig ist, führt die deregulierte Integrin-Überaktivierung in Ly49Q<sup>-/-</sup> Mäusen zu einer verminderten Transmigration in den Alveolarraum und zu einer schwerwiegenden Beeinträchtigung der Immunantwort.

#### Literatur

1. Matthay MA, Ware LB, Zimmermann GA: The acute respiratory distress syndrome. *J Clin Invest* 2012;122:2731-40
2. Philipson M, Kubes P: The neutropil in vascular inflammation. *Nat Med* 2011;17:1381-90
3. Blank U, Launay P, Benhamou M, Monteiro RC: Inhibitory ITAMs as novel regulators of immunity. *Immunol Rev* 2009;232:59-71.





### Einfluss von miRNAs auf die MHCII-Oberflächenexpression von MeljuSo-Zellen, einem Modellsystem für dendritische Zellen und Monozyten

M. Houseman\* · M. Staiger\* · P. Kunath · F. Stüber · C. Lippuner

Universitätsklinik für Anästhesiologie und Schmerztherapie, Inselspital Bern, Schweiz

**Korrespondenz:** christoph.lippuner@dkf.unibe.ch

#### Fragestellung

MHC-Klasse-II-Moleküle (MHCII) sind für die Präsentation von Antigenen an der Zelloberfläche von Monozyten und dendritischen Zellen essentiell. Durch die Präsentation von Antigen an T-Zellen kann eine spezifische Immunantwort oder eine Autoimmunerkrankung ausgelöst werden.

Die molekularen Mechanismen der Antigenpräsentation sind nur teilweise verstanden [1]. Klinische Studien zeigen, dass die Stärke der Oberflächenexpression von beladenem MHCII (HLA-DR) auf Monozyten nach einem operativen Trauma stark reduziert ist [2]. Diese Reduktion wird mit einer Schwächung des Immunsystems assoziiert und korreliert in Sepsis-Patienten stark mit der Überlebenschance [2]. Ein besseres Verständnis der molekularen Regulation der HLA-DR-Expression ist daher wichtig. Folgende zwei Hypothesen wurden getestet: miRNAs beeinflussen 1) die korrekte Beladung von MHC-II-Molekülen, 2) die HLA-DR-Oberflächenexpression.

#### Methodik

Der Einfluss der wichtigsten 2.048 miRNA-Mimics wurde in einem Hochdurchsatzver-

fahren mittels Durchflusszytometrie analysiert. Dafür wurden die miRNAs in eine Melanoma-Zelllinie (MelJuSo) transfiziert, und nach drei Tagen wurde eine Immunfluoreszenz-Färbung durchgeführt. Dabei wurden zwei direkt markierte monoklonale Antikörper verwendet: CerCLIP für nicht-korrekt beladene und L243 für korrekt beladene MHCII-Moleküle. Für ausgewählte miRNAs wurde zusätzlich mittels Durchflusszytometrie die HLA-DR-Totalexpression gemessen und die Verteilung der HLA-DR-Moleküle in der Zelle mikroskopisch dargestellt.

#### Resultate

Keine der untersuchten miRNAs führte zu einer starken Veränderung der Oberflächenexpression von nicht-korrekt beladenen MHCII-Molekülen ( $-2 < Z\text{-Score} < 2$ ). 45 miRNAs induzierten eine starke Hochregulation von HLA-DR an der Zelloberfläche ( $Z\text{-Score} > 2$ ), 6 miRNAs führten zu einer starken Erniedrigung der HLA-DR-Oberflächenexpression ( $Z\text{-Score} < -2$ ). 16 miRNAs wurden für weitere Untersuchungen selektioniert, und die Resultate konnten reproduziert werden. Im Gegensatz zur Oberflächenfärbung führen nicht alle miRNAs zu signifikanten Veränderungen der „Total-HLA-DR-Expression“ (Abb. 1). Die miRNAs 1253, 214-3p, 4753-5p und 193b-3p führten zwar zu einer stark erhöhten Oberflächenexpression von HLA-DR, die „Total-HLA-DR-Expression“ ist jedoch nicht verändert. Die Fluoreszenzmikroskopie zeigt weiter, dass gewisse miRNAs zu einem veränderten intrazellulären HLA-DR-Expressionsmuster führt.

#### Interpretation

miRNAs scheinen keinen signifikanten Einfluss auf die korrekte Beladung von MHCII-Molekülen zu haben. Im Gegensatz dazu führen verschiedene miRNAs zu starken Veränderungen der HLA-DR-Oberflächen-Expression (Erhöhung oder Erniedrigung). Es gibt verschiedene Möglichkeiten, wie die gefundenen miRNAs die Oberflächenexpression beeinflussen könnten: 1) direkte Interaktion mit den Transkripten von HLA-DR, 2) Interaktion mit Suppressoren/Enhancern des HLA-DR-Netzwerkes, 3) Beeinflussung von Faktoren, die die Lokalisation der HLA-DR-Moleküle in der Zelle bestimmen. In weiteren Studien müssen die genauen Mechanismen noch detaillierter aufgeklärt und die Resultate in primären Zellen und Patientenmaterial reproduziert werden.

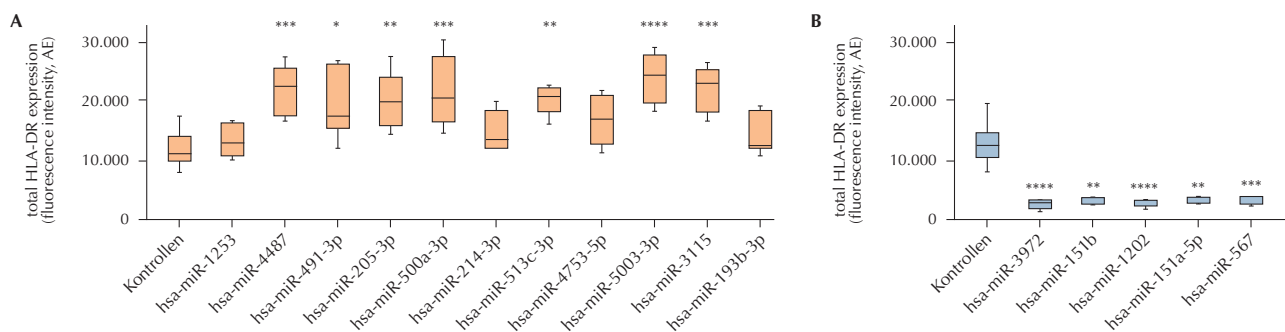
Durch die Studie wurde das Wissen bzgl. der Mechanismen der Antigenpräsentation erweitert, und langfristig könnten die Erkenntnisse helfen, das Immunsystem kritisch kranker Patienten positiv zu beeinflussen.

\* Gleichberechtigte Erstautoren

#### Literatur

1. Paul P, van den Hoorn T, Jongsma ML, Bakker MJ, Hengeveld R, Janssen L, et al: A Genome-wide multidimensional RNAi screen reveals pathways controlling MHC class II antigen presentation. *Cell* 2011;145:268-83
2. Wakefield CH, Carey PD, Foulds S, Monson JR, Guillou PJ: Changes in major histocompatibility complex class II expression in monocytes and T cells of patients developing infection after surgery. *Br J Surg* 1993;80:205-9.

Abbildung 1



Einfluss von miRNA auf die gesamte HLA-DR-Expression einer Zellen: **A)** ausgewählte miRNA-Hits, die zu einer starken Erhöhung und **B)** zu einer starken Erniedrigung der HLA-DR-Oberflächenexpression führen (sign. Unterschiede verglichen zu Kontrollen dargestellt, Kruskal-Wallis mit Dunn's Korrektur).

## Micro-RNA 125a inhibiert Chemotaxis und endotheliale Adhäsion humaner Monozyten in der Sepsis

M. Hübner · S. Hinske · S. Kreth

Klinik für Anaesthesiologie der Universität München

### Korrespondenz:

max.huebner@med.uni-muenchen.de

### Fragestellung

Monozyten spielen bei der Induktion und Aufrechterhaltung inflammatorischer Prozesse, wie z.B. der Sepsis, eine zentrale Rolle. Sie gelangen durch Chemotaxis, endotheliale Adhäsion und Transmigration an den Ort der Inflammation. Dies wird maßgeblich durch Chemokinrezeptoren und Adhäsionsmoleküle vermittelt, wobei die zugrundeliegenden Regulationsmechanismen noch weitgehend unbekannt sind [1,2]. Wir konnten bereits zeigen, dass miR-125a den Chemokinrezeptor 2 (CCR2) reguliert und dass diese Interaktion die monozytäre Chemotaxis beeinflusst. Da miRNAs bevorzugt innerhalb funktionaler Netzwerke agieren, sind wir nun der Frage nachgegangen, ob miR-125a auch die endotheliale Adhäsion und Diapedese beeinflusst, und welche weiteren Zielgene daran beteiligt sein könnten.

### Methodik

Primäre Monozyten gesunder Spender wurden mit miR-125a bzw. Kontroll-miR elektroporiert und für 24 h inkubiert. Danach wurde a) RNA extrahiert, mittels Microarray untersucht, und b) die Expression von CCR2 und JAML mittels real-time PCR (qPCR) bestimmt. Der 3'UTR des JAML-Gens wurde in einen Reportervektor kloniert. Das Konstrukt wurde mit miR-125a oder Kontroll-miR in HEK293-Zellen transfiziert; die Reporteraktivität wurde luminometrisch gemessen. Für Adhäsionsuntersuchungen wurden Monozyten mit miR-125a oder siRNA gegen JAML bzw. CCR2 oder Kontroll-miR/-siRNA transfiziert, nach 16h Inkubation mit 4µM Calcein AM inkubiert und über TNFα-aktivierte HUVECs perfundiert (shear rate: 5 dyn/cm<sup>2</sup>, Perfusionszeit: 45 Min). Anschließend wurde die Anzahl der am Endothel adhären den Zellen fluores-

zenzmikroskopisch und fluorometrisch quantifiziert. Vollblut-RNA (PAXGene) von Patienten mit Diagnose „Sepsis“ (Abnahme bis 2 h nach Diagnosestellung) und von gesunden Probanden wurde extrahiert, und die Expression von JAML, CCR2 sowie miR-125a wurde mittels qPCR bestimmt. Sämtliche benötigten Ethikvoten und Einverständniserklärungen lagen vor. Die statistische Auswertung erfolgte mittels t- bzw. Mann-Whitney-U-Test, angegeben sind Mittelwerte ± SD.

### Ergebnisse

Nach Auswertung des Microarrays wurde das Leukozyten-Adhäsionsmolekül JAML (Junction adhesion molecule like) als weiteres potentiell Zielgen der miR-125a identifiziert. Mittels Reporterexperimenten konnte eine direkte Regulation von JAML durch miR-125a nachgewiesen werden (Luciferase vs. Kontrolle -25,8 ± 5,8%; n=7; p<0,001). In einem Modell der monozytären Adhäsion unter inflammatorischen Bedingungen verringerte sich die Anzahl der am Endothel adhären den Monozyten nach Transfektion von miR-125a gegenüber der Kontrolle deutlich (Abb.1A; -33,4 ± 8,4%; n=3; p=0,018). Die eingesetzten primären humanen Monozyten wiesen nach Transfektion von miR-125a eine signifikant reduzierte Expression der JAML- und der CCR2-mRNA auf (-42,3 ± 7,7% bzw. -49,7 ± 5,6%, n=7-10, p<0,001). siRNA-Expe-

rimente zeigten, dass sowohl JAML als auch CCR2 für die Adhäsionsvorgänge essentiell ist. Bei Patienten in der Frühphase einer Sepsis zeigte sich in Immunzellen eine signifikante Induktion von CCR2 und JAML sowie eine signifikante Reduktion der miR-125a im Vergleich zu gesunden Probanden (Abb.1B; JAML: 1,65fach ± 0,1; n=34; p=0,033; CCR2: 2,57fach ± 0,4; n=34; p=0,011; miR-125a -43,7 ± 12,3% n=19; p=0,012).

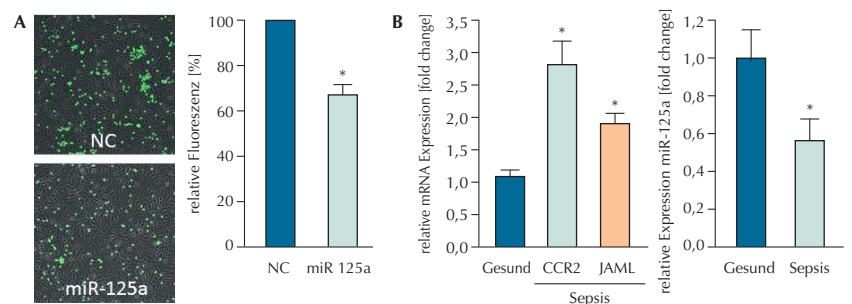
### Interpretation

miR-125a inhibiert über unterschiedliche Signalwege die Chemotaxis und Transmigration humaner Monozyten. In der Frühphase einer Sepsis findet sich eine verminderte miR-125a Expression, einhergehend mit einer verstärkten Expression der Adhäsion- und Chemotaxis-vermittelnden Zielgene JAML und CCR2. Damit kann miR-125a an der Entwicklung des hyperinflammatorischen Phänotyps einer frühen Sepsis beteiligt sein, was diagnostisch genutzt werden könnte.

### Literatur

- Gerhardt, T, Ley, K: Monocyte trafficking across the vessel wall. *Cardiovasc Res* 2015;107:321-30
- Weber, C, Fraemohs, L, Dejana, E: The role of junctional adhesion molecules in vascular inflammation. *Nat Rev Immunol* 2007;6:467-77.

Abbildung 1



**A:** Adhäsionsassay. Humane Primäre Monozyten wurden mit miR-125a bzw. Negativkontrolle transfiziert, mit Calcein fluoreszenzgelabelt und über TNFα-aktivierte Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs) perfundiert und anschließend die Calcein-Fluoreszenz quantifiziert.

**B:** mRNA-Expression von miR-125a und der miR-125a-Zielgene CCR2 und JAML in der Frühphase der Sepsis.

### Pharmakologische und genetische Inhibition von ADAM10 verringert den sekundären Hirnschaden nach traumatischer Hirnverletzung bei der Maus

R. Hummel<sup>1</sup> · L. Dangel<sup>1</sup> · M. Weidemeier<sup>1</sup> · M. Treiber<sup>1</sup> · R. Postina<sup>2</sup> · C. Werner<sup>1</sup> · K. Engelhard<sup>1</sup> · K. Endres<sup>3</sup> · M.K. Schäfer<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Klinik für Anästhesiologie, Universitätsmedizin Mainz

<sup>2</sup> Institut für Pharmazie und Biochemie, Universitätsmedizin Mainz

<sup>3</sup> Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie, Universitätsmedizin Mainz

Korrespondenz: rehummel@uni-mainz.de

#### Fragestellung

Die Matrixmetalloproteinase ADAM10 führt zur proteolytischen Spaltung und Aktivierung verschiedener Proteine, die eine Rolle in akuter oder chronischer Neurodegeneration spielen. Die Funktionen von ADAM10 und nachgeschalteter Prozesse nach traumatischer Hirnverletzung sind unvollständig aufgeklärt und könnten von therapeutischer Relevanz sein [1]. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden in der vorliegenden Studie die Auswirkungen der pharmakologischen und genetischen Inhibition von ADAM10 nach experimenteller traumatischer Hirnverletzung im Mausmodell untersucht.

#### Methodik

Alle Tierexperimente wurden nach Genehmigung durch das Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz durchgeführt. Durch einen rechtsparietalen controlled cortical impact (CCI) wurde unter Isoflurananästhesie eine traumatische Hirnschädigung induziert. Die systemische, pharmakologische Inhibition von ADAM10 erfolgte durch intraperitoneale Injektion von GI254023X (GI): 100 mg/kg Körpergewicht, 30 min und 24 h nach CCI; Scheinversuch (Vehikel n=9, GI n=7) vs. CCI (Vehikel n=11, GI n=12). Die genetische Inhibition von ADAM10 wurde durch konstitutiv neuronale Überexpression einer dominant-negativen, katalytisch inaktiven ADAM10-Proteinmutante (ADAM10-DN) erreicht [2]; Scheinversuch (Wildtyp (WT) n=8, ADAM10-DN n=7) vs. CCI (WT n=9, ADAM10-DN n=10). Die Gehirne wurden nach sieben Tagen Überlebenszeit für (immun-) histologische, molekularbiologische und bioche-

mische Analysen prozessiert. Vor und nach Trauma wurden sensorimotorische (Rotarod) und neurologische (Neuro-Defizit-Score) Untersuchungen durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte bei parametrischer Verteilung mittels t-Test, bei nicht-parametrischer Verteilung mittels Mann-Whitney-U-Test (Signifikanz bei  $p < 0,05$ , Mittelwerte  $\pm$  SEM).

#### Ergebnisse

Der histopathologische Hirnschaden war sieben Tage nach Trauma in GI behandelten Mäusen und in ADAM10-DN-Mausmutanten signifikant vermindert (Vehikel:  $17,5 \text{ mm}^3 \pm 0,89$  vs. GI:  $15,2 \text{ mm}^3 \pm 0,88$ ,  $p=0,037$ ; WT:  $21,5 \text{ mm}^3 \pm 0,98$  vs. ADAM10-DN:  $17,5 \text{ mm}^3 \pm 0,99$ ,  $p=0,0108$ ; Abb. 1). Die systemische, pharmakologische Inhibition von ADAM10 führte im Gegensatz zur genetischen Inhibition zu einer verbesserten sensorimotorischen Koordination an Tag 7 (Vehikel:  $65,8 \text{ sec} \pm 6,2$  vs. GI:  $95,8 \text{ sec} \pm 8,6$ ,  $p=0,011$ ). Funktionelle neurologische Defizite waren durch die Inhibition von ADAM10 im Vergleich zu Vehikel behandelten oder Wildtyp Tieren nicht beeinflusst. Die pharmakologische und genetische Inhibition von ADAM10 hatte sieben Tage nach Trauma keinen Einfluss auf die

CCI-induzierte Erhöhung der mRNA-Expression pro-inflammatorischer Zytokine (TNF $\alpha$ , Interleukin-1 $\beta$ ) und die Steigerung von Astrozyten- (GFAP) und Mikroglia markern (Iba1, Arg1). Das APP-Spaltfragment APPs $\alpha$  war bei ADAM10-DN-Mäusen nach Scheinbehandlung reduziert, aber unverändert nach CCI im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen.

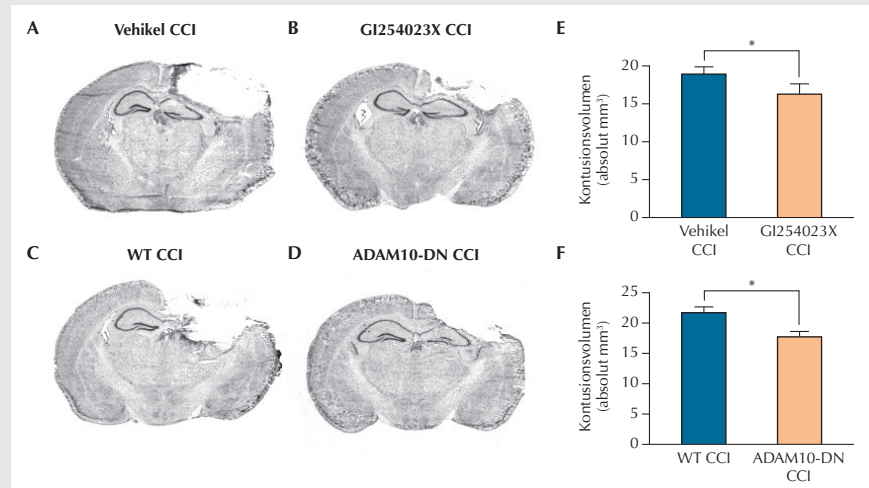
#### Interpretation

Die Ergebnisse zeigen, dass die Inhibition von ADAM10 eine potentielle Therapiemöglichkeit darstellt, um den traumatischen sekundären Hirnschaden positiv zu beeinflussen. Weder die Aktivierung von Astro- und Mikroglia noch die potentiell neuroprotektive Funktion von APPs $\alpha$  [3] scheinen bei der Maus zur Verminderung des Hirnschadens nach genetischer und pharmakologischer Hemmung von ADAM10 beizutragen.

#### Literatur

1. Yang P, et al: Progress in Neurobiology 2006;79:73-94
2. Postina R, et al: The Journal of Clinical Investigation 2004;113:1456-64
3. Plummer S, et al: Aging and Disease 2016;7:163-79.

Abbildung 1



Histopathologischer Hirnschaden nach systemischer und genetischer Inhibition von ADAM10. (A-D) Kresylviolett-gefärbte koronare Hirschnitte nach CCI in Vehikel und GI behandelten Mäusen bzw. an WT- und ADAM10-DN-Mäusen. (E, F) Diagramm des absoluten histo-pathologischen Hirnschadensvolumen sieben Tage nach CCI.

(Vehikel CCI n=11, GI CCI n=12, WT CCI n=9, ADAM10-DN CCI n=10, Mann-Whitney U- und t-Test, \*  $p < 0,05$ ).

### Nav1.7 Knockout verstärkt die Effektivität von Opioiden, während die Serotonin-induzierte Sensitivierung synergistisch reduziert ist

J. Isensee<sup>1</sup> · L. Krahé<sup>1</sup> · K. Moeller<sup>1</sup> · V. Pereira<sup>2</sup> · J. E. Sexton<sup>2</sup> · X. Sun<sup>2</sup> · E. Emery<sup>2</sup> · J. N. Wood<sup>2</sup> · T. Hucho<sup>1</sup>

- 1 Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin, experimentelle Anästhesiologie und Schmerzforschung, Uniklinik Köln
- 2 Molecular Nociception Group, WIBR, University College London, Großbritannien

**Korrespondenz:** joerg.isensee@uk-koeln.de

#### Fragestellung

Mutationen mit Funktionsverlust des spannungsabhängigen Natriumkanals  $Na_v1.7$  führen zu lebenslanger Schmerzinsensitivität bei Maus und Mensch. Kürzlich wurde nachgewiesen, dass das endogene Opioid met-Enkephalin in sensorischen Neuronen konditionaler  $Na_v1.7$ -defizienter Mäuse (Advillin-Cre) verstärkt exprimiert wird [1]. Die Behandlung mit dem Opioidrezeptor-Antagonisten Naloxon führte zur partiellen Rekonstitution der Schmerz Wahrnehmung sowohl bei  $Na_v1.7$ -defizienten Mäusen als auch beim Menschen [1]. Es verblieb jedoch unklar, ob  $Na_v1.7$ -Defizienz nur die verstärkte Expression von sezernierten Opioiden bewirkt oder auch intrazelluläre pro- und anti-nozizeptive Signalwege reguliert werden.

#### Methodik

Für die hier vorgestellte zelluläre Analyse von pro- und anti-nozizeptiven Signalkaskaden in primären nozizeptiven Neuronen haben wir erstmalig einen "High Content Screening"-Mikroskopie-basierten Test etabliert [3,4], der die Analyse der Aktivität von endogenen Opioidrezeptoren in hundertausenden von Zellen auf Einzelzellniveau ermöglicht. Es wurden die Effekte von pronozizeptiven Mediatoren (Serotonin, Prostazyklin, Forskolin, cAMP) und Opioiden (DAMGO, Fentanyl) auf die immunzytochemisch dargestellten phospho-RII (pRII)-Signale der endogenen Typ-II-Protein-Kinase-A (PKA-II) als direktes Korrelat der PKA-Aktivität an konditionalen  $Na_v1.7$ - und  $Na_v1.8$ -defizienten (Advillin-Cre) Mäusen untersucht. Zudem wurden tetrodotoxin-resistente Ströme nach Zugabe von

Opioiden an sensorischen Neuronen  $Na_v1.7$ -defizienter Mäuse mittels Elektrophysiologie vermessen.

#### Ergebnisse

In nozizeptiven Neuronen  $Na_v1.7$ -defizienter Mäuse war die maximale Amplitude der pronozizeptiven Signaltransduktion durch Serotonin über  $G_{\alpha_i}$ /cAMP/PKA-gekoppelte 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoren um 37% verringert ( $n=5$ ,  $F_{1,64}=53,6$ ,  $p<0,0001$ , Extra-sum-of-squares F-Test). Auch die Expression der regulatorischen PKA-Untereinheit RII $\beta$  war in  $Na_v1.7$ -defizienten sensorischen Neuronen um 11% verringert ( $n=5$ ,  $p<0,0001$ , Zweifaktorielle ANOVA mit Bonferroni's Test). Andererseits war die Effizienz der anti-nozizeptiven Signaltransduktion durch  $G_{\alpha_i}$ -gekoppelte Opioidrezeptoren deutlich erhöht. Während Opiode bei Wildtyp-Mäusen die Serotonin-induzierte pRII-Intensität auf maximal 50% reduzierten, konnten bei  $Na_v1.7^{-/-}$ -Mäusen rund 80% dieses Signals mit Opioiden geblockt werden ( $n=4$ ;  $F_{2,56}=13,6$ ,  $p<0,0001$  für die Dosis-Wirkungskurve; Extra-sum-of-squares F-Test). Dieser Effekt war unabhängig vom stimulierenden Rezeptor, da auch die Forskolin-induzierte PKA-II-Aktivität bei  $Na_v1.7^{-/-}$  Neuronen durch Opiode effektiver blockiert werden konnte. Diese synergistische Regulation der Signalwege bewirkte die verstärkte Inhibition von Tetrodotoxin-resistente Ströme durch Opiode.

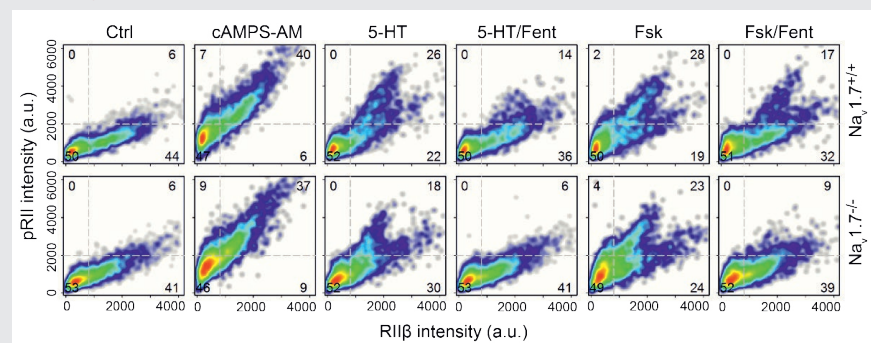
#### Interpretation

Die Ergebnisse zeigen, dass  $Na_v1.7$  die Balance von pro- und anti-nozizeptiver Signaltransduktion reguliert. Der Verlust von  $Na_v1.7$  führt zu einer Verschiebung dieser Balance in Richtung anti-nozizeptiver Signaltransduktion und erlaubt die nahezu vollständige Blockade von PKA-Signalwegen. Dieser Mechanismus suggeriert, dass  $Na_v1.7$  Inhibitoren potente Schmerzadjuvantien sind, die den durch Opiode erreichbaren analgetischen Endpunkt verbessern können.

#### Literatur

1. Minett, MS, Pereira V, Sikandar S, Matsuyama A, Lollignier S, Kanellopoulos AH, et al: Endogenous opioids contribute to insensitivity to pain in humans and mice lacking sodium channel Nav1.7. Nat Commun 2015;6: 8967
2. Isensee J, Diskar M, Waldherr S, Buschow R, Hasenauer J, Prinz A, et al: Pain modulators regulate the dynamics of PKA-RII phosphorylation in subgroups of sensory neurons. J Cell Sci 2014;127:216-29
3. Isensee J, Wenzel C, Buschow R, Weissmann R, Kuss AW, Hucho T: Subgroup-Elimination Transcriptomics Identifies Signaling Proteins that Define Subclasses of TRPV1-Positive Neurons and a Novel Paracrine Circuit. PLoS One 2014;9(12):e115731.

Abbildung 1



Einzelzelldaten von pRII/RII $\beta$ -gefärbten sensorischen Neuronen aus Wildtyp- und konditionalen  $Na_v1.7^{-/-}$ -Mäusen nach Stimulation mit Sp-8-Br-cAMPS-AM (10  $\mu$ M), 5-HT (250 nM) oder Fsk (2  $\mu$ M) alleine oder in Kombination mit Fentanyl (400 nM). Dargestellt sind Wahrscheinlichkeitsdichteverteilungen von >2.500 Neuronen pro Kondition aus  $n=4$  Experimenten. Die Zahlen in den Quadranten repräsentieren die Anzahl der Zellen in (%).

### Amisulprid senkt das Auftreten von postoperativer Übelkeit und postoperativem Erbrechen im Rahmen einer perioperativen Kombinationsprophylaxe

Y. Jelting<sup>1</sup> · T. J. Gan<sup>2</sup> · G. Fox<sup>3</sup> · L. Eberhart<sup>4</sup> · P. Diemunsch<sup>5</sup> · S. Weibel<sup>1</sup> · M. Kredel<sup>1</sup> · P. Kranke<sup>1</sup> für die DP10017-Studiengruppe

- 1 Universitätsklinikum Würzburg
- 2 Stony Brook Medicine New York, USA
- 3 Acacia Pharma Cambridge (Sponsor)
- 4 Universitätsklinikum Marburg
- 5 Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Frankreich

**Korrespondenz:** Jelting\_Y@ukw.de

#### Fragestellung

Postoperative Übelkeit und postoperatives Erbrechen (PONV) tritt ohne wirksame Prophylaxe mit einer Inzidenz von rund 30% nach Allgemeinanästhesien auf. Besonders bei Hochrisikopatienten mit einer Inzidenz von bis zu 80% ist eine multimodale Antiemetikaprophylaxe erforderlich, um die Wahrscheinlichkeit eines PONV-Ereignisses bedeutsam zu senken [1]. Für Amisulprid, einen Dopaminantagonisten mit gutem Verträglichkeitsprofil, konnte die Wirksamkeit als Monoprophylaxe bereits gezeigt werden [2,3]. Das Ziel dieser Studie bestand nun darin, die Wirksamkeit und das Nebenwirkungsprofil von Amisulprid als Kombinationsprophylaxe zusammen mit einem anderen Antiemetikum im Rahmen einer Phase-III-Studie zu evaluieren.

#### Methodik

Nach Erhalt eines positiven Ethikvotums wurden Patienten, die sich einem chirurgischen Eingriff (Anästhesiedauer  $\geq 1$  Stunde) in Allgemeinanästhesie mit volatilem Anästhetikum unterzogen und mindestens drei Risikofaktoren für PONV (weibliches Geschlecht, Nichtraucher-Status, PONV nach früheren Narkosen/Reisekrankheit, erwartete postoperative Opioid-Gabe) aufwiesen, bei Vorliegen des schriftlich dokumentierten Einverständnisses in die Studie eingeschlossen. Die Randomisierung wurde mit verborgener Zuordnung durchgeführt. Nach Narkoseeinleitung wurden den Studienteilnehmern entweder 5 mg Amisulprid oder das gleiche Volumen eines Placebos intravenös zusätzlich zu einem weiteren Antiemetikum (4 mg Ondansetron oder 4 mg Dexamethason) über 1 Minute intravenös verabreicht, wobei die Anwendung des Prüfmedikamentes doppelt-verblindet erfolgte. Der primäre Endpunkt war erreicht, wenn innerhalb von 24 Stunden nach OP-Ende kein Erbrechen oder Würgen aufgetreten und keine Gabe einer antiemetisch wirkenden Medikation (Rescue-Medikation) erforderlich war. Als sekundärer Endpunkt waren unter anderem das Auftreten von signifikanter Übelkeit, das Auftreten von Erbrechen sowie die Verwendung von Rescue-Medikation definiert. Eine Studienregistrierung erfolgte bei ClinicalTrials.gov (NCT 02337062).

meinanästhesie mit volatilem Anästhetikum unterzogen und mindestens drei Risikofaktoren für PONV (weibliches Geschlecht, Nichtraucher-Status, PONV nach früheren Narkosen/Reisekrankheit, erwartete postoperative Opioid-Gabe) aufwiesen, bei Vorliegen des schriftlich dokumentierten Einverständnisses in die Studie eingeschlossen. Die Randomisierung wurde mit verborgener Zuordnung durchgeführt. Nach Narkoseeinleitung wurden den Studienteilnehmern entweder 5 mg Amisulprid oder das gleiche Volumen eines Placebos intravenös zusätzlich zu einem weiteren Antiemetikum (4 mg Ondansetron oder 4 mg Dexamethason) über 1 Minute intravenös verabreicht, wobei die Anwendung des Prüfmedikamentes doppelt-verblindet erfolgte. Der primäre Endpunkt war erreicht, wenn innerhalb von 24 Stunden nach OP-Ende kein Erbrechen oder Würgen aufgetreten und keine Gabe einer antiemetisch wirkenden Medikation (Rescue-Medikation) erforderlich war. Als sekundärer Endpunkt waren unter anderem das Auftreten von signifikanter Übelkeit, das Auftreten von Erbrechen sowie die Verwendung von Rescue-Medikation definiert. Eine Studienregistrierung erfolgte bei ClinicalTrials.gov (NCT 02337062).

#### Ergebnisse

Von Februar bis September 2015 wurden an 29 Zentren in Deutschland, Frankreich und den USA 1.297 Patienten in die Studie eingeschlossen, von denen 1.204 randomisiert und 1.147 (mITT = modified intention-to-treat) für den primären Endpunkt analysiert werden konnten. 57,7% aller Patienten (95%-Konfidenzintervall [KI] 54-62%) in der Amisulpridgruppe erreichten den primären Endpunkt im Vergleich zu 46,6% (KI 43-51%) in der Placebogruppe ( $p < 0,001$ ). Signifikante Übelkeit ( $\geq 4$  auf einer 11-Punkt VRS) trat in der Amisulpridgruppe bei 37,1% (33-41%) der

Patienten auf, in der Placebogruppe bei 47,7% (44-52%) ( $p < 0,001$ ). Erbrechen oder Würgen wurde bei 13,8% (11-17%) der Amisulprid- und 20,0% (17-23%) der Placebopatienten berichtet ( $p = 0,003$ ). Rescue-Medikation wurde in 40,9% (37-45%, Amisulprid) bzw. 49,4% (45-53%, Placebo) aller Fälle gegeben ( $p = 0,002$ ). Die Inzidenz von Nebenwirkungen, Laborabweichungen und EKG-Veränderungen war in beiden Gruppen gleich.

#### Interpretation

Amisulprid ist hinsichtlich des Auftretens von PONV bei Hochrisikopatienten auch im Rahmen einer Kombinationstherapie mit einem anderen wirksamen Antiemetikum gegenüber Placebo überlegen. Die Nebenwirkungsrate in Bezug auf relevante Endpunkte unterschied sich nicht. Aufgrund der vorliegenden Daten erscheint Amisulprid als vielversprechende neue antiemetische Substanz im Rahmen eines multimodalen Ansatzes zur Prävention von PONV bei Hochrisikopatienten.

#### Literatur

1. Gan TJ, Diemunsch P, Habib AS, Kovac A, Kranke P, Meyer TA, et al: Consensus guidelines for the management of postoperative nausea and vomiting. *Anesth Analg* 2014;118(1):85-113
2. Gan T, Kranke P, Minkowitz H, Bergese S, Motsch J, Eberhart L, et al: Intravenous Amisulpride for the Prevention of Postoperative Nausea and Vomiting: Two Concurrent, Randomized, Double-blind, Placebo-controlled Trials. *Anesthesiology* 2017;126(2):268-75
3. Kranke P, Eberhart L, Motsch J, Chassard D, Wallenborn J, Diemunsch P, et al: I.V. APD421 (amisulpride) prevents postoperative nausea and vomiting: a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial. *Br J Anaesth* 2013;111(6):938-45.

## Sonoelastographisches Monitoring der muskulären Reaktion nach lokaler Halothan-Applikation bei Schweinen mit Veranlagung zur malignen Hyperthermie

S. Johannsen · I. Türkmeneli · S. Isbary · N. Roewer · F. Schuster

Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie, Universitätsklinikum Würzburg

Korrespondenz: johannsen\_s@ukw.de

### Fragestellung

Halothan induziert bei Patienten mit Veranlagung zur malignen Hyperthermie (MH) eine gesteigerte sarkoplasmatische Kalziumfreisetzung und führt zu einer muskulären Kontraktur im In-vitro-Kontrakturstest. Bereits gezeigt wurde, dass eine intramuskuläre Laktatmessung nach lokaler Halothaninjektion zur Differenzierung zwischen MH-veranlagten (MHS) und nicht MH-veranlagten (MHN) Individuen geeignet ist.[1] Sonoelastographie ermöglicht nicht-invasiv und in Echtzeit, die mechanischen Eigenschaften von Gewebe zu visualisieren und zu quantifizieren [2]. In dieser Studie verglichen wir mittels Scherwellenelastographie Muskelhärteveränderungen bei MHS- und MHN-Schweinen nach intramuskulärer Halothan-Applikation.

### Methodik

Nach Genehmigung des Versuchsvorhabens durch die Regierung von Unterfranken wur-

den 16 Schweine (9 MHS, 7 MHN) untersucht. Unter kontinuierlichem Monitoring von EKG, SpO<sub>2</sub>, arteriellem Blutdruck und Körpertemperatur wurden speziell gefertigte Mikrodiagnostiksonden mit integriertem Zuspritzkatheter unter sonographischer Kontrolle im M. gracilis platziert und mit Ringerlösung (1 µl/min) perfundiert. Die Scherwellenelastographie erfolgte quantitativ (Young-Elastizitätsmodul in kPa) mittels Aixplorer® (Fa. Supersonic Imagine, Frankreich). Nach initialer Elastographiemessung im Muskelareal um die jeweilige Sonde wurden über den Zuspritzkatheter 300 µl Halothan-Sojabohnenöl-Gemisch in unterschiedlichen Konzentrationen (0; 1; 2,5; 5 und 10 Vol.-%) appliziert. Elastographiemessungen wurden 1, 5, 15, 30, 45 und 60 Minuten nach Injektion wiederholt und die Elastizitätsdifferenz zum Ausgangswert ermittelt. Zusätzlich wurde die lokale Laktatkonzentration aus dem Dialysat photospektrometrisch in 15-Minuten-Intervallen bestimmt. Ergebnisse sind als Median und Quartilenspanne angegeben, die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test, p<0,05 wurde als statistisch signifikant angenommen.

### Ergebnisse

Nach Injektion von Halothan in den Dosierungen 2,5 und 5 Vol.-% kam es bei MHS- im Vergleich zu MHN-Tieren zu einer signifikanten Zunahme der elastographisch gemessenen Härte im untersuchten Muskelareal (2,5 Vol.-%: 64 (39;148) vs. 2 (-44;9) kPa; 5 Vol.-%: 97 (31;148) vs. 1 (-9;14) kPa). Die Maximaldosis von 10 Vol.-% führte zu einem

Härteanstieg in beiden Gruppen. Die parallel erhobenen intramuskulären Laktatkonzentrationen zeigten signifikante Unterschiede zwischen MHS und MHN nach 1 Vol.-% (2,3 (1,9;2,8) vs. 0,7 (0,5;0,8) mmol/l) und 2,5 Vol.-% (2,8 (1,9;4,4) vs. 0,6 (0,6;0,7) mmol/l), während bei 5 und 10 Vol.-% in beiden Gruppen deutlich erhöhte Laktatwerte nachgewiesen wurden. Die Kontrolle ohne Halothan führte weder zu Elastizitäts- noch zu Laktatveränderungen (Abb.1).

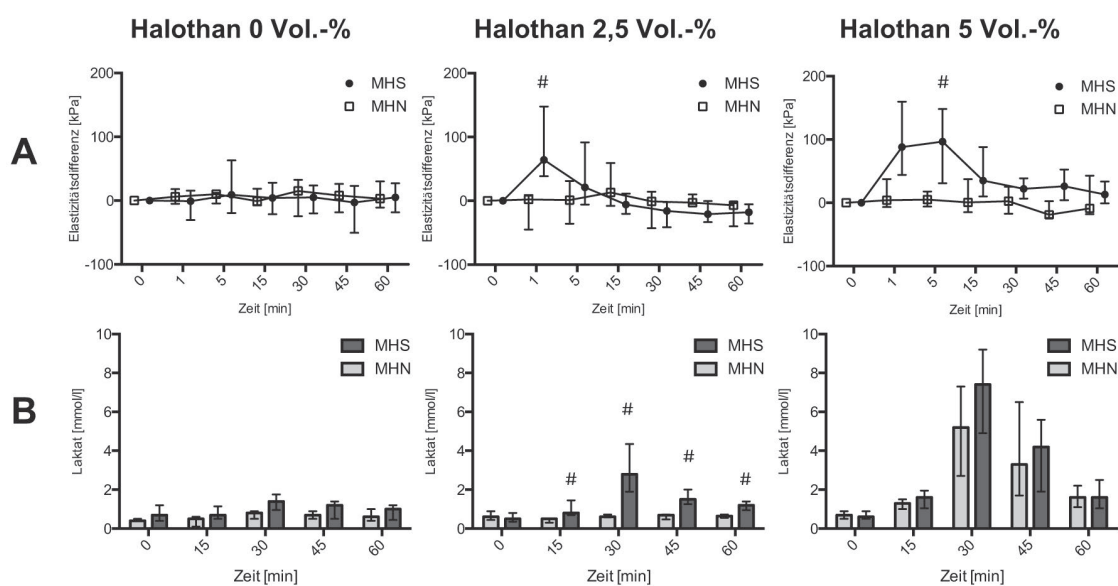
### Interpretation

Die elastographisch nachgewiesenen muskulären Reaktionen ermöglichen ebenso wie die mit zeitlicher Latenz durch den Laktatanstieg bestätigten metabolischen Effekte eine Differenzierung zwischen MHS- und MHN-Tieren. Scherwellenelastographie stellt damit eine vielversprechende Technik zur minimal-invasiven Diagnostik einer MH-Veranlagung in Echtzeit dar.

### Literatur

- Schuster F, Scholl H, Hager M, Müller R, Roewer N, Anetseder M: The dose-response relationship and regional distribution of lactate after intramuscular injection of halothane and caffeine in malignant hyperthermia-susceptible pigs. *Anesth Analg* 2006;102:468-472
- Klauser AS, Miyamoto H, Bellmann-Weiler R, Feuchtnr GM, Wick MC, Jaschke WR: Sonoelastography: musculoskeletal applications. *Radiology* 2014;272:622-33.

Abbildung 1



Sonoelastographisch gemessene Veränderung der lokalen Muskelhärte (A) und intramuskuläre Laktatkonzentrationen (B) nach intramuskulärer Applikation unterschiedlicher Halothankonzentrationen. Daten als Median und Quartilenspanne, #: p<0,05 für MHS vs. MHN.

### Rosuvastatin reduziert zerebralen oxidativen Stress und Inflammation im experimentellen akuten Lungenschaden im Schweinemodell

J. Kamuf<sup>1</sup> · A. Garcia Bardon<sup>1</sup> · A. Ziebart<sup>1</sup> · M. Dib<sup>2</sup> · A. Daiber<sup>2</sup> · S.C. Thal<sup>1</sup> · E.K. Hartmann<sup>1</sup>

1 Klinik für Anästhesiologie, Universitätsmedizin Mainz

2 Medizinische Klinik, Universitätsmedizin Mainz

Korrespondenz: kamuf@uni-mainz.de

#### Fragestellung

Für verschiedene Organe wie Hirn, Herz oder Niere konnte gezeigt werden, dass Schäden an ihnen auch zu Schäden an weiter entfernten Organen führen können – ein Mechanismus, der als „Organ-Crosstalk“ bezeichnet wird. Auch beim Acute respiratory distress syndrome (ARDS) scheint ein Organ-Crosstalk stattzufinden, da viele Patienten nach überstandener ARDS neurokognitive Defizite aufweisen [1]. Hinsichtlich der Mechanismen eines schädigenden Organ-Crosstalks zwischen Lunge und Gehirn werden derzeit verschiedene Theorien diskutiert, u.a. eine Transmission inflammatorischer Marker. HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren („Statine“) sind eine Medikamentengruppe mit pleiotropen Wirkmechanismen, die nicht nur eine Reduktion der Blutcholesterinkonzentration bewirken, sondern auch antioxidative und antiinflammatorische Effekte zeigen. Obwohl Statine das primäre Behandlungsergebnis des ARDS im Sinne einer Mortalitätsreduktion nicht verbessern [2], sind neuroprotektive Effekte von Statinen bislang kaum untersucht. Wir vermuteten daher, dass ein aseptischer, experimenteller Lungenschaden zu nachweisbarer zerebraler Inflammation mit morphologischen und oxidativen Schäden führt, welche durch eine Behandlung mit Rosuvastatin reduziert werden können.

#### Methodik

Nach behördlicher Genehmigung (Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz, TVA G

14-1-077) wurden 32 Schweine randomisiert einer von vier Gruppen zugeteilt: ARDS per zentralvenöser Ölsäure-Injektion (OAI), Statinbehandlung vor (40 mg p.o.) und nach OAI-ARDS (1 mg/kg i.v.) (Stat<sub>pre</sub>), Statinbehandlung nach OAI-ARDS (1mg/kg i.v.) (Stat<sub>post</sub>) oder Kontrollgruppe ohne ARDS (Ktr). Die Tiere wurden anästhesiert, kontrolliert beatmet und nach ARDS-Induktion anhand eines an der humanen Intensivmedizin angelehnten Standardprotokolls für 18 h behandelt. Hinsichtlich der Interventionsgruppen (OAI, Stat<sub>pre</sub>, Stat<sub>post</sub>) waren die Behandler verblindet. Post mortem wurden verschiedene Gehirn-Areale (Cortex, Hippocampus) histopathologisch (Neuronenzahl, Mikrogliazahl) und molekularbiologisch (real-time PCR: IL-6, TNF-alpha, IL-1β, IL-8, iNOS; Dot Blot: 3-Nitrotyrosin) untersucht. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (einfaktorielle ANOVA) und Post-hoc-Korrektur (Holm-Sidak). Ein p<0,05 wurde als signifikant angesehen.

#### Ergebnisse

Hinsichtlich Neuronenzahl und Mikrogliaaktivierung unterschieden sich die Gruppen nicht. Die mRNA-Expression von IL-6 im Hippocampus war in der OAI-Gruppe (p=0,049), nicht jedoch in den Gruppen Stat<sub>pre</sub> und

Stat<sub>post</sub> im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht (Abb. 1, links). Im zerebralen Cortex fanden sich zudem signifikant erhöhte 3-Nitrotyrosinspiegel (p=0,02) als Surrogat für oxidativen Stress, die durch Stat<sub>pre</sub> (p=0,02) signifikant gemindert werden konnten (Abb. 1, rechts). Weitere untersuchte Parameter (TNF-alpha, IL-1β, IL-8, iNOS) unterschieden sich nicht in relevanter Weise. Hinsichtlich physiologischer Parameter fand sich kein Unterschied zwischen den Gruppen.

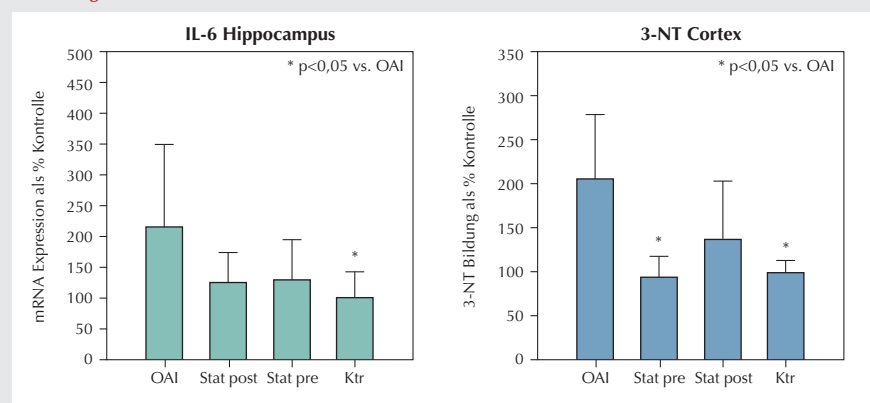
#### Diskussion

Im experimentell-aseptischen ARDS lassen sich bereits in der Frühphase (<24 h) erste Anzeichen zerebraler Cytokinbildung und oxidativen Stresses nachweisen. Diese gehen jedoch nach 18 h nicht mit einer histopathologisch detektierbaren zerebralen Schädigung einher. Die Behandlung mit Rosuvastatin attenuiert die Phänomene. Daher könnten Statine eine Rolle bei der additiven Neuroprotektion im ARDS haben.

#### Literatur

1. Mikkelsen, et al: Am J Respir Crit Care Med 2012;185(12):1307-15
2. Xiong, et al: Respirology 2016;21(6):1026-33.

Abbildung 1



Zerebrale Expression von IL-6 (Hippocampus) und Nachweis von 3-Nitrotyrosin (Cortex).

### Einfluss von Spontanatmungsaktivität auf die mittels Positronen-Emissions-Tomographie gemessene pulmonale neutrophilische Inflammation im tierexperimentellen schweren akuten Lungenversagen

T. Kiss · T. Bluth · A. Braune · R. Huhle · M. Herzog · A. Güldner · T. Koch · M. Gama de Abreu

Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie, Universitätsklinikum Carl Gustav Carus, Dresden

#### Korrespondenz:

Thomas.Kiss@uniklinikum-dresden.de

#### Fragestellung

Spontanatmung während invasiver Beatmung kann im schweren akuten Lungenversagen (ARDS) zum zyklischen Alveolarkollaps sowie zur Überdehnung führen und dadurch die Lunge schädigen. Es ist unklar, ob diese Schädigung durch eine inadäquate Einstellung des positiv endexpiratorischen Beatmungsdruckes (PEEP) bedingt ist. In dem vorliegenden tierexperimentellen Modell des schweren ARDS formulierten wir die Hypothese, dass Spontanatmungsaktivität auf einem PEEP-Niveau, welches abhängige Lungenareale stabilisiert, die neutrophilische Lungeninflammation reduziert. Die Aufnahme von  $^{18}\text{F}$ -Fluorodesoxyglucose (FDG), gemessen mittels Positronen-Emissions-Tomographie/Computertomographie (PET), diente dabei als Surrogat für die neutrophilische Inflammation.

#### Methodik

Eine behördliche Genehmigung lag vor. Bei 24 anästhesierten und intubierten Hausschweinen wurden individuell angefertigte Pleura-drucksensoren thorakoskopisch in abhängigen und nicht-abhängigen Lungenarealen platziert. Die Induktion des ARDS erfolgte

durch 8 Lungenlavagen mit isotonischer Kochsalzlösung, gefolgt von einer Beatmung mit  $\text{PEEP}=0 \text{ cmH}_2\text{O}$  und Inspirationsdruck  $=30 \text{ cmH}_2\text{O}$  bis zum Erreichen eines Ziel  $\text{P}_a\text{O}_2/\text{F}_i\text{O}_2 < 100 \text{ mmHg}$ . Nach einem Lungenrekrutierungsmanöver (RM) wurde der PEEP auf  $26 \text{ cmH}_2\text{O}$  gesetzt, in  $2 \text{ cmH}_2\text{O}$ -Schritten bis auf  $6 \text{ cmH}_2\text{O}$  reduziert und die transpulmonalen Drücke aufgezeichnet. Der best-PEEP wurde bei einem end-expiratorischen transpulmonalen Druck größer  $0 \text{ cmH}_2\text{O}$  in allen Lungenregionen ermittelt. Die Tiere wurden randomisiert einer von 4 Gruppen zugeordnet. Der best-PEEP wurde jeweils um  $4 \text{ cmH}_2\text{O}$  erhöht bzw. reduziert. Damit ergaben sich folgende Gruppen: „C+“ mit  $+4 \text{ cmH}_2\text{O}$  und „C-“ mit  $-4 \text{ cmH}_2\text{O}$  bei kontrollierter Beatmung, sowie „S+“, mit  $+4 \text{ cmH}_2\text{O}$  und „S-“ mit  $-4 \text{ cmH}_2\text{O}$  bei Spontanatmung. Vorher wurde das RM wiederholt. Um eine Spontanatmungsaktivität zu ermöglichen, wurden die Muskelrelaxation beendet, die Sedierung reduziert und die Beatmungsparameter im Airway-Pressure-Release-Ventilation-Modus so gewählt, dass der Anteil von Spontanatmung am Minutenvolumen 30-60% betrug [1]. Nach einer Therapiezeit von 12 Stunden wurden PET-Aufnahmen durchgeführt. Die durchschnittliche Aufnahme von FDG in der Lunge wurde anhand der Methode nach Patlak bestimmt und auf die Lungenmasse normiert ( $K_{\text{IS}}$ , Abb. 1). Die Daten wurden mittels Kruskal-Wallis und Mann-Whitney-U-Test ausgewertet und im Text als Median mit Interquartilen (IQR) dargestellt. Ein  $p < 0,05$  wurde als signifikant angenommen. Multiples Testen wurde nach Bonferroni-Holm korrigiert.

#### Ergebnisse

$K_{\text{IS}}$  war signifikant niedriger in C+ (0,029, IQR 0,030-0,027) gegenüber C- (0,044, IQR 0,065-0,041) ( $p=0,004$ ) und in S+ (0,032, IQR 0,043-0,028) gegenüber S- (0,057, IQR 0,075-0,041) ( $p=0,016$ ). Die Vergleiche zwi-

schen C+ und S+ sowie C- und S- ergaben keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf  $K_{\text{IS}}$  ( $p=0,109$  bzw.  $0,337$ ).

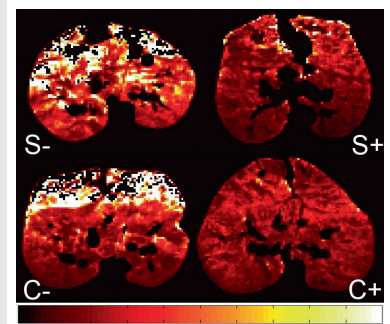
#### Interpretation

In diesem tierexperimentellen Modell des schweren ARDS beeinflusste die Spontanatmungsaktivität während invasiver Beatmung die durchschnittliche pulmonale neutrophilische Inflammation nicht. Eine Beatmung auf einem PEEP-Niveau, welches zu einer Stabilisierung der abhängigen Lungenareale führte, reduzierte die Entzündungsreaktion sowohl mit als auch ohne Spontanatmungsaktivität.

#### Literatur

- Güldner A, Braune A, Carvalho N, Beda A, Zeidler S, Wiedemann B, et al: Higher levels of spontaneous breathing induce lung recruitment and reduce global stress/strain in experimental lung injury. *Anesthesiology* 2014;3:673-82.

Abbildung 1



Spezifische Aufnahme ( $K_{\text{IS}}$ ) von  $^{18}\text{F}$ -Fluorodesoxyglucose aus der Positronen-Emissions-Tomographie- und Computer-Tomographie-Messung bei vier repräsentativen Tieren.

Die Farbskala reicht von schwarz bis weiß ( $K_{\text{IS}} = 0,0$  bis  $0,2 \text{ ml/min/g}$ ).

### Der Transkriptionsfaktor EGR-1 reguliert die GRK2-Transkription und vermittelt den Crosstalk zwischen kardialen Gq- und Gs-Signalweg

S. Klenke<sup>1</sup> · A. Engler<sup>1</sup> · D. Eggert<sup>1</sup> · M. Fleck<sup>1</sup> · C. Ochsenfarth<sup>1</sup> · M. Thielmann<sup>3</sup> · W. Siffert<sup>2</sup> · J. Peters<sup>1</sup> · U. H. Frey<sup>1</sup>

1 Klinik für Anästhesiologie & Intensivmedizin,  
2 Institut für Pharmakogenetik,  
3 Klinik für Thorax- & Kardiovaskuläre Chirurgie,  
Universität Duisburg-Essen und Universitäts-  
klinikum Essen

**Korrespondenz:** stefanie.klenke@uk-essen.de

#### Fragestellung

Herzinsuffizienz führt über eine Katecholamin-induzierte Aktivierung des Gs-Protein-Signalweges zu Expression und Aktivierung der G-Protein-Rezeptorkinase 2 (GRK2) und konsekutiver Desensibilisierung kardialer  $\beta$ -Adrenozeptoren (ADRBs). Dabei mag die lymphozytäre die kardiomyozytäre GRK2-Expression reflektieren und ein Marker für Überleben bei Patienten mit Herzinsuffizienz sein [1]. Auch die Signaltransduktion via Gq-Protein über Angiotensin II (AngII) oder Vasopressin führt im Rahmen einer Aortokoronaren-Bypass-Operation (ACVB-OP) zur Abschwächung der  $\beta$ -adrenergen Signaltransduktion durch Steigerung der GRK2-Aktivität [2]. Die molekularen Mechanismen dieses Crosstalks sind jedoch unklar. Da es bei ACVB-OPs zum kardiomyozytären Expressionsanstieg des Transkriptionsfaktors Early-Growth-response 1 (EGR-1) kommt [3] und wir EGR-1 bereits als Regulator der GRK2-Transkription identifizierten, prüften wir die These, dass 1) es nach ACVB-OP zu einer akuten Änderung der lymphozytären GRK2 Expression kommt und 2) EGR-1 Vermittler des Crosstalks zum Gs-Signalwegs ist.

#### Methodik

Nach Zustimmung der Ethikkommission wurden bei 50 Patienten während ACVB-OP bei rechtsatrialer Vorhof (RA)-Kanülierung (Kontrolle) und Dekanülierung Myokardproben entnommen. Mononukleäre periphere Blutzellen (PBMCs) wurden bei Kanülierung

(Kontrolle), Dekanülierung und 24 Stunden nach OP-Ende gesammelt. Immortalisierte Rattenkardiomyozyten (H9c2-Zellen) wurden mit dem Aktivator des Gq-Signalweges Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) stimuliert und der Zeitverlauf der endogenen GRK2- und EGR-1-mRNA-Expression gemessen (Real-Time PCR). Nach 5 Stunden wurden die Zellen zusätzlich mit dem Transkriptioninhibitor Actinomycin D und dem inaktiven PMA-Analogon 4- $\alpha$  Phorbol 13-Myristate 13-Acetate (4 $\alpha$ -PMA) inkubiert. GRK2- und EGR-1-Proteinexpression wurden nach Stimulation mit PMA und AngII detektiert (Western-Blot). Statistik: Mittelwerte  $\pm$  SD; t-Test für gepaarte Stichproben und ANOVA für Messwiederholungen mit Holm-Sidak's-Korrektur für multiples Testen (Graph Pad Prism 6, La Jolla).

#### Ergebnisse

Im Rahmen der ACVB-OP zeigte sich nach Bypassabgang im Vergleich zur Kontrolle ein 19-facher Anstieg der rechtsatrialen EGR-1-Expression ( $p < 0,0001$ ; Abb. 1A). Zudem zeigte sich 24 h postoperativ eine GRK2-Konzentrationserhöhung um 40% in PBMCs ( $p < 0,0001$ ; Abb. 1B), ein Indiz für eine Beteiligung von EGR-1 an der GRK2-Heraufregulation. In H9c2-Zellen führte PMA zu einer unmittelbaren Expressionserhöhung von EGR-1 mit nachfolgender Erhöhung der GRK2-mRNA-Expression mit einem Maximum nach 5 Stunden ( $p = 0,04$ ). Die Inhibition der Transkription mittels Actinomycin D verhinderte den PMA-induzierten Anstieg der GRK2-Expression. Der Crosstalk konnte auf Proteine-

bene bestätigt werden: Die Aktivierung des kompletten Gq-Signalweges mittels AngII führte zur Steigerung der EGR-1-Expression mit konsekutiver Expressionserhöhung von GRK2.

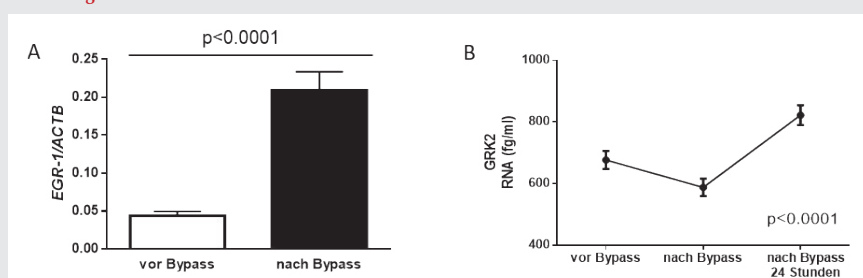
#### Interpretation

Wir konnten erstmalig eine Erhöhung der lymphozytären GRK2-Expression nach ACVB-OP nachweisen, deren Ausmaß auch bei ACVB-Patienten prognostische Relevanz haben könnte. Zudem identifizierten wir EGR-1 als Gq-abhängigen Regulator der GRK2-Transkription und deckten einen Crosstalk zwischen Gq- und Gs-Signalwegen auf. Dieser Regulationsmechanismus könnte ein interessantes Ziel zur Inhibition der EGR-1-Bindung an den GRK2-Promotor sein.

#### Literatur

1. Rengo G, Pagano G, Filardi PP, Femminella GD, Parisi V, Cannavo A, et al: Prognostic Value of Lymphocyte G Protein-Coupled Receptor Kinase-2 Protein Levels in Patients With Heart Failure. *Circ Res* 2016;118:1116-24
2. Tilley DG, Zhu W, Myers VD, Barr LA, Gao E, Li X, et al: Beta-adrenergic receptor-mediated cardiac contractility is inhibited via vasopressin type 1A-receptor-dependent signaling. *Circulation* 2014;130:1800-11
3. Aebert H, Cornelius T, Ehr T, Holmer SR, Birnbaum DE, Riegger GA, et al: Expression of immediate early genes after cardioplegic arrest and reperfusion. *Ann Thorac Surg* 1997;63:1669-75.

Abbildung 1



(A) EGR-1 mRNA-Expression in RA Proben und (B) absolute GRK2 RNA-Konzentration in PBMCs bei n=50 Patienten während ACVB-OP.

### Protektiver Einfluss von Semaphorin 7A auf die murine Sepsis

A. Körner<sup>1</sup> · M. Schlegel<sup>1</sup> · J. Theurer<sup>1</sup> · V. Gudernatsch<sup>1</sup> · M. Giera<sup>2</sup> · V. Mirakaj<sup>1</sup>

- 1 Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin, Universitätsklinikum Tübingen
- 2 Center for Proteomics and Metabolomics, Leiden University Medical Center, Netherlands

#### Korrespondenz:

andreas.koerner@uni-tuebingen.de

#### Fragestellung

Akute Entzündungsreaktionen können diverse Ursachen haben. Die initiale Phase aber ist vor allem durch eine Invasion von neutrophilen Granulozyten (PMN) in das betroffene Gewebe gekennzeichnet. In der späten Phase, der sogenannten Resolutionsphase, kommt es neben der Reduktion der PMN zu einer Rekrutierung von Monozyten und deren Differenzierung zu Makrophagen sowie zur Efferozytose apoptotischer PMN. Hierbei spielen neben Chemokinen und Zytokinen vor allem spezialisierte Lipidmediatoren, sogenannte Specialized proresolving mediators (SPMs), eine bedeutende Rolle [1-2]. In verschiedenen Arbeiten konnte außerdem der Einfluss der Neuronalen Guidance Proteine während der akuten Inflammation nachgewiesen werden [3]. Wir untersuchten in dieser Arbeit den Einfluss des Neuronalen-Guidance-Proteins Semaphorin 7A auf die murine Sepsis.

#### Methodik

In vitro wurden die Expression von Semaphorin 7A mittels Immunfluoreszenz-Färbung auf humanen Makrophagen und die Transkription der Resolvin-Rezeptoren ALX und GPR32 nach Stimulation mit einem synthetischen Oligopeptid, welches die Semaphorin-Domäne 7A loop 4cd (SL4cd) nachahmt, sowie Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) mittels RT-PCR untersucht (n=13). Darüber hinaus wurde die Phagozytose apoptotischer PMN durch humane Makrophagen ermittelt (n=9). Die Tierversuchsgenehmigung des zuständigen Regierungspräsidiums lag vor. In vivo wurde in einem durch Zymosan A (ZyA) induzierten Peritonitismodell an Semaphorin

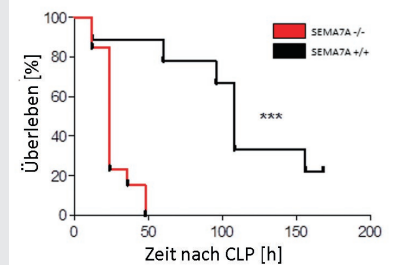
7A-Knockout- und Wildtyp-Mäusen die Rekrutierung inflammatorischer Zellen anhand einer Zeitkinetik (4 h, 12 h, 24 h, 48 h) (n=6-16/pro Gruppe und Zeitpunkt) evaluiert. Zu den entsprechenden Zeitpunkten wurden eine Peritoneallavage durchgeführt und die Differenzierung der Leukozyten sowie die Phagozytose apoptotischer PMN mittels Durchflusszytometrie (FACS) untersucht. Diese Zelldifferenzierung wurde ebenfalls nach Applikation von SL4cd bei C57BL/6-Mäusen bestimmt. Außerdem wurden die Zytokin-konzentrationen von IL-6, TNF- $\alpha$  und Keratinocyte-derived chemokine (KC) mittels ELISA und die SPM durch HPLC-MS/MS gemessen. In einem weiteren Versuch wurde der Einfluss von Semaphorin 7A auf das Überleben in einem „Cecal Ligation Puncture“ (CLP)-Modell evaluiert (n=13). Die statistische Auswertung erfolgte mit Student's-t-Test, einfaktorier ANOVA mit anschließender Korrektur nach Bonferroni und Log-rank-Test.

#### Ergebnisse

In vitro führte die Stimulation der Makrophagen mit SL4cd und TNF- $\alpha$  zu einer signifikant erhöhten Transkription der Resolvin-Rezeptoren ALX und GPR32 sowie zu einer signifikant erhöhten Phagozytose apoptotischer PMN. In vivo führte der Semaphorin-7A-Knockout zu einer signifikant erhöhten Leukozytenzahl im Peritoneum nach Injektion von Zymosan A (1mg) (Zellzahl  $\times 10^6$ ; Semaphorin-7A-WT: 4 h  $4,0 \pm 0,56$  (\*\*\*) ; 12 h  $7,41 \pm 1,0$  (\*\*\*) ; 24 h  $7,2 \pm 1,16$  (\*) ; 48 h  $5,33 \pm 0,32$  (\*\*\*) ; Semaphorin 7A-KO: 4 h  $8,56 \pm 0,53$ ; 12 h  $13,48 \pm 0,7$ ; 24 h  $10,22 \pm 0,67$ ; 48 h  $8,55 \pm 0,63$ ; n=6-16; \*\*\* p<0,001, \*\* p<0,01, \* p<0,05) und einer signifikanten Steigerung der neutrophilen Granulozyten. Des Weiteren kam es bei den Knockout-Tieren zu einer signifikanten Steigerung der klassischen inflammatorischen Ly6C<sup>hi</sup>-Monozyten, einer Reduktion der antiinflammatorischen Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten und einer signifikant verminderten Phagozytose apoptotischer PMN. Die Konzentrationen der proinflammatorischen Zytokine IL-6, TNF- $\alpha$  und KC in der Peritoneallavage waren bei den Knockout-Tieren signifikant erhöht. Auch nach Applikation von SL4cd konnten proresolutorische Effekte nachgewiesen werden. Bei

den SPM zeigten sich dabei erhöhte Konzentrationen von Lipoxin A4 (LXA4) und Maresin 1 (MaR1). In der polymikrobiellen Sepsis verstarben die Semaphorin-7A-Knockout-Tiere (Median 24 h) früher als die Wildtyp-Tiere (Median 108 h) (Abb. 1).

Abbildung 1



Semaphorin 7A-Knockout-Tiere zeigen ein signifikant reduziertes Überleben nach CLP (n=11 pro Gruppe, \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001).

#### Interpretation

Der Knockout von Semaphorin 7A führt während einer Zymosan-A-Peritonitis zu einer vermehrten Infiltration neutrophiler Granulozyten sowie erhöhten Spiegel proinflammatorischer Zytokine und zu einer verzögerten Entzündungsresolution. Des Weiteren verstarben Semaphorin 7A-Knockout-Tiere früher nach polymikrobieller Sepsis. Damit besitzt Semaphorin 7A einen protektiven Effekt sowohl während einer sterilen als auch während einer polymikrobiellen Sepsis.

#### Literatur

1. Serhan CN: Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. Nature 2014;510(7503):92-101
2. Serhan CN, Savill J: Resolution of inflammation: the beginning programs the end. Nat Immunol 2005;6(12):1191-97
3. Schlegel M, Köhler D, Körner A, Granja T, Straub A, Giera M, Mirakaj V: The neuro-immune guidance cue netrin-1 controls resolution programs and promotes liver regeneration. Hepatology 2015.

### Die $\beta$ -D-Endoglykosidase Heparanase ist eine vom Genotyp abhängige potenzielle Zielstruktur in der Therapie der septischen Kardiomyopathie

L. Martin<sup>1,2</sup> · J. Chen<sup>1</sup> · E. Zechendorf<sup>2</sup> · F. Chiazza<sup>3</sup> · S. Oggero<sup>4</sup> · M. Collino<sup>3</sup> · G. Marx<sup>2</sup> · T. Schuerholz<sup>4</sup> · C. Thiemermann<sup>1</sup>

1 William Harvey Research Institute, Queen Mary University of London, UK

2 Klinik für Operative Intensivmedizin und Intermediate Care, Uniklinik RWTH Aachen

3 Department of Drug Science & Technology, University of Turin, Italy

4 Klinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie, Universitätsmedizin Rostock

Korrespondenz: lmartin@ukaachen.de

#### Fragestellung

Inflammation und gestörte Kalziumregulation charakterisieren die Pathophysiologie der septischen Kardiomyopathie [1]. Heparanase ist ein ubiquitär exprimierter, endogener Immunmodulator [2]. Ihre Bedeutung in der septischen Kardiomyopathie ist unbekannt. Wir überprüften die Hypothese, dass (i) die Serum-Heparanaseaktivität im septischen Schock abhängig vom Genotyp reguliert ist, (ii) Heparanase die septische Kardiomyopathie induziert und (iii) Heparanase eine Zielstruktur für die Behandlung der septischen Kardiomyopathie darstellt.

#### Methodik

Nach Genehmigung (EK:206\_09) wurden im Rahmen einer Observations-Pilotstudie bei Patienten mit septischem Schock [3] (n=20) sowie nach abdominal-chirurgischem Eingriff (n=9; Kontrolle) die Heparanaseaktivität im Serum an Tag 1 und 2 nach Diagnosestellung/operativem Eingriff quantifiziert und die Genotypen der Einzelnukleotid-Polymorphismen rs4693608 und rs4364254 des Heparanase-Gens untersucht. Murine Kardiomyozyten (HL-1 Zellen) wurden für 24 h mit Heparanase (15 mU/ml) stimuliert. Nach Genehmigung (PPL:70/7348) wurden C57BL/6J-Mäusen (n=8 je Gruppe) Heparanase (1 U, i.v.), Lipopolysaccharid (LPS) und Peptidoglycan (PepG) (6 mg/kg und 1mg/kg, i.p.) oder deren Vehikel (150  $\mu$ l 0.9% NaCl) appliziert. 1 h nach LPS/PepG-Gabe wurden

die Tiere mit dem Heparanaseinhibitor (N-desulfatiertes re-N-acetyliertes Heparin; 500  $\mu$ g, i.v.) oder dessen Vehikel (150  $\mu$ l 0.9% NaCl) behandelt. Nach 24 h wurden die Ejektionsfraktion (EF) echokardiographisch quantifiziert und die Serum-Heparanaseaktivität bestimmt. In HL-1 Zellen und Herzen wurde die Expression ausgewählter Signalmoleküle der Kalziumregulation mittels Immunoblot ermittelt. Statistik: 1-way- oder 2-way-ANOVA und Bonferroni-Test (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung; Signifikanzniveau  $p < 0,05$ ).

#### Ergebnisse

Patienten mit septischem Schock wiesen eine erhöhte Heparanaseaktivität (Tag 1 und 2) im Vergleich zur Kontrollgruppe auf (5,6 vs. 2,5 und 4,1 vs. 2,1 ng Heparansulfat (HS)/mg Heparanase (Hep)/min;  $p < 0,001$  und  $p = 0,002$ ). Bei Patienten mit einem Heparanase Genotyp CT-GG, TT-GG, CT-AG oder CT-AA (n=11) fiel die Heparanaseaktivität an Tag 2 im Vergleich zu Tag 1 ab (2,5 vs. 5,8 ng HS/mg Hep/min;  $p < 0,001$ ). Bei Patienten mit einem Genotyp TT-AA oder TT-AG (n=9) zeigte sich zwischen Tag 1 und 2 kein Unterschied in der Heparanaseaktivität (5,9 vs. 5,3 ng HS/mg Hep/min;  $p = 0,487$ ). Die Stimulation von HL-1-Zellen mit Heparanase resultierte in einer 4,2-fach reduzierten Expression der sarkoplasmatischen Kalzium-ATPase (SERCA2) ( $p = 0,002$ ) und einer 3,8-fach reduzierten Phosphorylierung des SERCA2-Modulators Phospholamban im Vergleich zu unstimulierten Zellen ( $p = 0,001$ ). Im Vergleich zu Kontrolltieren resultierte die Gabe von Heparanase oder LPS/

PepG in einer Reduktion der EF ( $p < 0,001$ , Abb.1B), einem Anstieg der Heparanaseaktivität ( $p < 0,001$ ; Abb.1C) sowie in den Herzen in einer reduzierten SERCA2-Expression ( $p < 0,001$ ) und reduzierten Phospholamban-Phosphorylierung ( $p < 0,001$ ). Die Heparanaseinhibition nach LPS/PepG-Gabe resultierte in einer verminderten EF-Reduktion ( $p < 0,001$ ; Abb.1B), einem geringeren Anstieg der Heparanaseaktivität ( $p < 0,001$ ; Abb.1C), einer abgeschwächten Reduktion der SERCA2-Expression ( $p < 0,001$ ) sowie in einer abgeschwächten Reduktion der Phospholamban-Phosphorylierung ( $p < 0,001$ ) im Vergleich zu unbehandelten Mäusen.

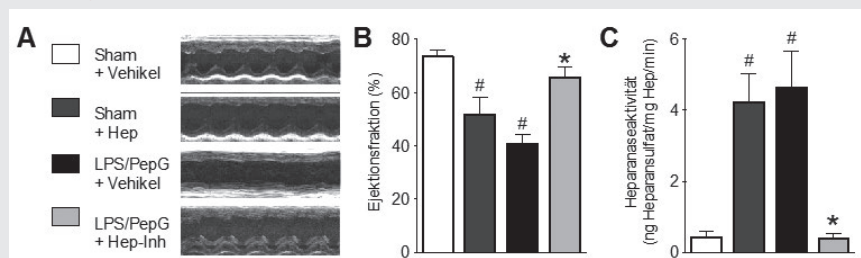
#### Interpretation

Patienten im septischen Schock weisen eine vom Genotyp abhängige erhöhte Heparanaseaktivität auf. Die Heparanase-Inhibition reduziert die kardiale Dysfunktion nach LPS/PepG-Gabe. Heparanase könnte damit eine potentielle Zielstruktur in der Behandlung der septischen Kardiomyopathie sein.

#### Literatur

- Hunter J, Doddi M: Sepsis and the heart. Br J Anaesth 2010;104:3-11
- Martin L, Koczera P, Zechendorf E, Schuerholz T: The Endothelial Glycocalyx: New Diagnostic and Therapeutic Approaches in Sepsis. BioMed Res Int 2016;1-8
- Singer M, Deutschman C, Seymour C, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al: The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). JAMA 2016;315:801-10.

Abbildung 1



(A) Repräsentative Echokardiogramme der untersuchten Gruppen, (B) Ejektionsfraktion, (C) Serum-Heparanaseaktivität. Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung; n=8 je Gruppe; <sup>#</sup> $p < 0,05$  vs. Sham+Vehikel; <sup>\*</sup> $p < 0,05$  vs. LPS/PepG+Vehikel; **Hep**=Heparanase, **Hep-Inh**=Heparanaseinhibitor.

## Die Implementierung der KDIGO-Leitlinien reduziert die Inzidenz der akuten Nierenschädigung bei Biomarker-definierten Hochrisiko-Patienten nach herzchirurgischen Eingriffen

M. Meersch<sup>1</sup> · C. Schmidt<sup>1</sup> · J. Gerss<sup>2</sup> · A. Zarbock<sup>1</sup>

- 1 Klinik für Anästhesiologie, operative Intensivmedizin und Schmerztherapie, Universitätsklinikum Münster
- 2 Institut für Biometrie und klinische Forschung, Universität Münster

**Korrespondenz:** meersch@uni-muenster.de

### Fragestellung

Die akute Nierenschädigung (AKI) ist eine häufige Komplikation nach herzchirurgischen Eingriffen und ist assoziiert mit einer hohen Morbidität und Mortalität [1]. In den letzten Jahren wurden diverse nephroprotektive Ansätze untersucht, um die AKI zu verhindern oder zu behandeln, jedoch ohne Erfolg [2]. Die KDIGO-Leitlinien empfehlen bei Hochrisiko-Patienten für die Entwicklung einer AKI die Anwendung eines Präventiv-Bundles [3]. Die Evidenz dieser Maßnahmen ist jedoch bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht geklärt. In dieser randomisiert-kontrollierten Studie haben wir untersucht, ob die KDIGO-Empfehlungen bei Hochrisiko-Patienten zu einer Reduktion der Inzidenz der AKI nach herzchirurgischen Eingriffen führt.

### Methodik

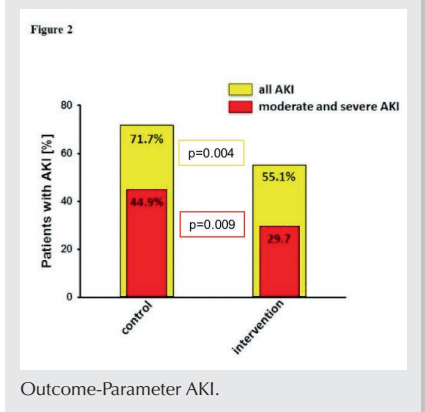
Es wurden 276 herzchirurgische Patienten mit einem hohen Risiko für die Entwicklung einer postoperativen AKI (definiert als [TIMP-2]•[IGFBP7] im Urin >0,3, NephroCheck®-Test, Astute) in die Studie eingeschlossen. Ausschlusskriterien waren: 1.) chronische Niereninsuffizienz mit einer GFR <30ml/min, 2.) vorhergegangene Nierentransplantation, 3.) Schwangerschaft. Die Patienten wurden nach schriftlicher Einwilligung 1:1 in eine der beiden Gruppen randomisiert. Die Prüfgruppe erhielt eine strikte Implementierung der KDIGO-Bundles: erweitertes hämodynamisches

Monitoring, Optimierung der Hämodynamik und des Volumenstatus nach einem festgelegten Algorithmus, Vermeidung der Gabe nephrotoxischer Medikamente, Diskontinuierung von Angiotensin Converting Enzym-Hemmern und Angiotensin-II-Rezeptor-Blockern, engmaschige Kontrollen von Serum-Kreatinin und Urinausscheidung und Vermeidung von Hyperglykämien. In der Kontrollgruppe wurden die Patienten nach Standardtherapie (ZVD 8-10 mmHg und MAP >65 mmHg). Primäres Zielkriterium dieser Studie war die Erfassung des Auftretens der AKI innerhalb von 72 Stunden postoperativ. Als sekundäre Zielkriterien wurden der Schweregrad der AKI, Nierenersatzpflichtigkeit, Intensiv- und Krankenhausverweildauer, Letalität und MAKE (major adverse kidney events), ein kombiniertes Zielkriterium bestehend aus Letalität, Nierenersatzpflichtigkeit und persistierende renale Dysfunktion, an Tag 90 analysiert. Die statistischen Analysen wurden mit Hilfe des t-Tests, des Mann-Whitney-U-Tests und des  $\chi^2$ -Tests durchgeführt. Ein p-Wert  $\leq 0,05$  wurde als signifikant angenommen. Die Studie wurde von der zuständigen Ethikkommission genehmigt und im Deutschen Register für klinische Studien registriert (DRKS 00006139).

### Ergebnisse

Die demographischen Daten zeigten keine signifikanten Unterschiede in beiden Gruppen. Von den insgesamt 276 eingeschlossenen Patienten entwickelten 55,1% der Patienten in der Interventions- und 71,7% der Patienten in der Kontrollgruppe eine AKI (ARR: 16,6% (95% CI 5,5%-27,9%);  $p=0,004$ ) (Abb. 1). Die Diagnosestellung erfolgte bei 24 Patienten aufgrund einer Serumkreatininwert-Veränderung, während bei 143 Patienten die Urinausscheidung als Diagnosekriterium ausschlaggebend war. Bei 8 Patienten waren sowohl Serumkreatinin erhöht als auch die Urinausscheidung reduziert. Die Implementierung der KDIGO-Bundles führte zu einer signifikanten Verbesserung der hämodynamischen Parameter ( $p<0,05$ ), zu einer geringeren Inzidenz von Hyperglykämien ( $p<0,001$ ) und einer geringeren Anwendung von Angiotensin-Converting-Enzym-Hemmern und An-

Abbildung 1



giotensin-II-Rezeptor-Blockern. Patienten der Interventionsgruppe zeigten eine signifikant reduzierte Rate an moderater und schwerer AKI im Vergleich zur Kontrollgruppe (29,7% vs. 44,9%; ARR: 15,2% (95% CI, 4,0%-26,5%);  $p=0,009$ ) (Abb. 1). Es konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Nierenersatzpflichtigkeit, der Intensiv- und Krankenhausverweildauer, der Letalität und des Auftretens von MAKE90 dargestellt werden.

### Interpretation

Die Implementierung der KDIGO-Bundles reduziert bei Biomarker-definierten Hochrisiko-Patienten signifikant das Auftreten und den Schweregrad der AKI innerhalb von 72 Stunden nach herzchirurgischen Eingriffen. Große, multizentrische Studien sind erforderlich, um den Effekt auf die Letalität und auf das renale Langzeit-Outcome zu untersuchen.

### Literatur

1. Mao H, et al: Cardiac surgery-associated acute kidney injury. *Cardiorenal Med* 2013;3(3):178-99
2. O'Neal JB, Shaw AD, Billings FT: Acute kidney injury following cardiac surgery: current understanding and future directions. *Crit Care* 2016;20(1):187
3. KDIGO, A.w: KDIGO clinical practice guideline for acute kidney injury. *Kidney Int Suppl* 2012;2:1-138.

## Extrazelluläre Matrix verstärkt Schmerzsensitivierungssignalkaskade

K. Moeller<sup>1</sup> · C. Loos<sup>2</sup> · J. Isensee<sup>1</sup> · J. Hasenauer<sup>2</sup> · T. Hucho<sup>1</sup>

- 1 Experimentelle Anästhesiologie und Schmerzforschung, Klinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin, Uniklinik Köln
- 2 Institut für Computational Biology, Helmholtz Zentrum München – Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt, Neuherberg

**Korrespondenz:** tim.hucho@uk-koeln.de

### Fragestellung

Viele schmerzhafte Gewebeveränderungen in Wunden, Tumoren oder Arthritis sind begleitet von Veränderungen der extrazellulären Matrix (EZM). Welche EZM-Proteine schmerzsensitivierende Vorgänge beeinflussen, ist bisher kaum untersucht. Ziel dieser Studie ist, mit einer neuen „High-Content Screening“ (HCS)-Mikroskopie-basierten Analyse EZM-Proteine zu identifizieren, die schmerzrelevante intrazelluläre Signalvorgänge modulieren.

### Methodik

Dissoziierte sensorische Neurone der Wurzelganglien von männlichen Ratten wurden über Nacht in mit unterschiedlichen EZM-Proteinen beschichteten 96-well Platten kultiviert. Anschließend wurden sie für verschiedene Zeitspannen mit Substanzen (NGF, OSM, 5-HT) behandelt, die u.a. zu PKA und/oder Erk1/2 vermittelter Schmerzsensitivierung [1] führen. Mittels phosphospezifischer Antikörper wurden phospho-PKA und phospho-Erk1/2 als Surrogatmessgröße der Kinaseaktivität detektiert sowie mit CGRP-Antikörpern die relative CGRP-Expression bestimmt. Mit Hilfe der von uns im Schmerzfeld erstmals angewandten HCS-Mikroskopie und Software-basierten Analyse wurden die Fluoreszenzintensitäten auf Einzelzell-Ebene quantifiziert. Anschließend wurde anhand von Einzelzell-Daten von Kinetiken und Dosis-Wirkungskurven ein mathematisches Modell entwickelt, das mechanistische Veränderungen durch „ordinary differential equation constrained mixture modelling (ODE-MM)“ [2] bestimmt.

### Ergebnisse

In unserem Screen haben wir rund 930.000 Neuronen 510 unterschiedlichen Behand-

lungskonditionen (Einfluss von 17 EZM-Proteinen auf PKA und Erk1/2 Phosphorylierung, basal und NGF/OSM/5-HT-induziert, je 7 Zeitpunkte) unterworfen. Ausschließlich Mitglieder der Klasse der Kollagene erhöhten spezifisch die NGF-induzierte Amplitude der Erk1/2-Phosphorylierung, hatten aber keinen Einfluss auf die Kinetik der PKA-Phosphorylierung. Hingegen konnte keines der anderen getesteten EZM-Proteine die basale oder NGF-, OSM-, oder 5-HT-induzierte Erk1/2- und PKA-Kinetiken verändern (Abb. 1). Eine Vergleichbarkeit der neuronalen Subgruppen in den unterschiedlichen Matrix-Konditionen wurde mittels einer HCS-basierten Subgruppenanalyse und der ODE-MM-Analyse bestätigt. Zudem wurde auch die CGRP-Expression in sensorischen Neuronen durch Kollagene erhöht.

### Interpretation

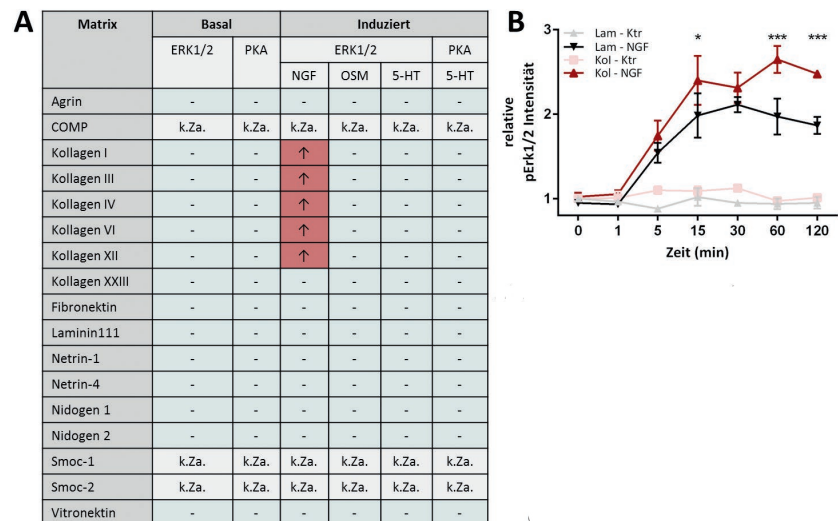
Die verstärkten NGF-induzierten Sensitivierungssignalgänge wie auch die verstärkte CGRP-Expression legen nahe, dass die direkte Wirkung von Kollagen auf nozizeptive Neu-

rone eine Ursache der mit Gewebeveränderungen einhergehenden Schmerzen ist. NGF-blockierende Antikörper erwiesen sich als hochaktive Analgetika, deren Einsatz jedoch mit hohen Nebenwirkungen wie schnell fortschreitende Osteoarthritis und Gelenksabbau einhergehen [3]. Unsere Daten könnten auf einen gezielteren Therapieansatz hinweisen, der die NGF-Wirkung auf das Gewebe erhalten, die schmerzsensitivierende Wirkung durch Unterbrechung der Kollagen-Nozizeptorinteraktion aber reduzieren könnte.

### Literatur

1. Hucho T, Levine JD: Signaling pathways in sensitization: toward a nociceptor cell biology. *Neuron* 2007;55(3):365-76
2. Hasenauer J, et al: ODE constrained mixture modelling: a method for unraveling subpopulation structures and dynamics. *PLoS Comput Biol* 2014;10(7):e1003686
3. Chang DS, et al: Anti-nerve growth factor in pain management: current evidence. *J Pain Res* 2016;9:373-83.

Abbildung 1



**A:** Zusammenfassung des Einflusses der untersuchten EZM Proteine auf die Phosphorylierung von Erk1/2 und PKA (↑: Anstieg der Phosphorylierung, -: keine Veränderung, k.Za.: Keine Zellanhaftung)

**B:** Kinetik der Erk1/2-Phosphorylierung von sensorischen Neuronen nach Kontroll-(Ktr) und NGF-Behandlung unter dem Einfluss von Laminin (Lam) oder Kollagen (Kol).

### miRNA-223 schützt das Darmepithel im murinen akuten Darmversagen durch Inhibition des NLRP3-Inflammasoms

V. Neudecker<sup>1,6</sup> · P. Jedlicka<sup>2</sup> · M. E. Gerich<sup>3</sup> · E. N. McNamee<sup>4,5</sup> · H. K. Eltzschig<sup>5</sup>

- 1 Department of Anesthesiology, University Hospital, LMU Munich, Germany
- 2 Department of Pathology, School of Medicine, University of Colorado – Anschutz Medical Campus, Denver, USA
- 3 Division of Gastroenterology & Hepatology, School of Medicine, University of Colorado – Anschutz Medical Campus, Denver, USA
- 4 Department of Anesthesiology, School of Medicine, University of Colorado – Anschutz Medical Campus, Denver, USA
- 5 Mucosal Inflammation Program, School of Medicine, University of Colorado – Anschutz Medical Campus, Denver, USA
- 6 Department of Anesthesiology McGovern Medical School, University of Texas Health Science Center at Houston, TX, USA

#### Korrespondenz:

viola.neudecker@med.uni-muenchen.de

#### Fragestellung

Eine akute intestinale Dysfunktion führt zu einer bakteriellen Translokation mit Störung der Integrität der mukosalen Barriere und kann einen septischen Verlauf bis hin zu einem Multiorganversagen triggern. Sie stellt somit eine kritische Komplikation für intensivmedizinische und perioperative Patienten dar. Eine adäquate Immunantwort spielt bei der Aufrechterhaltung der intestinalen Barrierefunktion und der Kontrolle des Mikrobioms eine entscheidende Rolle. In der Regulation dieser akuten Immunantwort haben microRNA (miRNA)-vermittelte Regulationsmechanismen eine wesentliche Bedeutung [1]. Vorausgegangene Studien implizieren insbesondere die myeloische miR-223 [2] als zentralen Regulator der akuten Immunantwort. Über die Rolle von miR-223 während der akuten intestinalen Dysfunktion ist bisher nichts bekannt. Wir stellten daher die Hypothese auf, dass miR-223 im akuten Darmversagen eine funktionelle Rolle spielen könnte.

#### Methodik

Als In-vivo-Modell diente hier das murine Dextran-Sulfat-Natrium (DSS) – Kolitis Modell. Hierbei induziert das Trinken DSS-haltigen Wassers eine akute intestinal-epitheliale Schädigung sowie eine robuste, mehrere Tage

anhaltende Immunantwort. Die Versuchs- und Kontrollgruppen waren hinsichtlich Alter, Geschlecht und Gewicht angeglichen. Es wurden Wildtyp (WT)- sowie miR-223<sup>-/-</sup> (miR-223-defiziente)-Mäuse verwendet. In verschiedenen Versuchsreihen wurden murine Monozyten oder neutrophile Granulozyten (PMNs) mittels Antikörper depletiert und Knochenmark-chimäre Mäuse generiert. Zur Überexpression von miR-223 wurden Mäuse intravenös mit Nanopartikeln behandelt, die miR-223 Mimics enthielten. Alle Tierversuche waren offiziell genehmigt und im Einklang mit den behördlichen Richtlinien. Änderungen auf transkriptioneller Ebene wurden mittels qRT-PCR und auf Proteinebene mittels Western Blot bzw. ELISA bestimmt. Mittels t-Test oder ANOVA ermittelte Unterschiede galten mit einem p-Wert  $\leq 0,05$  als statistisch signifikant.

#### Ergebnisse

Bei Induktion einer akuten intestinal-epithelialen Schädigung mittels DSS zeigten miR-223-Knockout-Mäuse im Vergleich zu WT-Mäusen einen deutlich schwereren Grad der akuten Inflammation mit stärkeren klinischen und histopathologischen Inflamationszeichen (Abb. 1, Gewichtsreduktion WT  $92,57\% \pm 2,234\%$ , n=10 versus miR-223<sup>-/-</sup>  $82,89\% \pm 1,627\%$  n=10; p<0,01). Die miR-223 reguliert das Inflammasom NLRP3 [3], welches die Synthese von Pro-Interleukinen wie IL-1 $\beta$  kontrolliert. MiR-223<sup>-/-</sup> Mäuse zeigten im mu-

rinen intestinalen Gewebe eine stärkere Infiltration neutrophiler Granulozyten sowie deutlich höhere IL-1 $\beta$  Spiegel (WT  $104,0 \pm 52,05$  pg/mg protein n=3 versus miR-223<sup>-/-</sup>  $958,0 \pm 165,1$  pg/mg protein n=3; p<0,01). Hingegen war die miR-223-Überexpression mittels intravenöser Behandlung mit miR-223-enthaltenden Nanopartikeln protektiv.

#### Interpretation

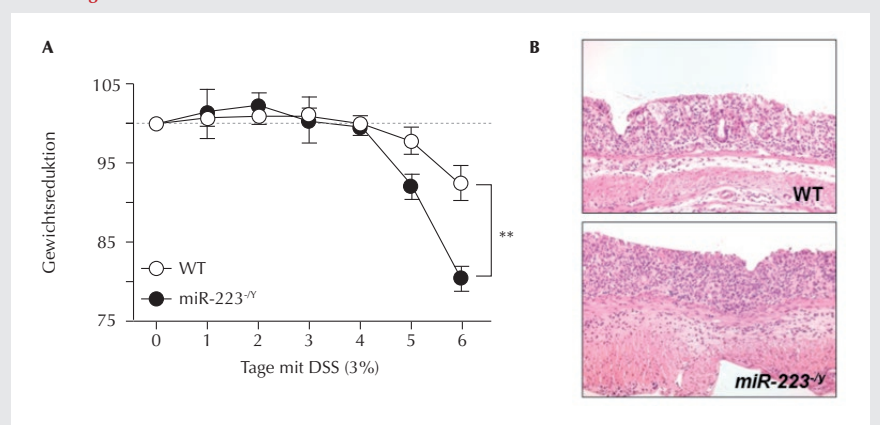
Die Inhibition von NLRP3 durch miR-223 führt zu einer verminderten intestinalen Inflammation. Zusammengefasst implizieren die Ergebnisse unserer Studien eine therapeutische Funktion von miR-223 während des akuten murinen Darmversagens.

#### Literatur

1. Neudecker V, Brodsky KS, Kreth S, Ginde AA, Eltzschig HK: Emerging Roles for MicroRNAs in Perioperative Medicine. *Anesthesiology* 2015;124(2):489-506
2. \*Pulikkan JA, \*Dengler V, Peramangalam PS, Peer Zada AA, Müller-Tidow C, Bohlander SK, et al: Cell-cycle regulator E2F1 and microRNA-223 comprise an autoregulatory negative feedback loop in acute myeloid leukemia. *Blood* 2010;115(9):1768-78
3. Bauernfeind F, Rieger A, Schildberg FA, Knolle PA, Schmid-Burgk JL, Hornung V: NLRP3 Inflammasome Activity Is Negatively Controlled by miR-223. *J Immunol* 2012;189(8):4175-81.

\* Gleichberechtigte Erstautoren, # Namensänderung 2015: von Dengler zu Neudecker.

Abbildung 1



Dextran Sodium Sulphate (DSS)-induzierte murine Darmschädigung mittels 6-tägiger Gabe von 3%-igem DSS-Trinkwasser bei WT- und miR-223<sup>-/-</sup>-Mäusen; n=9 Mäuse je Gruppe.

A Gewichtsreduktion in Prozent bezogen auf Tag 0. \*\* p<0,01.

B Repräsentative intestinale Histologie (H&E) von WT- und miR-223<sup>-/-</sup>-Mäusen an Tag 6 der DSS-Gabe.

### Barrierschädigung und Allodynie via microRNA-21 bei Neuropathie bei Mäusen

A.-K. Reinhold · B. Schwab · R. S. Sauer · N. Roewer · H. L. Rittner

Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie, Universitätsklinikum Würzburg

**Korrespondenz:** reinhold\_a@ukw.de

#### Fragestellung

Neuropathischer Schmerz ist ein meist chronisches Krankheitsbild, dessen molekulare Ursachen nur unzureichend verstanden sind. Forschungsergebnisse deuten auf eine Rolle von microRNA (miR) (kurze, nicht kodierende RNAs, die die Translation spezifischer mRNA verhindern) hin. So wurde miR-21 als hochreguliert in peripheren Neuronen beschrieben [1]. Zudem gehen periphere Neuropathien mit einer Schädigung der Blut-Nerven-Barriere (BNB) und einer reduzierten Expression von Tight-Junction-Proteinen (TJP) einher [2]. In dieser Studie untersuchten wir im Mausmodell den Einfluss von miR-21 am peripheren Nerv auf mechanische Allodynie und BNB-Funktion bei Neuropathie.

#### Methodik

Im Spared-Nerve-Injury-Modell, (SNI, Teilaxotomie des N. ischiadicus) sowie Chronic Constriction Injury (CCI, Ligatur des N. ischi-

adicus) an C57BL/6-Mäusen wurden 7 d postoperativ TJPs sowie miR-21-5p mittels qPCR quantifiziert (n=6). Mmu-miR-21-5p In-vivo-Mimics wurden als 1 nmol (in 50 µl) täglich naiven Tiere perineural (p.n.) am N. ischiadicus injiziert (Kontrolle: cel-miR-67 Mimic). Mmu-miR-21-5p In-vivo-Antagomirs wurden in Transfektionsagens inkubiert und 5 pmol a) direkt nach bzw. b) ab 7 d postoperativ nach CCI je täglich appliziert (vs scrambled control). Je 6 h nach Injektion wurde die mechanische Schmerzschwelle bestimmt (von Frey, Up-and-Down-Methode nach Dixon, n=4-8), Two-Way-RM-Anova mit Tukey-Post-hoc-Test, \* p<0,05). Zur Barriereuntersuchung wurden der N. ischiadicus in Evan's Blue Dye inkubiert sowie die Proben immunhistochemisch für TJPs gefärbt. Tierversuche wurden von der Regierungsbehörde Unterfranken genehmigt (REG 44/14).

#### Ergebnisse

miR-21-5p ist 7 d nach SNI sowohl im N. suralis als auch im Nervstumpf hochreguliert (**Abb. 1A**, p<0,01), zudem zeigt sich eine Öffnung der BNB und eine verminderte Expression von TJPs. Tägliche p.n. Injektionen mit miR-21-5p Mimic führen bereits ab 2 d zu einer hochsignifikanten mechanischen Allodynie (**B**). Weiterhin zeigt sich eine erhöhte Permeabilität der BNB im Vergleich zur Kontrolle (**C**) und eine veränderte TJP-Expression. Im Gegensatz dazu wirkt die Gabe von miR-

21-Antagomirs analgetisch: Applikation direkt nach CCI verzögert und mildert mechanische Allodynie (**D**). Zudem kann bei Gabe 7 d nach CCI schon nach einer Injektion ein deutlicher analgetischer Effekt beobachtet werden, der durch weitere Injektionen verstärkt wird (**E**).

#### Interpretation

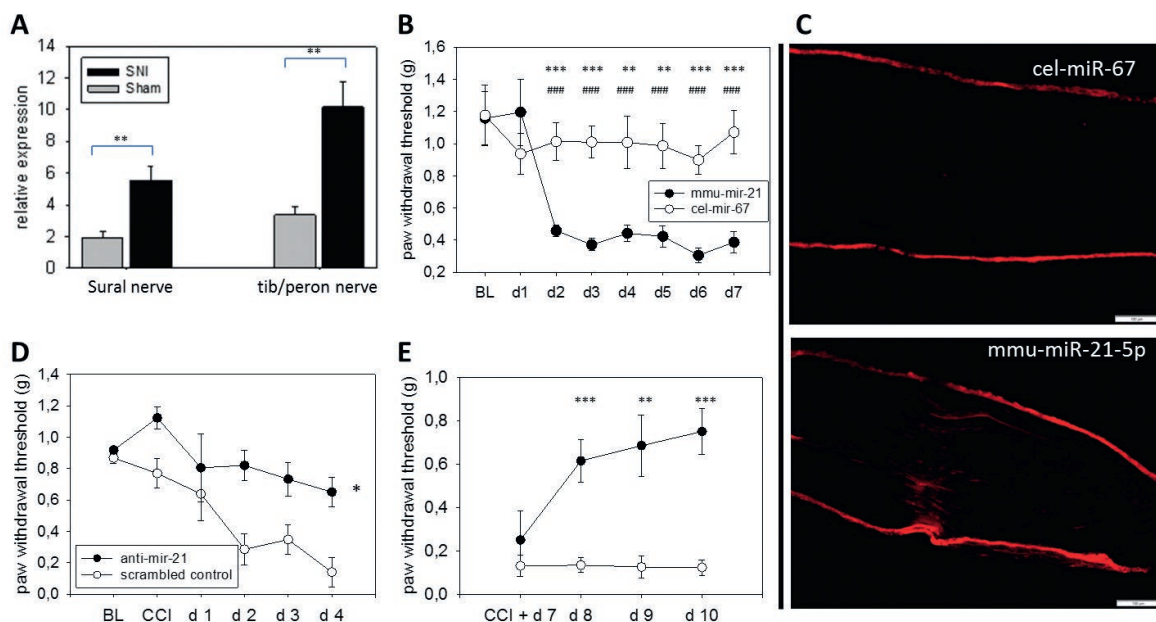
miR-21 ist bei Neuropathie im peripheren Nerv hochreguliert, die BNB durchlässig und TJPs vermindert exprimiert. Die perineurale Applikation von miR-21 führt zu einem neuropathischen Phänotyp mit einhergehender Störung der BNB-Funktion. Antagonisierung von miR-21 wirkt im CCI-Modell analgetisch. Dies zeigt die Relevanz von miR-21 im Modell der peripheren Neuropathie und damit als mögliches therapeutisches Target.

Förderungen: EU-Projekt ncRNAPain (FP7/2007-2013, grant agreement 602133). Rotationsstipendium IZKF Würzburg (AKR).

#### Literatur

1. Sakai A, Suzuki H: Nerve injury-induced upregulation of miR-21 in the primary sensory neurons contributes to neuropathic pain in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2013;435:176-81
2. Reinhold AK, Rittner HL: Barrier function in the peripheral and central nervous system – a review. *Pflügers Arch* 2017;469:123-34.

Abbildung 1



(A) miR-21-5p-Expression 7 d nach SNI (n=6). (B, C) Effekte von miR-21 mimic auf die mechanische Schmerzschwelle und BNB-Permeabilität (n=8). (D, E) Analgetische Wirkung von miR-21-Antagonisten direkt postoperativ nach CCI (n=4) bzw. nach 7 d (n=8). \*p<0.05 zwischen Gruppen. #p<0.05 zwischen Zeitpunkten.

## Sulfonamide reduzieren die AQP5-Expression und Immunzellmigration

K. Rump · M. Unterberg · Z. Bazzi · M. Adamzik

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

Korrespondenz: Katharina.k.rump@rub.de

### Fragestellung

Die Aquaporin 5 (AQP5)-Expression scheint das Überleben bei Sepsis zu beeinflussen [1], da AQP5-defiziente Mäuse ein häufigeres Überleben und eine verringerte Immunzellmigration nach einer Lipopolysaccharid (LPS) induzierten Inflammationsreaktion im Vergleich zu Wild-Typ-Mäusen zeigen [2]. Außerdem ist das C-Allel des AQP5 A(-1364)C-Promotorpolymorphismus nicht nur mit einer geringeren AQP5-Expression [3] assoziiert, sondern auch mit einer verringerten Migration neutrophiler Granulozyten und einer verringerten 30-Tage-Letalität bei einer schweren Sepsis. Die Inhibition der AQP5-Expression könnte somit ein neuer therapeutischer Ansatz in der Sepsistherapie werden. Potentielle AQP5-Inhibitoren stellen Sulfonamide und deren Derivate dar, da diese Wirkstoffe die AQP5-Expression in der B-Lymphozytenzelllinie REH hemmen [2]. Unklar ist allerdings, ob Sulfonamide die LPS-induzierte AQP5-Expression hemmen und dadurch die Immunzellmigration inhibieren. Des Weiteren ist unbekannt, ob die AQP5-Inhibitoren vor einer LPS-Inkubation oder auch nach einer LPS-Inkubation verabreicht werden können, um die AQP5-Expression zu reduzieren. Deshalb wurden folgende Hypothesen getestet: 1) Nach Vorinkubation mit Sulfonamiden wird die LPS-induzierte AQP5-Expression aufgehoben sowie die Immunzellmigration reduziert. 2) Die Gabe von Sulfonamiden kann nach

Induktion der Inflammation die AQP5-Expression nicht reduzieren.

### Methodik

1) Zellen der B-Lymphozytenzelllinie REH wurden mit Furosemid ( $10^{-6}$ M) und Methazolamid ( $10^{-3}$ M) (Sigma) über Nacht präinkubiert und anschließend mittels SDF1- $\alpha$  (Prospec) zur Migration durch eine Insertmembran stimuliert. Gleichzeitig erfolgte die Proteingewinnung aus den stimulierten Zellen zur Analyse der AQP5-Expression im Western Blot. Die Zählung der migrierten Zellen erfolgte nach 2 und 4 Stunden photometrisch nach MTS-Zugabe (Promega).

2) Nach Einwilligung durch die Ethikkommission der Ruhr-Universität Bochum wurden EDTA-Vollblutproben von freiwilligen gesunden Probanden entnommen. Es erfolgte die Inkubation der Vollblutproben mit LPS (10 ng/ml) sowie Furosemid ( $2 \cdot 10^{-4}$ M) und Methazolamid ( $1 \cdot 10^{-4}$ M) für 5 bis 90 Minuten. Nach Isolation der mononukleären Zellen (PBMCs), RNA-Isolation und reverser Transkription wurde die AQP5-Expression mittels Real-Time-PCR quantifiziert. Statistik: Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, gepaarter t-Test,  $p < 0,05$ .

### Ergebnisse

1) Die Inkubation der B-Lymphozytenzelllinie REH mit Methazolamid führte nach 24 Stunden zu einer Reduktion der AQP5-Expression, während unter Furosemid die Expression im Vergleich zur Kontrolle gleich blieb (Abb. 1a,  $n=3$ ). 2) Zwei Stunden nach Beginn der Migration zu SDF1- $\alpha$  zeigten B-Lymphozyten der Zelllinie REH ohne Vorinkubation bereits eine signifikante zielgerichtete Migration zu SDF1- $\alpha$  (Abb 1 b;  $p=0,02$ ,  $n=3$ ). Dahingegen migrierten die mit Methazolamid und Furosemid vorinkubierten Zellen noch nicht signifikant zielgerichtet (Abb 1 b;  $p=n.s.$ ,  $n=3$ ). 3) Die Präinkubation der PBMCs mit Methazolamid führte zu einer Reduktion der LPS-

induzierten AQP5-Expression auf Kontrollniveau, während Furosemid diese nicht reduzieren konnte (Abb. 1 c,  $p=0,04$ ,  $n=8$ ). Nach LPS-Inkubation konnte jedoch Methazolamid die AQP5-Expression nicht mehr auf Kontrollniveau reduzieren (Abb. 1 c,  $p=0,004$ ,  $n=8$ ).

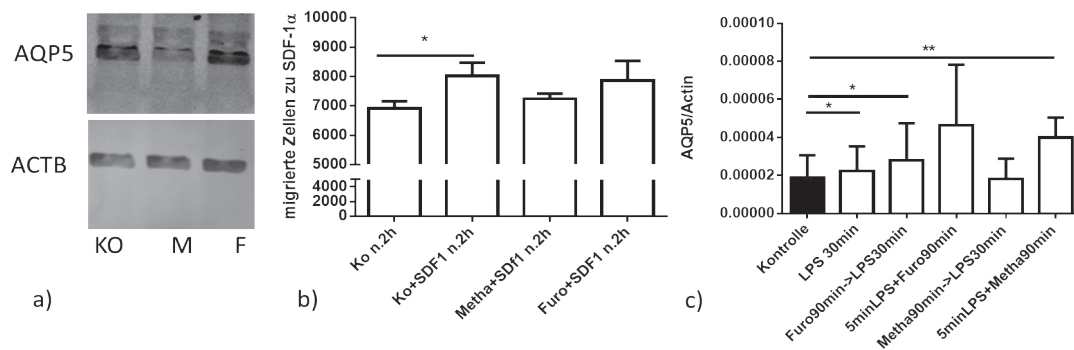
### Interpretation

Methazolamid scheint die AQP5-Expression und die Migration von Immunzellen zu reduzieren. Nach LPS-Gabe ist die Reduktion der AQP5-Expression durch Methazolamid jedoch nicht mehr möglich, sodass eine Therapie versagen würde, eine Prophylaxe jedoch wirksam sein könnte. Ziel unserer Forschung ist es daher aufzuklären, welche Mechanismen durch LPS induziert werden, die eine Hemmung der AQP5-Expression verhindern. Möglicherweise spielen hier epigenetische Prozesse eine Rolle, da LPS die Methylierung am AQP5-Promotor beeinflusst [4].

### Literatur

1. Rump K, Unterberg M, Bergmann L, et al: AQP5-1364A/C polymorphism and the AQP5 expression influence sepsis survival and immune cell migration: a prospective laboratory and patient study. J Transl Med 2016; doi: 10.1186/s12967-016-1079-2
2. Rump K, Unterberg M, Kreuzer M, Bergmann L, Bazzi Z, Menon A, Adamzik M: Die AQP5-Expression beeinflusst die Migration von neutrophilen Granulozyten im Mausmodell. Anästh Intensivmed 2016
3. 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;103:598-61
4. Rump K, Schäfer S, Unterberg M, et al: Das Methylierungsmuster des AQP5-Promotors beeinflusst die AQP5-Expression in Immunzellen und die Prognose von Patienten mit Sepsis. Anästh Intensivmed 2015;56.

Abbildung 1



a) AQP5-Expression im Western Blot mit Zellysaten aus REH-Zellen unter Kontrollbedingungen (KO), mit Methazolamid (M) und Furosemid (F) im Vergleich zu Actin (ACTB) b) Migration von REH-Zellen zu SDF1- $\alpha$  nach Vorinkubation mit Methazolamid und Furosemid ( $n=3$ ). c) AQP5-Expression in PBMCs, nach LPS Inkubation, Präinkubation mit Furosemid und Methazolamid vor LPS-Gabe sowie Inkubation mit Furosemid und Methazolamid nach LPS-Gabe ( $n=8$ ).

## Erhöhte Durchlässigkeit der Blut-rückenmarksbarriere und Perizytenmangel bei peripherer Neuropathie bei Ratten und Mäusen

R.-S. Sauer<sup>1</sup> · J. Kirchner<sup>1</sup> · S. Yang<sup>2</sup> · L. Hu<sup>2</sup> · N. Roewer<sup>1</sup> · A. Brack<sup>1</sup> · H. L. Rittner<sup>1</sup>

1 Klinik und Poliklinik für Anaesthesiologie, Universitätsklinikum Würzburg  
2 Dept. of Anesthesiology and Pain Medicine, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, China

Korrespondenz: Sauer\_R2@ukw.de

### Fragestellung

Die Blut-Rückenmarks-Barriere (BSCB) dichtet Gefäße des Rückenmarks ab und verhindert das Eindringen von toxischen oder proalgetischen Mediatoren in das Zentralnervensystem (ZNS). Seine Rolle in der Pathophysiologie der neuropathischen Schmerzen ist nicht vollständig verstanden; weil auch bei nicht schmerzhaften Erkrankungen, z.B. bei Rückenmarksverletzung oder amyotrophischer Lateralsklerose, die Barriere geöffnet ist [1]. Zur Untersuchung von Polyneuropathien wurden verschiedene Tiermodelle (z.B. partielle Ischiasnerv-Ligatur) entwickelt, und eine erhöhte Durchlässigkeit der BSCB wurde beobachtet [2]. Bei neuropathischen Schmerzen kommt es zu einer zentralen Sensibilisierung mit Mikrogliaaktivierung und Einwanderung von Immunzellen. Wir postulieren, dass periphere Neuropathie (Chronic Constriction Injury, CCI sowie Spared Nerve Injury, SNI) zu einer Verringerung der Tight-Junction-Proteine (TJP) sowie von Perizyten führt, was eine Öffnung der BSCB verursacht. Diese könnte zur Einwanderung von Immunzellen und Penetration von noxischen Substanzen und zu Schmerzempfindlichkeit führen.

### Methodik

Von-Frey-Test wurde für die Messung von mechanischen Schmerzschwellen, Hargreaves Test für thermische Schmerzschwellen, Rota Rod für die Messung von motorischer Aktivität, Immunfluoreszenzfärbung für Perizyten, Western Blot und RTPCR für TJP-Expression sowie Western Blot für die Transkriptionsfaktoren  $\beta$ -Catenin, smad4 und SLUG durchgeführt. Die Daten werden als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. Zwei Gruppen wurden durch t-Test für unabhängige Variablen verglichen. Messungen mit einer oder zwei Variablen (z.B. Zeit und Behandlung) wurden durch One- oder Two-way-ANOVA oder durch wiederholte Messungen (RM) und Student-Newman-Keuls-Method-Post-hoc-Test verglichen. Unterschiede wurden als signifikant angesehen, wenn  $p < 0,05$ . Tierversuche wurden von der Regierung Unterfranken genehmigt.

### Ergebnisse

Diese Studie zeigt, dass es bei Neuropathie (CCI) bei Ratten zu Hyperalgesie nach mehreren Tagen kommt. CCI-Tiere haben im Vergleich zu shamoperierten Tieren bis 14 d nach Operation eine zeitabhängige mechanische Allodynie sowie eine verminderte motorische Aktivität (Rota Rod). Die BSCB wird für kleine und große molekulare Tracer beginnend 1 d nach Nervenligation durchlässig. Die Expression von TJP im Rückenmark Occludin, Claudin-1, -5, -19, Tricellulin und ZO-1 mRNA sinkt signifikant 7-14 d nach CCI sowie bei Mäusen mit SNI. ZO-1- und Occludin-Protein sind in der Zellmembran vermindert. In den aus dem Rückenmark isolierten Kapillaren ist die Immunreaktivität von Claudin-5 und ZO-1 schwächer. Parallel dazu sinkt die Anzahl der Plättchen-abgeleiteten Wachstumsfaktorrezeptoren (PDGFR)- $\beta$ + Perizyten im Rückenmark. Eine verminderte Transkription von TJPs könnte auf verminderte Expression von  $\beta$ -Catenin zurückzuführen sein, nicht jedoch auf Smad4 und SLUG.

### Schlussfolgerung

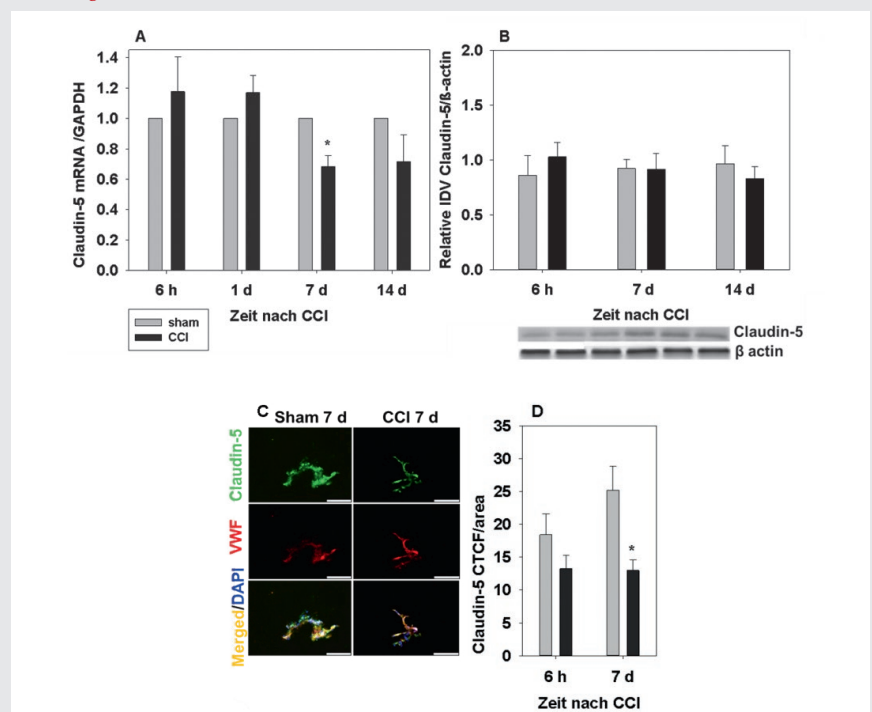
Zusammengefasst kommt es bei CCI/SNI nicht nur zu Allodynie/Hyperalgesie und Beeinträchtigung der motorischen Aktivität, sondern auch zu einer Verringerung der Perizytenzahl, einem undichten BSCB und Verringerung der TJP. Ein besseres Verständnis dieser Wege und Mechanismen bei neuropathischen Schmerzen könnte neue Therapien zur Aufrechterhaltung der Rückenmarks-Homöostase fördern.

Gefördert durch das Else Kröner-Fresenius Stiftung und EU-Projekt ncRNAPain (FP7/2007-2013, grant agreement 602133).

### Literatur

1. Winkler EA, Sengillo JD, Sullivan JS, Henkel JS, Appel SH, Zlokovic BV: Blood-spinal cord barrier breakdown and pericyte reductions in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* 2013;125(1):111-20
2. Echeverry S, Shi XQ, Rivest S, Zhang J: Peripheral nerve injury alters blood-spinal cord barrier functional and molecular integrity through a selective inflammatory pathway. *J Neurosci* 2011;31(30):10819-28.

Abbildung 1



Selektiv in Kapillaren verminderte mRNA und membranäre Claudin-5-Expression im Rückenmark 7 d nach CCI. (A) Claudin-5 mRNA wurde im lumbalen Teil des Rückenmarks durch RT qPCR 6 h, 1, 7 und 14 d nach CCI oder shamoperation analysiert. (B) Proteinexpression wurde mittels Western Blot gemessen und densitometrisch quantifiziert. (C) Immunfärbung aus dem Rückenmark isolierten Kapillaren. Endothelmarker, von-Willebrand-Faktor, VWF (rot) und TJP-Claudin-5 (grün). (D) Die Immunreaktivität wurde mit Image J Software quantifiziert (n=6, Werte repräsentieren MW  $\pm$  SEM \* $p < 0,05$ ; Two Way ANOVA, Student-Newman-Keuls Method).

## Einfluss von Xenonbeatmung auf die Lungenmechanik und die Verteilung der Lungenbelüftung bei lungengesunden Patienten

M. S. Schäfer · J. Gauch · T. A. Treschan · P. Kienbaum

Klinik für Anästhesiologie, Universitätsklinikum Düsseldorf

### Korrespondenz:

maximilian.schaefer@med.uni-duesseldorf.de

### Fragestellung

Das inhalative Anästhetikum Xenon zeigt tierexperimentell organprotektive Effekte [1] und könnte dadurch zusätzlich zur anästhetischen Wirkung einen Ventilator-induzierten Lungenschaden reduzieren. Durch das im Vergleich zur Luft höhere spezifische Gewicht und die höhere dynamische Viskosität ist jedoch der inspiratorische Spitzendruck ( $P_{\max}$ ) bei Xenonbeatmung gesteigert [2]. Da ein mögliches Barotrauma jedoch insbesondere durch die Höhe des transpulmonalen Drucks ( $P_{tp}$ ) bestimmt und dieser durch die Thoraxcompliance beeinflusst wird, untersuchten wir den Einfluss einer Xenonbeatmung auf den  $P_{tp}$  bei Patienten mit normaler und mit Adipositas-assoziiierter verminderter Thoraxcompliance. Wir testeten ferner die These, dass Xenon einer Atelektasenbildung beim beatmeten Patienten entgegenwirken kann.

### Methodik

Nach Registrierung (NCT02682758) und positivem Votum der zuständigen Ethikkommission (5161R, 29.9.2015) wurden 10 nicht-adipöse („body mass index“, BMI < 25 kg/m<sup>2</sup>) sowie 10 adipöse (BMI > 30 kg/m<sup>2</sup>) lungengesunde Patienten, die sich einem peripheren Eingriff unter Xenon-basierter Anästhesie unterzogen, in diese Anwendungsbeobachtung eingeschlossen (Alter 53 ± 18 Jahre). Als primäre Zielvariable wurde unter Beatmung (8 ml/kg Idealgewicht, PEEP 5 mbar) der  $P_{tp}$  aus der Differenz zwischen inspiratorischem Plateaudruck ( $P_{plat}$ ) und dem intraösophagealen Druck ( $P_{ös}$ ) berechnet. Als sekundäre Zielvariablen bestimmten wir die statische ( $C_{stat}$ ) und dynamische Lungencompliance ( $C_{dyn}$ ), den Atemwegwiderstand ( $R_{AW}$ ) sowie die dorsoventrale Verteilung des Tidalvolumens als „Center of Ventilation Index“ (CVI) durch elektrische Impedanztomographie (EIT,

PulmoVista 500, Draeger). Die Homogenität der Ventilation wurde anhand des Inhomogenitätsindex (HI) nach Guttman [3] quantifiziert. Die Messungen erfolgten: 1. während Spontanatmung vor Anästhesieeinleitung, 2. nach Anästhesieeinleitung (Propofol, Remifentanyl, Rocuronium,  $F_iO_2 > 0,9$ ) sowie 3. während Xenon-basierter Anästhesie ( $F_iXe 0,6$ ). Wir führten alle Berechnungen zunächst für die Gesamtpopulation und anschließend als Subgruppenanalyse (adipös/nicht-adipös) durch. Statistik:  $\bar{x} \pm SD$ , gepaarter t-Test, RM-ANOVA, Dunn-Sidak-post-hoc-Test,  $p < 0,05$ .

### Ergebnisse

Xenonbeatmung war mit einem um 9 Prozent signifikant erhöhten  $P_{\max}$  assoziiert. Gleichzeitig blieb der  $P_{tp}$  unverändert (Abb. 1). Während  $C_{dyn}$  durch Xenon reduziert ( $33,9 \pm 7$  vs  $31,2 \pm 6$  ml mbar<sup>-1</sup>,  $p < 0,001$ ) und  $R_{AW}$  erhöht wurde ( $0,9 \pm 0,2$  vs  $1,4 \pm 0,3$  mbar l<sup>-1</sup> s,  $p < 0,001$ ), blieb  $C_{stat}$  konstant ( $44,0 \pm 11$  vs  $44,1 \pm 13$  ml mbar<sup>-1</sup>). Nach Anästhesieeinleitung beobachteten wir die typische Ventralisierung der Lungenbelüftung (CVI  $0,53 \pm 0,03$  vs  $0,60 \pm 0,03$ ,  $p < 0,05$ ), die durch Xenon nicht beeinflusst wurde. Die mit Anästhesie und Beatmung zunehmende Inhomogenität der Lungenbelüftung (HI  $0,35 \pm 0,02$  vs  $0,38 \pm 0,03$ ,  $p < 0,05$ ) war unter Xenon unverändert. Schließlich konnten wir keinen klinisch relevanten Unterschied der primären und se-

kundären Zielvariablen in Abhängigkeit vom BMI der Patienten nachweisen.

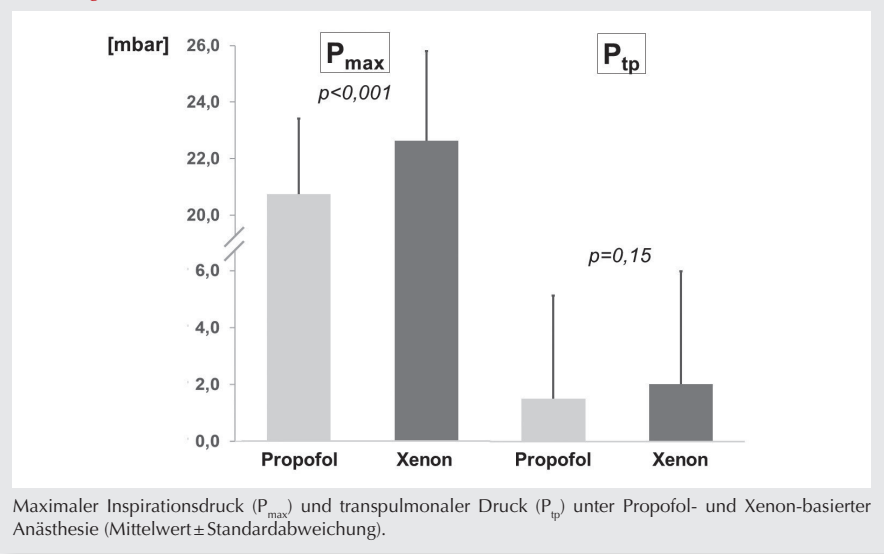
### Interpretation

Xenonbeatmung erhöht den Beatmungsdruck bei unverändertem transpulmonalem Druck unabhängig von der Thoraxwandcompliance der Patienten. Die isolierte Reduktion der vom Atemwegwiderstand abhängigen dynamischen Compliance kann durch die höhere Viskosität des Edelgases erklärt werden. Weder bei normalgewichtigen noch bei adipösen lungengesunden Patienten beeinflusst Xenon die mit Anästhesie und Beatmung assoziierte Atelektasenbildung.

### Literatur

1. Zhao H, Huang H, Ologunde R, Lloyd D, Watts H, Vizcaychipi M, et al: Xenon Treatment Protects against Remote Lung Injury after Kidney Transplantation in Rats. *Anesthesiology* 2015;122:1312-26
2. Rueckoldt H, Vangerow B, Marx G, Haubitz B, Meyer MC, Piepenbrock, S, et al: Xenon inhalation increases airway pressure in ventilated patients. *Acta Anaesthesiol Scand* 1999;43:1060-64
3. Zhao Z, Möller K, Steinmann D, Frerichs I, Guttman J: Evaluation of an electrical impedance tomography-based Global Inhomogeneity Index for pulmonary ventilation distribution. *Intensive Care Med* 2009;35:1900-1906.

Abbildung 1



## G-Protein-gekoppelte Rezeptor-kinase 2 moduliert das Signalverhalten gängiger Opioide am $\mu$ -Opioidrezeptor

B. Schmid<sup>1,2</sup> · S. Mayer<sup>1</sup> · T. Schmitt<sup>1</sup> · U. Zabel<sup>1</sup> · J. van Unen<sup>3</sup> · J. Geodhart<sup>3</sup> · T. Ozawa<sup>4</sup> · A. Bock<sup>1</sup> · M. Brede<sup>2</sup> · C. Hoffmann<sup>1</sup>

1 Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Würzburg

2 Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie, Universitätsklinikum Würzburg

3 Swammerdam Institute for Life Sciences, Universität Amsterdam, Niederlande

4 Department of Chemistry, Universität Tokio, Japan

**Korrespondenz:** Schmid\_B@ukw.de

### Fragestellung

Als Liganden am  $\mu$ -Opioidrezeptor wirken Opioide auf molekularer Ebene in erster Linie durch Aktivierung eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors (GPCR). Vom Rezeptor ausgehend führen zwei Signalwege in das Zellinnere, denen unterschiedliche Rollen in Bezug auf (un-)erwünschte Wirkungen der Opioide zugeschrieben werden: 1. Aktivierung des namensgebenden G-Proteins (Analgesie). 2. Rekrutierung von  $\beta$ -Arrestinen ( $\beta$ Arr; Beendigung des G-Proteinsignals und unerwünschte Wirkungen). Dazwischen erfolgt die Phosphorylierung des aktivierten Rezeptors durch G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen (GRK), die jenen hochaffin für die  $\beta$ Arr-Bindung machen. Am  $\mu$ -Rezeptor kommt hierbei GRK2 die größte Bedeutung zu. Zuletzt wurde in der pharmakologischen Forschung vermehrt nach selektiven G-Protein-Aktivatoren gesucht. Das Konzept von ligandenspezifisch unterschiedlichen Signalmustern, die durch Aktivierung desselben Rezeptors hervorgerufen werden können, wird als „biased agonism“ bezeichnet.

In der vorliegenden Arbeit sollen zwei Fragen beantwortet werden: 1. Gibt es unter den in der klinischen Routine häufig verwendeten Opioiden solche, die einen Signalweg signifikant stärker aktivieren als den anderen („biased agonists“)? 2. Welchen Einfluss haben verschiedene Expressionslevel von GRK2 im untersuchten Zellsystem auf dieses Phänomen?

### Methodik

Konzentrations-Wirkungs-Kurven für G-Proteinaktivierung und die Rekrutierung von  $\beta$ Arr durch 17 Liganden des  $\mu$ -Opioidrezeptors wurden in getrennten Assays in HEK-293-Zellen ermittelt. Die Zellen wurden je nach zu

untersuchendem Signalweg mit geeigneten fluoreszenten Rezeptor-, G-Protein- und  $\beta$ Arr-Konstrukten transfiziert. GRK2 wurde nach Bedarf ebenfalls transfiziert oder bei endogenen Expressionsleveln belassen. Der quantitative Readout erfolgte mittels Resonanz-Energietransfermessungen (G-Proteinaktivierung: Fluoreszenz;  $\beta$ Arr-Rekrutierung: Biolumineszenz). Anhand von Regressionsanalysen der Messwerte erfolgte die Berechnung von „biased agonism“ nach der Methode von Kenakin [1].

### Ergebnisse

Im untersuchten Set von Opioiden wurden „biased agonists“ identifiziert: Sufentanil bevorzugte signifikant den  $\beta$ -Arrestin-2-Signalweg ( $\Delta\log/K_A=0,76 \pm KI 0,66$ ). Remifentanyl bevorzugt den G-Proteinsignalweg ( $0,88 \pm 0,56$ ). Vier weitere Opioide riefen keine messbare  $\beta$ Arr-Rekrutierung hervor (Buprenorphin, Tapentadol, Tilidin und Tramadol). GRK2-Überexpression hatte deutlichen Einfluss auf die Pharmakodynamik der  $\beta$ Arr-Rekrutierung: Bei allen Agonisten erhöhte sich der maximale Effekt, und die Potenz erfuhr eine Linksverschiebung (Abb. 1). Einzig Buprenorphin blieb ein funktioneller Antagonist des  $\beta$ -Arrestinwegs. Es konnte kein signifikanter Bias mehr nachgewiesen werden.

### Interpretation

Aus den abgeleiteten Konzentrations-Wirkungs-Kurven für 17 Opioide ergaben sich für beide Signalwege Maximaleffekte ( $E_{max}$ ) und Potenzen ( $EC_{50}$ ), die – wo vorhanden – gut mit bereits publizierten Werten korrelieren [2]. Die Berechnungen zum „biased agonism“ anhand des vorliegenden Sets von Opioiden

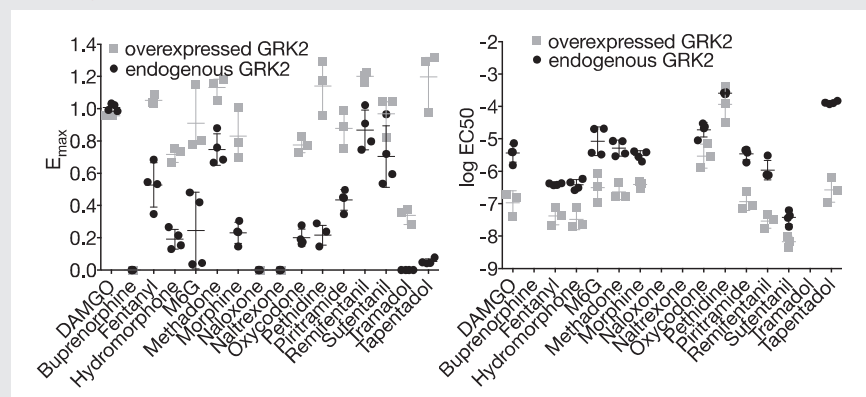
zeigen zweierlei: 1. „Biased agonism“ existiert auch an bereits heute im klinischen Einsatz befindlichen Substanzen. Ob dies für die identifizierten Substanzen unmittelbaren Einfluss auf ihr klinisches Wirkprofil hat, ist aus verschiedenen Gründen fraglich (fehlende systematische Analysen, teilweise geringe analgetische Wirkstärke, teilweise fehlende Selektivität für den  $\mu$ -Opioidrezeptor).

2. Bei der gezielten Suche nach G-Proteinselektiven Opioiden muss deren Empfindlichkeit für GRK2-Expressionslevel als unabhängige Variable in die pharmakologische Beurteilung mit eingehen. Dies ist umso wichtiger, da Untersuchungen zu anderen Krankheitsentitäten (z.B. Herzinsuffizienz) zeigen, dass GRK2-Expressionslevel in verschiedenen Geweben krankheitsabhängig dynamisch reguliert werden [3]. Weitere Forschung ist erforderlich, um hier eventuelle Implikationen für eine personalisierte opiatgestützte Schmerztherapie herauszuarbeiten.

### Literatur

1. Kenakin T, Watson C, Muniz-Medina V, et al: A Simple Method for Quantifying Functional Selectivity and Agonist Bias. ACS Chem. Neurosci 2012;3:193-203
2. McPherson J, Rivero G, Baptist M, et al:  $\mu$ -Opioid Receptors: Correlation of Agonist Efficacy for Signalling with Ability to Activate Internalization. Mol Pharmacol 2010;78:756-66
3. Sato PY, Chuprun JK, Schwartz M, Koch WJ: The Evolving Impact of G Protein-Coupled Receptor Kinases in Cardiac Health and Disease. Physiol Rev 2015;95:377-404.

Abbildung 1



Maximale Effektstärken ( $E_{max}$ , links) und Potenzen ( $EC_{50}$ , rechts) aller untersuchter Opioide für die Rekrutierung von  $\beta$ Arr2 an den  $\mu$ -Rezeptor. Überexpression von GRK2 führt bei allen Substanzen mit Ausnahme von Buprenorphin zu einer Erhöhung von  $E_{max}$  und einer Linksverschiebung von  $EC_{50}$ . Dargestellt sind Einzelwerte der betreffenden Parameter aus den jeweiligen Kurvenanpassungen sowie deren Streubreite.

## Der Beatmungsmodus „Expiratory Ventilation Assistance“ verbessert die Oxygenierung beim gesunden Schwein

J. Schmidt<sup>1</sup> · S. Spassov<sup>1</sup> · J. Haberstroh<sup>2</sup> · S. Wirth<sup>1</sup> · S. Schumann<sup>1</sup>

1 Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin  
2 Experimentelle Chirurgie, Center for Experimental Models and Transgenic Service  
Universitätsklinikum Freiburg, Medizinische Fakultät, Universität Freiburg

### Korrespondenz:

johannes.schmidt@uniklinik-freiburg.de

### Fragestellung

Bei der kontrollierten mechanischen Beatmung beschränkt sich die Steuerung der Expiration auf die Einstellung eines positiven endexpiratorischen Drucks (PEEP) und der Expirationszeit. Es existieren Hinweise, dass eine Fluss-kontrollierte Expiration einen lungenprotektiven Effekt haben könnte [1]. Der neue Beatmungsmodus „Expiratory Ventilation Assistance“ (EVA) bedient sich einer kontrollierten Expiration, wodurch ein linearisierter Druckabfall erzielt wird [2]. Daher prüften wir in einer präklinischen, kontrollierten Interventionsstudie die Hypothese, dass durch den EVA-Modus ein erhöhter mittlerer Trachealdruck und konsekutiv eine höhere Oxygenierung sowie eine gesteigerte Belüftung der Lunge resultieren.

### Methodik

Die Lungen gesunder Schweine (Az. 35-9185.81/G-15/167, Regierungspräsidium Freiburg) wurden unter Allgemeinanästhesie mit dem neuen EVA-Modus (EVA; n=7) oder im Volumen-kontrollierten Modus (Kontrolle; n=7) jeweils für 5 h beatmet ( $V_T$  8 ml/kgKG, PEEP 5 mbar,  $etCO_2$  35-45 mmHg,  $F_{I,O_2}$  0,3). In definierten Abständen wurden respiratorische Variablen (Trachealdruck ( $P_{trach}$ ), Minutenvolumen (MV), Gasaustausch ( $p_aO_2$ ,  $p_aCO_2$ )) und hämodynamische Werte (arterieller Mitteldruck, Herzfrequenz, Herzindex) erhoben. Nach 5 h wurde eine dynamische Computertomographie (dynCT, axiale Schnittebene, 60 Bilder ohne Tischvorschub in 45 sec) auf mittlerem thorakalem Niveau

durchgeführt. Anschließend wurden die prozentualen Anteile von normal bzw. schlecht belüftetem Lungengewebe [3] durch einen automatisierten Algorithmus bestimmt. Nach der dynCT wurden die Tiere euthanasiert und Lungengewebe zur histopathologischen Untersuchung asserviert. Die statistische Analyse erfolgte bei wiederholten Messwerten mit zweifaktorieller RM-ANOVA, gefolgt von Bonferroni-korrigierten multiplen Vergleichstests bzw. bei einfachen Vergleichen mit zweiseitigen Student's t-Tests. Ein  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen.

### Ergebnisse

Im Vergleich mit den Tieren der Kontrollgruppe zeigte sich in der EVA-Gruppe ein erhöhter mittlerer  $P_{trach}$  ( $9,0 \pm 0,3$  vs.  $11,6 \pm 0,4$  cmH<sub>2</sub>O;  $p < 0,0001$ ) bei vergleichbarem Spitzendruck ( $18,0 \pm 1,2$  vs.  $18,3 \pm 0,9$  cmH<sub>2</sub>O;  $p > 0,99$ ) sowie ein erniedrigtes MV ( $7,0 \pm 1,0$  vs.  $5,5 \pm 0,2$  l/min;  $p = 0,02$ ) bei vergleichbarem  $p_aCO_2$  ( $41 \pm 2$  vs.  $40 \pm 2$  mmHg;  $p > 0,99$ ). Im Vergleich zu den Kontrolltieren war der  $p_aO_2$  in der EVA-Gruppe erhöht ( $131 \pm 3$  vs.  $144 \pm 5$  mmHg;  $p = 0,002$ ; Abb. 1A). Die dynCT zeigte in der EVA-Gruppe einen erhöhten Anteil von normal belüftetem Lungengewebe ( $75,8 \pm 3,0$  vs.  $81,0 \pm 3,6$  %;  $p = 0,017$ ) sowie einen geringeren Anteil von schlecht belüftetem Lungengewebe ( $15,7 \pm 3,5$  vs.  $9,5 \pm 3,3$  %;  $p = 0,007$ ; Abb. 1B). Die Auswertung der hämodynami-

schen Parameter sowie der Histopathologie ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen.

### Interpretation

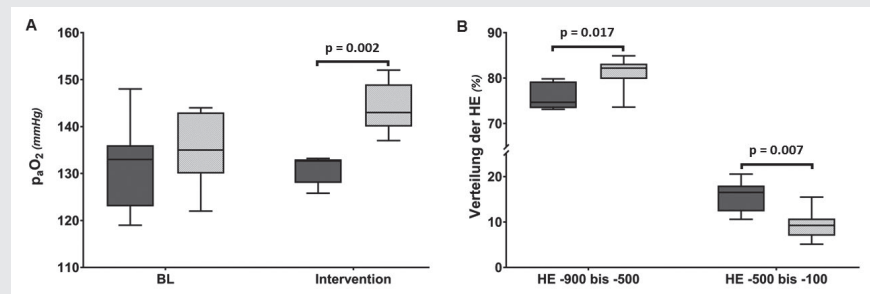
Der EVA-Beatmungsmodus erhöht bei gleichem PEEP und Spitzendruck den mittleren Trachealdruck und erzeugt daher eine bessere dynamische Belüftung der Lunge und eine bessere arterielle Oxygenierung. EVA bietet über die Kontrolle des expiratorischen Flusses möglicherweise einen weiteren Ansatz für eine lungenprotektive Beatmungsstrategie.

Gefördert durch die Europäische Kommission (Horizon 2020, grant agreement No. 691519).

### Literatur

- Goebel U, Haberstroh J, Foerster K, Dassow C, Priebe H-J, Guttmann J, et al: Flow-controlled expiration: a novel ventilation mode to attenuate experimental porcine lung injury. *Br J Anaesth* 2014;113:474-83
- Hamaekers AEW, Götz T, Borg PAJ, Enk D: Achieving an adequate minute volume through a 2 mm transtracheal catheter in simulated upper airway obstruction using a modified industrial ejector. *Br J Anaesth* 2010;104:382-86
- Gattinoni L, Caironi P, Pelosi P, Goodman LR: What has computed tomography taught us about the acute respiratory distress syndrome? *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:1701-11.

Abbildung 1



Oxygenierung und computertomographisch bestimmte Belüftung der Lungen bei Volumen-kontrollierter Beatmung ■ im Vergleich zu Beatmung im EVA-Modus □

A: arterieller Sauerstoffpartialdruck ( $p_aO_2$ ) während Baseline-Messung (BL) und Intervention.

B: Relativer Anteil der Bildpunkte (Voxel) mit Hounsfield-Einheiten (HE), die normale (-900 bis -500 HE) und schlechte (-500 bis -100 HE) Belüftung indizieren [3], bezogen auf das gesamte Lungenvolumen. Dargestellt ist jeweils der Median, der Interquartilsabstand und die gesamte Spannweite.

### Analyse der zerebralen Resting-state-Aktivität in einem Tiermodell für postoperative Schmerzen unter Modulation des spinalen GABAergen Systems

D. Segelcke<sup>1</sup> · N. Just<sup>2</sup> · C. Faber<sup>2</sup> · E. M. Pogatzki-Zahn<sup>1</sup>

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

2 Institut für Klinische Radiologie – Universitätsklinikum Münster, Westfälische Wilhelms-Universität Münster

**Korrespondenz:** Segelcke@anit.uni-muenster.de

#### Fragestellung

Verschiedene Imaging-Studien konnten in den vergangenen Jahren zerebrale Regionen identifizieren, welche bei der Wahrnehmung und Verarbeitung von Schmerzen eine Rolle spielen. Unsere Arbeitsgruppe hat sich hierbei funktionellen kortikalen Prozessen von Schmerzen nach einer operativen Inzision in tier- und humanexperimentellen Ansätzen gewidmet [1,2]. Interessante neuere Untersuchungsansätze analysieren im Rahmen schmerzverarbeitender Prozesse zerebrale Resting State (rs)-Netzwerke; hierbei werden Interaktionen von Hirnregionen unter Ruhebedingungen aufgezeigt, die ein Korrelat für nicht-evozierte Ruheschmerzen und Chronifizierungsprozesse im Rahmen von Schmerzerkrankungen darstellen könnten. Das Ziel der hier vorgestellten Studie ist die erstmalige Erfassung von rs-Netzwerken in einem etablierten Tiermodell für postoperative Schmerzen. Darüber hinaus soll die Bedeutung der Modulation des spinalen GABAergen Systems, die für Hyperalgesie und Schmerzverhalten nach Inzision bekannt ist [3], für diese zerebralen Netzwerke untersucht werden.

#### Methodik

Männliche Sprague-Dawley-Ratten (n=10, 180-250 g) erhielten einen intrathekalen (IT) Katheter und drei Tage später eine standardisierte Inzision an der rechten Hinterpfote, welche 24 h vor der MRT-Messung (unter Medetomidin-Narkose) in einem 9,4 T Bruker Biospec mit einer EPI Sequenz (TR/TE=1000

/18 ms, FOV=28x26 mm<sup>2</sup>, Matrix=80x80, BW=300 kHz, 16 slices, 1,2 mm Schichtdicke, 600 EPI-Bilder) durchgeführt wurde [1]. Es erfolgte eine Messung 60 min nach IT-Gabe eines GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Agonisten (Muscimol, 0,3 µg, Mu) oder Vehikel (0,9% Saline, V). Mit SPM12 wurden dicom Bilder in das nifti Format umgewandelt. Nach der Neuorientierung und der Bewegungskorrektur wurden die EPI-Sequenzen von Resting State-Aufnahmen mit einem selbstprogrammierten anatomischen Template normiert und bandpassgefiltert (0,01-0,1 Hz). Als Region of Interests (ROI's) wurden der somatosensorische Kortex (S1 und S2), Hippocampus (Hip) und das PAG für die Analysen ausgewählt. Funktionelle Konnektivitäts (FC)-Karten wurden unter Verwendung von SPM12 durch Korrelation des mittleren Zeitverlaufs zu jedem Pixel-Zeitverlauf für jede einzelne rs-fMRI-Reihe erzeugt. Die erzeugten T-Wert-Karten wurden für jede Ratte mit einem Mehrfachvergleich mit einem Schwellenwert p<0,001 (FWE) korrigiert.

#### Ergebnisse

Die globale funktionale Konnektivität (GFK) der rs-Netzwerke nahm in allen vier exemplarisch untersuchten Hirnregionen nach Inzision im Vergleich zur Sham-Gruppe zu. In der Muscimol-Gruppe nahm die GFK im Vergleich zur Vehikel-Gruppe ab; diese Abnah-

me war im PAG signifikant (U-test, p<0,05) von 2312,3 ± 1576 (Mittelwert ± SD) auf 300 ± 653 reduziert (Abb.1).

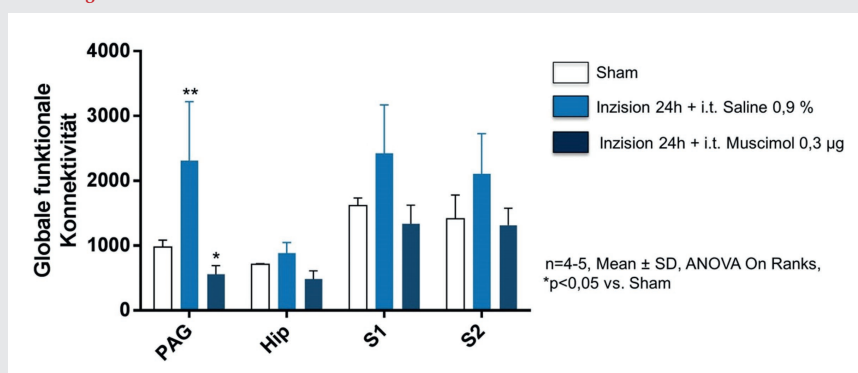
#### Interpretation

Nach Inzision kommt es zu einem Anstieg der GFK rs-Netzwerke, welche durch eine spinale pharmakologische Aktivierung des GABAergen Systems über einen spezifischen GABA<sub>A</sub>-Rezeptoragonisten reduziert werden kann. Eine inzisionsbedingte Modulation des spinalen GABAergen-Systems trägt damit möglicherweise zu einer Modulation von zerebralen rs-Netzwerken und Hyperalgesie nach Inzision bei.

#### Literatur

1. Amirmohseni S, Segelcke D, Reichl S, Wachsmuth L, Görlich D, Faber C, et al: Characterization of incisional and inflammatory pain in rats using functional tools of MRI. *NeuroImage* 2016;127:110-122
2. Pogatzki-Zahn EM, Wagner C, Meinhardt-Renner A, Burgmer M, Beste C, Zahn PK, et al: Coding of incisional pain in the brain: a functional magnetic resonance imaging study in human volunteers. *Anesthesiology* 2010;112:406-417
3. Reichl S, Augustin M, Zahn PK, Pogatzki-Zahn EM: Peripheral and spinal GABAergic regulation of incisional pain in rats. *Pain* 2012;153:129-141.

Abbildung 1



Globale funktionale Konnektivitätsänderung der rs-Netzwerke des S1, S2, dem PAG und dem Hippocampus, bei Sham-Tieren (Kontrolle), 24 h nach Induktion einer Inzision an der rechten Hinterpfote und 60 min nach intrathekalen Applikation eines spezifischen GABA<sub>A</sub>-Agonisten (Muscimol) oder Vehikel (Saline 0,9%).

## Identifikation essentieller Regulationsmechanismen der GRK6-Expression und mögliche Bedeutung für die Inflammation

M. Stegen<sup>1</sup> · A. Engler<sup>1</sup> · C. Ochsenfarth<sup>1</sup> · I. Manthey<sup>2</sup> · W. Siffert<sup>2</sup> · J. Peters<sup>1</sup> · U. H. Frey<sup>1</sup>

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

2 Institut für Pharmakogenetik, Universität Duisburg-Essen & Universitätsklinikum Essen

### Korrespondenz:

maike.stegen.mail@stud.uni-due.de

### Fragestellung

G-Protein gekoppelte Rezeptorkinasen (GRK) ermöglichen durch homologe Desensitivierung die Modulation G-Protein gekoppelter Signalweiterleitung. Ein Knockout der G-Protein-gekoppelten-Rezeptorkinase-6 (GRK6) führt durch fehlende Desensibilisierung von Chemokinrezeptoren zu Zytokin-induzierter Hyperalgesie bei Mäusen [1]. Ferner reguliert GRK6 im Sinne negativen Feedbacks die  $\beta_2$ -adrenerge Signaltransduktion und damit die zelluläre cAMP-Konzentration [2]. Da auch der Proteinkinase C (PKC)-Signalweg bei inflammatorisch bedingter Hyperalgesie relevant ist [3], untersuchten wir: 1) welche Mechanismen die GRK6-Expression auf Promotorebene regulieren und 2) welchen Einfluss der PKC-Signalweg auf die GRK6-Expression hat.

### Methodik

Der humane GRK6-Promotor wurde mittels PCR amplifiziert, in den pGEM-T-Easy-Vektor

kloniert und nach Sequenzierung und Herstellung von fünf Deletionskonstrukten in den pGL4.10-Vektor subkloniert. Nach Transfektion in die humane Jurkat-T-Zell-Linie wurde die Promotoraktivität der Deletionskonstrukte untersucht (Luciferase-Assays). Putative Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen wurden mittels Site-directed-mutagenesis mutiert und auf deren Funktionalität (electrophoretic mobility shift assay, EMSA) geprüft. Jurkat-Zellen wurden zudem mit dem PKC-Aktivator Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) stimuliert und die Auswirkungen auf die GRK6-Promotoraktivität untersucht. Endogene GRK6-mRNA-Expression (Real Time-PCR) und GRK6-Proteinexpression (Western Blot) wurden nach PMA-Stimulation in Jurkat-Zellen gemessen. Statistik: Wilcoxon-Test bzw. 2-Wege ANOVA mit Sidak's-Post-hoc-Test für multiple Vergleiche. Mittelwerte  $\pm$  SEM;  $p < 0,05$ .

### Ergebnisse

Das GRK6-Deletionskonstrukt -296 (relativ zum Translationsstartpunkt ATG) zeigte im Luciferase-Assay den höchsten Aktivitätszuwachs im Vergleich zum nächstkürzeren Konstrukt (Abb.1A) als Hinweis auf essentielle Regulatorbindungsstellen im Bereich -296 bis -210. Eine in Silico-Analyse dieses Bereiches ergab u.a. eine Transkriptionsfaktor-Bindungsstelle für das cAMP responsive element (CRE)-binding protein (CREB), und die Mutation eben dieser Sequenz bewirkte einen deutlichen Abfall der Promotoraktivität im Vergleich zum Wildtyp ( $p < 0,0001$ ). Die Funktionalität der CREB-Bindungsstelle bestätigte sich im EMSA mit Super-Shift (Abb.1B). PMA-Stimulation (10 nM) führte zu einer Abnahme der GRK6-Promotoraktivität ( $p =$

0,001). In Übereinstimmung damit zeigte sich nach 6-stündiger PMA-Stimulation (100 nM) eine Verminderung der endogenen GRK6-mRNA-Expression um 20% ( $p = 0,016$ ). Nach 6-stündiger Stimulation mit 100 nM PMA war auch die GRK6-Protein-Expression in Jurkat-Zellen reduziert.

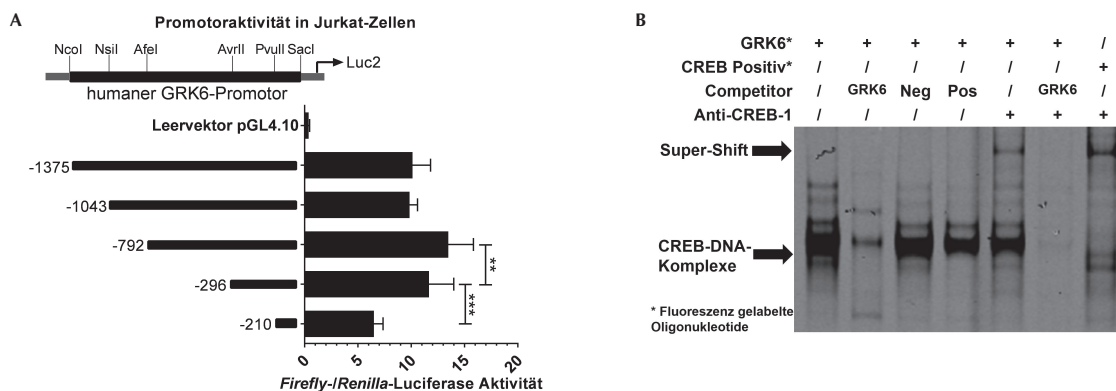
### Interpretation

Wir konnten somit erstmalig den GRK6-Promotor charakterisieren und eine Herunterregulation der GRK6-Expression nach Aktivierung des PKC-Signalweges nachweisen. Die identifizierte und aktivitätsbestimmende CRE-Sequenz im GRK6-Promotor indiziert zudem eine Beteiligung der Expressionsregulation am cAMP-abhängigen Feedback-Mechanismus der GRK6.

### Literatur

1. Eijkelkamp N, Heijnen CJ, Carbajal AG, Willems HL, Wang H, Minett MS, et al: G protein-coupled receptor kinase 6 acts as a critical regulator of cytokine-induced hyperalgesia by promoting phosphatidylinositol 3-kinase and inhibiting p38 signaling, *Mol Med* 2012;18:556-64
2. Violin JD, DiPilato LM, Yildirim N, Elston TC, Zhang J, Lefkowitz RJ: Beta2-adrenergic receptor signaling and desensitization elucidated by quantitative modeling of real time cAMP dynamics, *J Biol Chem* 2008;283:2949-61
3. Khasar SG, Lin YH, Martin A, Dadgar J, McMahon T, Wang D, et al: A novel nociceptor signaling pathway revealed in protein kinase C epsilon mutant mice, *Neuron* 1999;24:253-60.

Abbildung 1



A Das Konstrukt -296 zeigt im Luciferase-Assay den größten Aktivitätszuwachs. Wilcoxon-Test, Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n = 7$  (Doppelbestimmungen). \*\*\*  $p = 0,0002$ , \*\*  $p = 0,0051$ . B Super-Shift im EMSA nach Zugabe von Anti-CREB-1-Antikörper. Je 5  $\mu$ g Jurkat-Zellkernextrakt pro Ansatz.

### Therapeutisches Potential des H<sub>2</sub>S-Metaboliten Thiosulfat beim Ischämie-Reperfusionssyndrom

L. Ungelenk<sup>1</sup> · A. Medyukhina<sup>2</sup> · A. T. Press<sup>1</sup> · S. Weis<sup>1</sup> · S. Nietzsche<sup>1</sup> · M. G. Clemens<sup>3</sup> · A. Lupp<sup>1</sup> · R. Wang<sup>4</sup> · M. T. Figge<sup>2</sup> · M. Bauer<sup>1</sup>

1 Universitätsklinikum Jena

2 Hans-Knöll Institut, Jena

3 University of North Carolina, Charlotte, USA

4 Laurentian University, Sudbury, Canada

#### Korrespondenz:

Luisa.Ungelenk@med.uni-jena.de

#### Fragestellung

Hepatische Ischämie-Reperfusionsschäden (IR) treten bei Lebertransplantation, Tumoresektion und hämorrhagischem Schock auf und korrelieren mit dem Krankheitsverlauf und dem Versterben von Patienten [1]. Um den Krankheitsverlauf zu verbessern, wird in zahlreichen Studien der Einsatz von Gasotransmittern wie Schwefelwasserstoff (H<sub>2</sub>S) untersucht [2]. Gasotransmitter werden endogen produziert und steuern verschiedene molekularbiologische Prozesse. Jedoch zeigten verschiedene Studien zum Einsatz von H<sub>2</sub>S während IR widersprüchliche Ergebnisse. In unserer Studie untersuchten wir den Einfluss des H<sub>2</sub>S-Abbauproduktes Natriumthiosulfat (STS) auf die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und die assoziierte mitochondriale Dysfunktion. STS wird seit Jahrzehnten zu Behandlung von Zyanid-Vergiftungen eingesetzt [3].

#### Methodik

Wir verwendeten nach behördlicher Genehmigung (02-035/12) ein hepatisches IR-Modell in vivo sowie ein Ex-vivo-Modell der isoliert perfundierten Leber. Dabei wurden Wildtyp (WT)- und Cystathionin-gamma-Lyase (Cse<sup>-/-</sup>)-Knockout-Mäuse, in denen die endogenen H<sub>2</sub>S-Konzentrationen reduziert waren, mit und ohne STS-Behandlung (45 mg/kgKG) untersucht. Wir quantifizierten den hepatischen Gewebeschaden, die Serologie sowie die antioxidative Kapazität der Leber. Um die mitochondriale Membranstabilität zu untersuchen, verwendeten wir die Intravital-

mikroskopie (Rhodamine 123). Des Weiteren untersuchten wir die mitochondriale Atmung sowie die Mitophagie als Schlüsselprozesse des IR. Die statistische Überprüfung erfolgte mittels Two-way ANOVA und Tukey-Korrektur.

#### Ergebnisse

Mittels Intravitalmikroskopie konnten wir zeigen, dass Cse<sup>-/-</sup>-Mäuse eine erhöhte mitochondriale Dysfunktion unter Stressbedingungen aufweisen. Der Einsatz von Natriumhydrogensulfid (NaHS) als H<sub>2</sub>S-Donor wirkte protektiv gegen oxidativen Stress, jedoch mit einem sehr engen therapeutischen Fenster, sodass ein klinischer Einsatz ausscheidet. STS, welches zur Anwendung am Menschen zugelassen ist, wirkt hingegen auch bei deutlich höheren Konzentrationen protektiv auf die mitochondriale Atmungskette, indem es ROS abfängt. Im Verlauf des IR reduziert STS die Lactatdehydrogenase (LDH)-Ausschüttung im Ex-vivo-IR-Modell. Dieser Effekt korreliert mit einer geringeren Autophagie und dem Erhalt der mitochondrialen Ultrastruktur. In vivo zeigte die Behandlung mit STS vor Eintreten der Reperfusion, dass die Nekrose im hepatischen Gewebe reduziert und die Plasma-Alanin-Aminotransferase (ALT) sowie die LDH-Konzentration verringert waren. Ebenfalls konnten wir zeigen, dass STS vor einer Depolarisierung der Mitochondrienmembran schützt und damit die mitochondriale Funktion aufrechterhält (Abb.1).

#### Interpretation

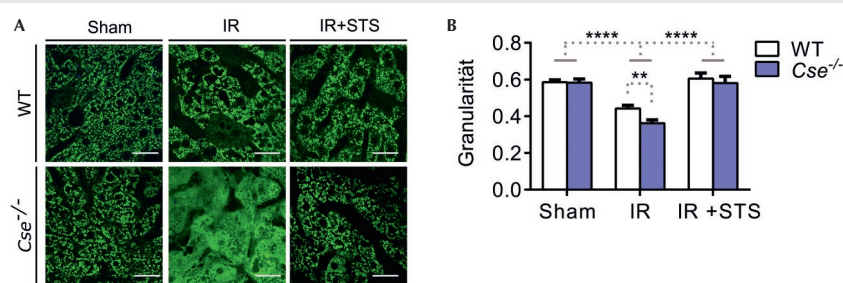
Mit der vorliegenden Studie konnten wir nachweisen, dass endogenes H<sub>2</sub>S eine wichtige Rolle für die antioxidative Kapazität der Leber spielt. Jedoch ist der klinische Einsatz des Gasotransmitters aufgrund seines engen therapeutischen Fensters stark limitiert. Wir konnten jedoch zeigen, dass der Einsatz von STS im IR-Modell den Leberschaden reduziert und damit eine potentielle Therapie bei Erkrankungen, die mit IR assoziiert sind, darstellt. Diese Protektion wird durch die Aufrechterhaltung der mitochondrialen Atmung und Membranintegrität vermittelt.

Gefördert durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (RTG 1715).

#### Literatur:

1. Recknagel P, Gonnert FA, et al: Liver dysfunction and phosphatidylinositol-3-kinase signalling in early sepsis: experimental studies in rodent models of peritonitis. *PLoS Med* 2012;9(11):e1001338
2. Shimada S, Fukai M, Wakayama K, et al: Hydrogen sulfide augments survival signals in warm ischemia and reperfusion of the mouse liver. *Surg Today* 2015;45(7):892-903
3. Pettersen JC, Cohen SD: Antagonism of cyanide poisoning by chlorpromazine and sodium thiosulfate. *Toxicol Appl Pharmacol* 1985;81(2):265-73.

Abbildung 1



A Repräsentative Bilder der Intravitalmikroskopie. Oben: WT; unten: Cse<sup>-/-</sup>. Links: sham operiert (n=3 pro Gruppe); Zentrum: IR (n=6 pro Gruppe); rechts: IR mit STS Behandlung (n=6 pro Gruppe). Maßstab 30 µm.

B Quantifizierung der Granularität des Rhodamine 123 Fluoreszenz-Signals nach 1 h Ischämie und 1 h Reperfusion. Daten sind als Mittelwert ± SEM dargestellt. \*\*P<0,01; \*\*\*\*P<0,0001.

### Der Aquaporin-5-Gen-Promotor A(-1364)C-Polymorphismus beeinflusst epigenetische Regulationsmechanismen und die Genexpression in Immunzellen in der Sepsis

M. Unterberg · T. Spellenberg · K. Rump · L. Bergmann · Z. Bazzi · M. Adamzik

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

#### Korrespondenz:

Matthias.Unterberg@kk-bochum.de

#### Fragestellung

Die große interindividuelle Variabilität des Krankheitsverlaufs der schweren Sepsis (Definition nach ACCP/SCCM) lässt sich durch bekannte Risikofaktoren nicht hinreichend erklären. Vielmehr scheinen auch genetische Faktoren Krankheitsverlauf und Letalität zu beeinflussen. Das C-Allel des Aquaporin 5 (AQP5) A(-1364)C Promotorpolymorphismus ist mit geringerer AQP5-Expression [1], geringerer Migration neutrophiler Granulozyten [1] und einer geringeren 30-Tage Letalität bei schwerer Sepsis assoziiert [2]. Unklar sind allerdings die regulierenden molekularen Mechanismen der AQP5-Transkription in der Sepsis. Da ein möglicher Mechanismus in der Promotormethylierung liegen könnte, testeten wir folgende Hypothese: Das Methylierungsmuster des AQP5-Promotors unterscheidet sich abhängig vom A(-1364)C-Promotorpolymorphismus.

#### Methode

Nach Votum durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät zu Bochum (Reg.-Nr. 15-5457) wurden 7 Patienten ((Alter: 68,1 Jahre  $\pm$  16,4 Jahre (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung), 5 Männer, 2 Frauen)) mit der Diagnose einer schweren Sepsis sowie 9 gesunde Kontrollprobanden ((Alter: 29,5 Jahre  $\pm$  9,4 Jahre (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung), 2 Männer, 7 Frauen)) eingeschlossen. 50ml Vollblut (EDTA) wurde den Patienten nach Aufklärung und Einwilligung während Erfüllung der Kriterien einer schweren Sepsis entnommen. Aus dem Vollblut wurden neutrophile Granulozyten mittels MACS sowie Lympho-

zyten und Monozyten nach Dichtegradientenzentrifugation mit anschließender magnetischer Aufreinigung separiert, DNA extrahiert und bezüglich des AQP5-A(-1364)C-Polymorphismus genotypisiert [2]. Mittels quantitativer PCR wurde nach Schwefelbehandlung anhand einer Standardkurve der Anteil methylierter Moleküle einer definierten Promotorregion gemessen [3]. Weiter wurden in vitro mononukleäre Zellen (PBMC) mit LPS stimuliert, RNA isoliert und es wurde mittels reverser Transkription und quantitativer Real-Time-PCR die DNMT-1-Expression quantifiziert.

#### Ergebnisse

Das C-Allel des A(-1364)C-Promotorpolymorphismus ist in der Sepsis in neutrophilen Granulozyten und Monozyten mit einer signifikant höheren Promotormethylierung verglichen zum A-Allel assoziiert (Neutrophile Granulozyten  $p=0,027$ , Monozyten  $p=0,0044$ ). In der mittels LPS induzierten Inflammation sinkt die Expression der Methyltransferase DNMT-1 nach 2 und 4 Stunden signifikant ab ( $p=0,037$  und  $p=0,28$ ).

#### Interpretation

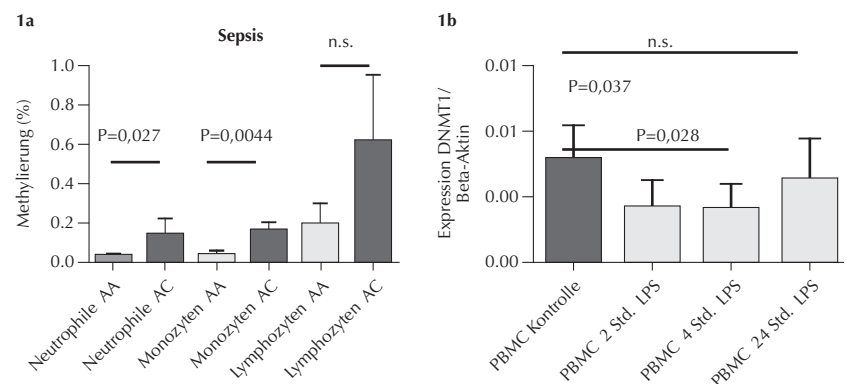
Das C-Allel im Aquaporin5(-1364)-A/C-Polymorphismus ist mit geringerer Genexpression in der Sepsis assoziiert [1]. Die geringere Genexpression ist mit besserem Überleben

septischer Erkrankungen assoziiert [2]. Wie wir zeigen konnten, ist das C-Allel mit einer höheren Methylierungsdichte im Genpromotor in der Sepsis assoziiert. Dies kann ein entscheidender Mechanismus in der Wirkung des Aquaporin5(-1364)-A/C-Polymorphismus sein. Eine Beeinflussung der Aktivität oder Bindung von DNA-Methyltransferasen könnte dies bedingen und ist, so wie die Frage ob hier genotypenabhängige Unterschiede bestehen, Gegenstand aktueller Untersuchungen.

#### 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 und Intensivmed* 2014;55:338-86
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. Agrawal S, Unterberg M, Koschmieder S, zur Stadt U, Brunnberg U, Verbeek W, Büchner T, Berdel WE, Serve H, Müller-Tidow C: DNA methylation of tumor suppressor genes in clinical remission predicts the relapse risk in acute myeloid leukemia. *Cancer Res* 2007;67(3):1370-7.

Abbildung 1



**1a:** Sepsispatienten (n=7) Anteil methylierter Moleküle im Promotor in Abhängigkeit vom Genotyp; A-Allel n=4; C-Allel n=3; Monozyten  $p=0,0044$ ; Lymphozyten  $p=0,11$ ; Neutrophile  $p=0,027$  (ungepaarter t-Test).  
**1b:** Expression der Methyltransferase DNMT-1 in mononukleären Zellen (PBMC) nach Stimulation mit 10ng/ml LPS für 2-24 Stunden; 2Std.  $p=0,037$ ; 4Std.  $p=0,028$ ; 24Std.  $p=n.s.$  (ungepaarter t-Test).

### Perioperativ gewonnenes Serum kardiochirurgischer Patienten beeinflusst die kardiomyozytäre Kontraktilität in vitro

M. Velten<sup>1</sup> · M. Falk<sup>1</sup> · C. Klein<sup>1</sup> · G. D. Duerr<sup>2</sup> · T. Hilbert<sup>1</sup> · S. Frede<sup>1</sup> · A. Hoefft<sup>1</sup> · G. Baumgarten<sup>3</sup> · R. Meyer<sup>4</sup>

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

2 Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie, Universitätsklinikum Bonn

3 Johanniter Kliniken Bonn

4 Institut für Physiologie, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

**Korrespondenz:** Markus.Velten@ukbonn.de

#### Fragestellung

Kardiochirurgische Bypass-Operationen erfolgen regelhaft unter Verwendung extrakorporaler Zirkulation mittels Herz-Lungen-Maschine. Es ist bekannt, dass die im Rahmen dieser On-Pump-Eingriffe freigesetzten Mediatoren die Herz-Kreislauffunktion soweit beeinträchtigen können [1], dass die Patienten hierdurch einer akuten medikamentösen Katecholamintherapie zur Aufrechterhaltung der Herz-Kreislauffunktion bedürfen. Die hierfür zugrundeliegenden Mechanismen sind jedoch unklar [2]. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob im Rahmen von On-Pump-Bypass-Operationen Veränderungen im Patientenserum auftreten, welche die kardiomyozytäre Kontraktilität vermindern und somit die Herz-Kreislauffunktion beeinträchtigen.

#### Methodik

Zur Untersuchung dieser Hypothese wurden nach Ethikvotum (Ethik Kommission Bonn 011/13) und Einwilligung der Patienten präoperativ sowie 1, 6 und 24 Stunden nach Beendigung der Aortenklappen (AK) klinische

Herz-Kreislaufparameter erfasst, Blut entnommen, Proteinkonzentrationen potentiell kardiodepressiver Mediatoren analysiert und die Auswirkungen des Serums auf die myokardiale Kontraktilität in vitro untersucht. Zur Erfassung der kardiomyozytären Auswirkungen der im Rahmen der EKZ gewonnenen Patientensera wurden primäre murine Kardiomyozyten isoliert und in 2,5%igem Patientenserum kultiviert. Nach 2 h Inkubation wurden die Sarkomerverkürzung (SV) sowie die maximalen Verkürzungs- und Relaxationsgeschwindigkeiten nach bipolarer elektrischer Stimulation mit Frequenzen zwischen 0,5 und 10 Hz bei 36 °C in einer Perfusionskammer auf einem inversen Mikroskop gemessen. Die Messungen und Analysen erfolgten mit einer Myocam und dem IonWizard Core and Analysis System (IonOptix, Westwood, MA). Statistik: One-way-ANOVA mit Bonferroni-post-hoc-Test, MW ± SEM, p < 0,05.

#### Ergebnisse

In Vorversuchen kultivierten wir primäre murine Kardiomyozyten mit unterschiedlichen Serumkonzentrationen gesunder Probanden und ermittelten die maximale Konzentration humanen Serums, welche die kardiomyozytäre Verkürzung nicht messbar beeinflusste. Eine 2-stündige Inkubation primärer muriner Kardiomyozyten in 2,5% humanem Serum gesunder Probanden (PS) verursachte keine Beeinflussung der kardiomyozytären Verkürzung im Vergleich zu in Tyrode inkubierten Zellen (0,09 ± 0,01 PS vs. 0,10 ± 0,01 µm Tyrode, 4 Hz, n = 20). Die Dosierung von Katecholaminen war 1 h nach Beendigung der AK signifikant erhöht im Vergleich zu präoperativen Werten. Inkubation primärer muriner Kardiomyozyten in 2,5% Patientenserum gewonnen 1 h nach Beendigung der AK führte bei Stimulationsfrequenzen von 4-8 Hz zu einer signifikanten Reduktion der Sarkomerverkürzung (0,11 ± 0,02 Prä-Op vs. 0,06 ± 0,01 µm 1 h, n = 14, 4 Hz, p < 0,05) sowie maximalen

Verkürzungsgeschwindigkeit (-4,44 ± 0,56 Prä-Op vs. 2,64 ± 0,44 µm/s 1 h, n = 14, 4 Hz, p < 0,05,) und Relaxationsgeschwindigkeit (3,47 ± 0,51 Prä-Op vs. 1,93 ± 0,45 1 h, µm/s, n = 14, 4 Hz, p < 0,05) im Vergleich zu präoperativ gewonnenem Patientenserum. Inkubation primärer muriner Kardiomyozyten mit 6 und 24 h nach Beendigung der AK gewonnenem Patientenserum verursachte keine messbare Veränderung der Sarkomerverkürzung im Vergleich zu präoperativ gewonnenem Serum. Die im Serum gelösten „receptor for advanced glycation end products“ (sRAGE) und „High-Mobility-Group-Protein B1“ (HMGB1) Konzentrationen waren 1 h nach Beendigung der AK signifikant erhöht im Vergleich zu präoperativ gemessenen Werten (sRAGE 533 ± 110 prä-Op vs. 1565 ± 214 1 h vs. 733 ± 355 6 h vs. 437 ± 39 24 h, ng/ml, p < 0,0001 (HMGB1 2,8 ± 0,5 prä-Op vs. 5,8 ± 0,9 1 h vs. 2,2 ± 0,6 6 h vs. 4,1 ± 1,1 24 h, ng/ml, p < 0,05).

#### Interpretation

Unsere Ergebnisse belegen, dass On-Pump-Bypass-Operationen zu einer Veränderung der Serumkonzentrationen von sRAGE und HMGB1 führen. Weiterhin verursacht in diesem Rahmen gewonnenes Patientenserum eine Einschränkung der kardiomyozytären Verkürzung in vitro. In nachfolgenden Untersuchungen muss die Bedeutung von sRAGE und HMGB1 für dieses Phänomen weiter untersucht werden.

#### Literatur

1. Suleiman MS, Zacharowski K, Angelini GD: Inflammatory response and cardioprotection during open-heart surgery: the importance of anaesthetics. *Br J Pharmacol* 2008;153:21-33
2. Tzeng HP, Fan J, Vallejo JG, Dong JW, Chen X, Houser SR, et al: Negative inotropic effects of high-mobility group box 1 protein in isolated contracting cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008;294:1490-96.

### Patientenkontrollierte Analgesie (PCA) mit Remifentanyl versus alternative parenterale Methoden zur geburtshilflichen Analgesie: Ein systematisches Cochrane-Review mit Metaanalyse\*

S. Weibel<sup>1</sup> · Y. Jelting<sup>1</sup> · A. Afshari<sup>2</sup> · N. L. Pace<sup>3</sup> · L. H.J. Eberhart<sup>4</sup> · N. Roewer<sup>1</sup> · P. Kranke<sup>1</sup>

- 1 Universitätsklinikum Würzburg  
2 Rigshospitalet, Kopenhagen, Dänemark  
3 University of Utah, USA  
4 Universitätsklinikum Marburg

**Korrespondenz:** Weibel\_S@ukw.de

#### Fragestellung

Zur Schmerzlinderung unter der Geburt stehen verschiedene analgetische Strategien wie neuraxiale Analgesieverfahren (z.B. Epiduralanalgesie), die inhalative Analgesie (z.B. Lachgas) sowie die parenterale Opioidgabe zur Verfügung. Für die letztere Option kommt Remifentanyl aufgrund eines schnellen Wirkungseintritts bei kurzer Wirkdauer (gute Steuerbarkeit) eine besondere Bedeutung zu [1]. Allerdings ist derzeit die Evidenz für den Einsatz von Remifentanyl als Analgetikum in der Geburtshilfe limitiert. Daher bestand das Ziel dieses Cochrane Reviews darin, die Evidenz zur Effektivität und Sicherheit einer patientenkontrollierten Analgesie mit Remifentanyl (R-PCA) während der Wehen für Mutter und Kind – basierend auf allen gegenwärtig verfügbaren randomisierten kontrollierten Studien (RCTs) – zu beurteilen.

#### Methodik

Es erfolgte eine systematische Recherche nach RCTs im Cochrane Pregnancy and Childbirth Group's Register, Studienregistern (ClinicalTrials.gov, ICTRP) und Kongressbeiträgen bis Dezember 2015. Einschlusskriterien waren Vergleiche von R-PCA mit (A) anderen Opioiden (intravenös (IV)/intramuskulär (IM)), (B) anderen Opioiden (PCA), (C) der Epiduralanalgesie, (D) Remifentanyl (kontinuierlich IV), (E) R-PCA (anderen Regimes), (F) einer inhalativen Analgesie und (G) Placebo bei Schwangeren zur geburtshilflichen Analgesie bei schmerzhafter Wehentätigkeit mit geplanter vaginaler Entbindung. Das Risiko für einen Bias (systematischer Fehler) wurde mittels Cochrane Risk of Bias Assessment Tool bewertet. Es wurde eine Random-effects-

Metaanalyse durchgeführt. Um in dieser Metaanalyse das Risiko für zufällige Fehler zu reduzieren, wurde eine sequentielle Studienanalyse (Trial Sequential Analysis) durchgeführt. Die Qualität der Evidenz wurde mittels GRADE-Ansatz (Grades of Recommendation, Assessment, Development, and Evaluation), basierend auf den Kriterien Studienqualität (Risiko für einen Bias), Indirekte Evidenz, Heterogenität, fehlende Präzision und Publikationsbias, bewertet. Untersuchungsmethodik und -analytik wurden prospektiv definiert und publiziert [2].

#### Ergebnis

Zwanzig Studien mit 3.569 schwangeren Frauen wurden eingeschlossen. R-PCA wurde mit Epiduralanalgesie (n=10 Studien), anderem Opioid (IV/IM) (n=4), anderem Opioid (PCA) (n=3), Remifentanyl (kontinuierlich IV) (n=2) und mit anderem PCA-Regime (n=1) verglichen. Basierend auf den Effektschätzern der Metaanalysen zur Effektivität und Sicherheit ist die R-PCA der Epiduralanalgesie unterlegen, jedoch alternativen Opioiden (IV/IM/PCA) überlegen (Tab. 1). Allerdings ergab die Bewertung der Qualität der Evidenz nach GRADE für die patientenrelevanten Endpunkte „Patientenzufriedenheit“, „Schmerz“, „Rescue-Analgesie“, „Kaiserschnitttrate“, „maternale Apnoe“, „maternale Atemdepression“ und „Apgar-Score <7 nach 5 Minuten“ überwiegend nur eine sehr niedrige bis niedrige

Qualität der Evidenz (Tab. 1). Limitierungen ergaben sich durch schlechte Studienqualität (hohes Risiko für Bias), hohe Heterogenität und fehlende Präzision.

#### Interpretation

Die verfügbaren Daten legen nahe, dass die R-PCA im Hinblick auf Wirksamkeit und Sicherheit der Epiduralanalgesie unterlegen, den anderen Opioiden gegenüber aber überlegen ist. Die Datenlage dieses systematischen Reviews zeigt aber auch, dass die Evidenz gegenwärtig begrenzt ist, um für die Praxis solide Aussagen zu den einzelnen Vor- und Nachteilen der R-PCA in der geburtshilflichen Analgesie zu treffen.

\* Diese Zusammenfassung basiert auf einem Entwurf eines Cochrane Reviews (Status: Post-Peer-Review). Nach Abschluss und Genehmigung wird erwartet, dass die endgültige Version in der Cochrane Database of Systematic Reviews (www.cochranelibrary.com) veröffentlicht wird.

#### Literatur

- Hill D: Remifentanyl in obstetrics. *Curr Opin Anaesthesiol* 2008;21:270-74
- Jokinen J, Weibel S, Afshari A, Artmann A, Eberhart LHJ, Pace NL, et al: Patient-controlled analgesia with remifentanyl versus alternative parenteral methods for pain management in labour (Protocol). *CDSR* 2015, Issue 12. DOI:10.1002/14651858.

**Tabelle 1**

#### GRADE – Qualität der Evidenz für patientenrelevante Endpunkte.

4-Kategorien System der Evidenzqualität nach GRADE: sehr niedrig, niedrig, moderat, hoch. Ergebnisse der Metaanalysen (Farbkodierung): (grün) favorisiert R-PCA, (rot) favorisiert Kontrollintervention, (gelb) kein Unterschied. \* R-PCA-Regime: steigende Bolusdosis versus steigende Infusionsdosis; m. = maternal.

Endpunkt	Remifentanyl (PCA) versus				
	Epiduralanalgesie	Opioid (IV/IM)	Opioid (PCA)	Remifentanyl (IV)	R-PCA (Regime*)
Zufriedenheit	sehr niedrig	sehr niedrig	sehr niedrig	-	niedrig
Schmerz (1 h)	niedrig	sehr niedrig	sehr niedrig	sehr niedrig	-
Rescue-Analgesie	moderat	moderat	niedrig	sehr niedrig	niedrig
Kaiserschnitttrate	moderat	niedrig	sehr niedrig	-	niedrig
m. Apnoe	sehr niedrig	-	-	-	-
m. Atemdepression	niedrig	sehr niedrig	-	niedrig	-
Apgar <7,5 min	niedrig	sehr niedrig	sehr niedrig	-	niedrig