

Aus der Klinik für Anästhesiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Benedikt Pannen

Pharmakologische Präkonditionierung und ihr Einfluss auf die Mikrozirkulation

**Der Effekt von
Xenon, Distickstoffmonoxid (N₂O), Morphin und Isofluran auf die
TNF α -induzierte Expression von
ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin in
humanen Nabelschnurendothelzellen (HUVEC)**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Jennis Kandler

2012

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez. Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf
Dekan

Referent: Prof. Dr. med. Benedikt Preckel

Korreferent: Prof. Dr. med. Thomas Hohlfeld

**Für
Rana
Noyan
Eva
Rainer
Svenja
Jonas
Ninja
Jannik**

Publikationen

Während der Erstellung dieser Dissertation entstanden folgende Arbeiten:

Artikel:

Weber NC, Kandler J, Schlack W, Grüber Y, Fräßdorf J, Preckel B: Intermittent pharmacological pretreatment by xenon, isoflurane, nitrous oxide and the opioid morphine prevents tumor necrosis factor α -induced adhesion molecule expression in human umbilical vein endothelial cells. Anesthesiology 2008; 108: 1-9.

Poster/Kongressbeiträge:

Jennis Kandler, Nina C. Weber, Jan Fräßdorf, Benedikt Preckel, Wolfgang Schlack: Isofluran und N₂O hemmen die Tumor Nekrose Faktor α (TNF α) induzierte ICAM-1 Expression in humanen Nabelschnurendothelzellen (HUVEC). DAC 2006, Leipzig.

Ragnar Huhn, Nina C. Weber, Jennis Kandler, Jan Fräßdorf, Wolfgang Schlack, Benedikt Preckel: Xenon verhindert eine TNF α -induzierte ICAM-1 Expression in humanen Nabelschnurendothelzellen. DAC 2006, Leipzig.

Nina C. Weber, Jennis Kandler, Jan Fräßdorf, Wolfgang Schlack, Benedikt Preckel: Xenon prevents TNF- α induced ICAM-1 expression involving NF- κ B in HUVEC. Anesthesiology 2006; 105: A547. ASA annual meeting 2006, Chicago.

I. Zusammenfassung

Pharmakologische Präkonditionierung und ihr Einfluss auf die Mikrozirkulation - Der Effekt von Xenon, Distickstoffmonoxid (N₂O), Morphin und Isofluran auf die TNF α -induzierte Expression von ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin in humanen Nabelschnurendothelzellen (HUVEC)

Vorgelegt von: Jennis Kandler

Ein Ansatz zur Reduktion des myokardialen Ischämie-Reperfusionsschadens (I/R) ist die pharmakologische bzw. Anästhetika-induzierte Präkonditionierung (APC). Im Rahmen des I/R wird die endotheliale Integrität gestört und es kommt zur Leukozytenaggregation in der Mikrozirkulation mit anschließender transvaskulärer Diapedese und konsekutivem Myokardschaden. Vermittelt wird dieser Vorgang der Leukozytenrekrutierung insbesondere durch die Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie TNF α . TNF α induziert über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B die Expression zellulärer Adhäsionsmoleküle (CAM) wie ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin. Hierdurch steigen die adhäsiven Eigenschaften des Endothels, was die Transmigration der Leukozyten ermöglicht. Es konnte bereits durch volatile Anästhetika und Opiate eine Reduktion der Leukozytenrekrutierung und somit ein protektiver Einfluss auf diesen Schritt des I/R gezeigt werden. Aufgrund dieser Kenntnis, kombiniert mit den Erfahrungen aus der APC des Myokards, war es Ziel der vorliegenden Arbeit den Effekt von Xenon, Distickstoffmonoxid (N₂O, „Lachgas“), Morphin und Isofluran auf die endotheliale Expression der CAM in einem an die myokardiale Präkonditionierung angelehnten Versuchsaufbau in einem *in vitro* Zellkulturmodell an HUVEC zu untersuchen. Erhoben wurden hierbei mit der Untersuchung der Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin Surrogatparameter der Präkonditionierung. Deren Expressionsverhalten wurde als Ausdruck einer proinflammatorischen endothelialen Aktivierung gewertet, wie sie im Rahmen des I/R zu finden ist. Es wurden HUVEC standardisiert kultiviert und in folgende Gruppen eingeteilt: Kontrolle (unbehandelte Zellen), TNF α (Zellen mit alleiniger TNF α -Stimulation), Anästhetikum (Zellen mit alleiniger Behandlung mit Xenon, N₂O, Morphin, Isofluran), Anästhetikum+TNF α (Zellen mit Behandlung mit Xenon, N₂O, Morphin, Isofluran und anschließender TNF α -Stimulation). Um die Wirkung der Pharmaka auf die CAM-Expression nachvollziehen zu können, wurden die genannten CAM sowohl auf transkriptioneller Ebene (Infrarot elektrophoretischer Mobilitäts-Shift-Assay, Reverse-Transkription-Polymerase-Kettenreaktion), als auch auf Ebene der Proteinexpression (Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung) untersucht. Die Ergebnisse wurden statistisch ausgewertet und als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt. Die statistische Auswertung sollte zeigen, ob zwischen den Mittelwerten der TNF α -Gruppe und den Mittelwerten der Kontrollgruppe bzw. zwischen den Mittelwerten der Anästhetikum+TNF α -Gruppe und den Mittelwerten der TNF α -Gruppe signifikante Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ bestanden. Hierfür wurden Gruppenvergleiche mittels Einweg Varianzanalyse (ANOVA) gefolgt vom Bonferroni Post Hoc Test für paarweise Vergleiche durchgeführt. Ergebnisse mit $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet. Für alle hier verwendeten Substanzen konnte eine signifikante Reduktion der NF κ B-Aktivität nachgewiesen werden. Ebenso reduzierten alle Pharmaka signifikant die mRNA- und Proteinexpression von ICAM-1. Dies galt, mit Ausnahme für Morphin, auch für die Expression von VCAM-1. E-Selektin blieb nahezu unbeeinflusst. Weder die TNF α -induzierte mRNA-, noch die Proteinexpression auf der Zelloberfläche konnte signifikant beeinflusst werden. Unsere Arbeit zeigt damit eine protektive Wirkung der genannten Substanzen vor dem TNF α -vermittelten Zellschaden. Die vorliegenden Daten tragen zum Verständnis der zum Teil endothelial vermittelten und vielschichtig regulierten pharmakologischen Präkonditionierung bei.

Düsseldorf, November 2012

II. Abkürzungsverzeichnis

A	
APC	Anästhetika induzierte Präkonditionierung
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
AVI	Average light intensity
B	
BNP	Brain natriuretic peptide
BSA	Bovines Serumalbumin
C	
CABG	Coronary artery bypass graft
CAM	Cellular adhesion molecule
CD	Cluster of differentiation
CI	Cardiac index
CR	Consensus repeat
CRD	Carbohydrate recognition domain
D	
Da	Dalton
DAG	Diacylglycerol
DD	Death domain
DEPC	Diethyldicarbonat
(ds/c)DNA	(Doppelstrang/copy)Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E	
ECGM	Endothelial cell growth medium
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal growth factor
ESL-1	E-Selektin Ligand 1
F	
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FBS	Fetal bovine serum
FITC	Fluorescein-5-Isothiocyanat
FMLP	N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin
FSC	Forward scatter
G	
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GlyCAM-1	Glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
H	
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HSP	Hitzeschockprotein
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells
I	
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
IFN γ	Interferon gamma
IgG	Immunglobulin G
I κ B	NF κ B-Inhibitor
IKK	I κ B-Kinase-Komplex
IL	Interleukin
IP $_3$	Inositoltrisphosphat
I/R	Ischämie-Reperfusionsschaden
IRDye	Infrared dye
IR-EMSA	Infrarot elektrophoretischer Mobilitäts-Shift-Assay

K

(m)K _{ATP}	(mitochondrialer) ATP-abhängiger Kaliumkanal
(m)K _{Ca}	(mitochondrialer) Calcium-abhängiger Kaliumkanal
kDa	Kilodalton

L

LFA	Lymphocyte function antigen
LPS	Lipopolysaccharid

M

MAC	Minimale alveoläre Konzentration
Mac-1 (=CR3)	Macrophage-1 antigen
MACCE	Major adverse cardiovascular and cerebrovascular events
MadCAM-1	Mucosal addressin cell adhesion molecule-1
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MCP-1	Monocytes chemoattractant protein-1
MODS	Multi organ dysfunction syndrome
3-MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure

N

NEP	Neutrophilen Endopeptidase
NF κ B	Nuclear factor kappa B
NO	Stickstoffmonoxid
(e/i)NOS	(endotheliale/induzierbare) Stickstoffmonoxid Synthase
N ₂ O	Distickstoffmonoxid („Lachgas“)
NP40	Nonidet P40 (Octoxinol 9)
NT-proBNP	N-terminales pro brain natriuretic peptide

O

OD	Optische Dichte
----	-----------------

P

PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PECAM	Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1
PFA	Paraformaldehyd
PIP ₂	Phosphatidylinositolbisphosphat
PI ₃ K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PS	Phosphatidylserin
PSGL-1	P-Selektin-Glykoprotein-Ligand-1
PTCA	Perkutane transluminale Koronarangioplastie
p38 MAPK	p38 mitogen-aktivierte Proteinkinase

R

RIP	Receptor interacting protein
(ss/ds, r/m)RNA	(Einzelstrang/Doppelstrang, ribosomale/messenger) Ribonukleinsäure
ROS	Reactive oxygen species
RPM	Rounds per minute
RT-PCR	Reverse-Transkription-Polymerase-Kettenreaktion

S

SIRS	Systemic inflammatory response syndrome
SD	Standardabweichung
SSC	Sideward scatter
SWOP	Second window of protection

T

TAE	Tris-Acetat-EDTA
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TIVA	Total intravenöse Anästhesie

TNF α	Tumor Nekrose Faktor alpha
TNFR	Tumor Nekrose Faktor alpha-Rezeptor
TRADD	TNFR-associated death domain
TRAF	TNFR-associated factor

V

VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
VLA-4	Very late antigen
vWF	Von-Willebrand-Faktor

III. Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	01
1.1	Hintergrund und Ziel der Arbeit	01
1.2	Ischämie-Reperfusionsschaden	02
1.2.1	Bedeutung	02
1.2.2	Pathophysiologie	02
1.2.3	Tumor Nekrose Faktor α (TNF α)	05
1.2.3.1	Grundlagen	05
1.2.3.2	Effekte von TNF α auf Endothelzellen	06
1.2.4	Zelluläre Adhäsionsmoleküle	08
1.2.4.1	Grundlagen	08
1.2.4.2	Klassifikation	08
1.2.4.2.1	Immunoglobulin-Superfamilie	08
1.2.4.2.2	Selektine	10
1.2.5	Klinische Manifestationen	12
1.3	Kardioprotektion	13
1.3.1	Ischämische Präkonditionierung	13
1.3.2	Pharmakologische Präkonditionierung	15
1.3.2.1	Hintergrund	15
1.3.2.2	Klinische Studien	15
1.3.2.3	Molekularbiologie – Kardiomyozyten versus Endothelzellen	16
1.4	Fragestellung	18
2	Material und Methoden	19
2.1	Material	19
2.1.1	Standardmaterialien	19
2.1.2	Antikörper	19
2.2	Methoden	20
2.2.1	Isolierung und Kultivierung humaner Nabelschnurendothelzellen	20
2.2.2	von-Willebrand-Faktor (vWF)-Färbung	23
2.2.3	Experimentelles Protokoll	24
2.2.4	Molekularbiologie	27
2.2.4.1	Infrarot elektrophoretischer Mobilitäts-Shift-Assay (IR-EMSA)	27
2.2.4.2	Reverse-Transkription-Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR)	32
2.2.4.3	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS)	41
2.3	Statistische Auswertung	44
3	Ergebnisse	45
3.1	Einfluss von Xenon, Distickstoffmonoxid, Morphin und Isofluran auf die TNF α -induzierte Transkriptionsaktivität von NF κ B	45
3.2	Einfluss von Xenon, Distickstoffmonoxid, Morphin und Isofluran auf die TNF α -induzierte mRNA-Expression von ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin	47
3.3	Einfluss von Xenon, Distickstoffmonoxid, Morphin und Isofluran auf die TNF α -induzierte Proteinexpression von ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin	51
4	Diskussion	56
4.1	Pharmakologische Präkonditionierung – Einfluss auf die Mikrozirkulation	56
4.1.1	Stellenwert leukozytärer Adhäsionsmoleküle	57
4.1.2	Stellenwert endothelialer Adhäsionsmoleküle	59
4.1.2.1	ICAM-1	59
4.1.2.2	VCAM-1	61

4.1.2.3	E-Selektin	61
4.1.2.4	Limitierung einer mikrovaskulären Präkonditionierung	62
4.1.2.5	Rolle von NF κ B in der Präkonditionierung	63
4.1.2.6	Adhäsionsmolekülunabhängige Effekte	65
4.2	Methodenkritik	66
5	Literaturverzeichnis	67

Danksagung

Eidesstattliche Versicherung

1 Einleitung

1.1 Hintergrund und Ziel der Arbeit

Kardiovaskuläre Ereignisse wie der Myokardinfarkt zählen in der westlichen Welt weiterhin zu den Haupttodesursachen¹. Auch peri- und postoperativ sind sie ein häufiger Grund für Morbidität und Letalität^{2,3}. Ein Hauptziel bei Patienten, die sich einem operativen Eingriff unterziehen müssen, ist es daher, kardiovaskuläre Komplikationen zu vermeiden. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich in diesem Zusammenhang mit der sogenannten pharmakologischen bzw. Anästhetika-induzierten Präkonditionierung. Hierbei handelt es sich um eine Methode, mit der durch ein bestimmtes Applikationsschema verschiedener in der Anästhesiologie verwendeter Pharmaka ein kardioprotektiver Effekt erzielt werden kann. Es handelt sich also um eine Art „schützende Vorbehandlung“ des durch Ischämie, aber auch durch die sich anschließende Reperfusion (=Ischämie-Reperfusionsschaden)⁶ gefährdeten Myokards. Die pharmakologische Präkonditionierung des Myokards wird seit der Erstbeschreibung 1997^{4,72} intensiv untersucht. Als wichtige Zielstrukturen der Anästhetika konnten hierbei einerseits die Kardiomyozyten^{103,104} selbst, aber auch die Mikrozirkulation und dabei insbesondere die Endothelzellen^{111,112} identifiziert werden. Im Rahmen des Ischämie-Reperfusionsschadens wird die endotheliale Integrität gestört und es kommt zur Leukozytenaggregation in der Mikrozirkulation. Im nächsten Schritt können die Leukozyten die Gefäßwand durchwandern (=Diapedese) und verursachen durch Freisetzung zytotoxischer Substanzen eine Parenchymschädigung. Dieser Vorgang wird über zwei wichtige Mechanismen vermittelt. Einerseits kommt es zur Änderung der zytoskelettalen Struktur der Endothelzellen, die somit „durchlässiger“ werden, andererseits bewirken proinflammatorische Zytokine, wie insbesondere Tumor Nekrose Faktor α (TNF α), eine Hochregulation der Expression zellulärer Adhäsionsmoleküle (*cell adhesion molecules*, CAM) wie interzelluläres Adhäsionsmolekül 1 (*intercellular adhesion molecule-1*, ICAM-1), vaskuläres Adhäsionsmolekül 1 (*vascular cell adhesion molecule-1*, VCAM-1) und E-Selektin. Durch die Überexpression der CAM steigen die adhäsiven Eigenschaften des sonst nahezu nicht-adhäsiven Endothels, was die Adhäsion und anschließende Diapedese der Leukozyten erst ermöglicht. Es ist bekannt, dass durch diverse Anästhetika und Opiate dieser Vorgang der Leukozytenrekrutierung vermindert und somit ein protektiver Einfluss auf den Ischämie-Reperfusionsschaden generiert werden kann^{107-112,144}.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Effekt von Xenon, Distickstoffmonoxid (N₂O, „Lachgas“), Morphin und Isofluran auf die endotheliale, TNF α -induzierte Expression der CAM in einem an die myokardiale Präkonditionierung angelehnten Versuchsaufbau in einem *in vitro* Zellkulturmodell an humanen Nabelschnurendothelzellen (*human umbilical vein endothelial cells*, HUVEC) zu untersuchen. Mit der Untersuchung der Expression der

Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin wurden sowohl auf Ebene der Transkription (IR-EMSA, RT-PCR) als auch auf Ebene der Proteinexpression (FACS) Surrogatparameter der Präkonditionierung erhoben. Deren Expressionsverhalten wurde als Ausdruck einer proinflammatorischen endothelialen Aktivierung gewertet, wie sie im Rahmen des Ischämie-Reperfusionsschadens zu finden ist.

1.2 Ischämie-Reperfusionsschaden

1.2.1 Bedeutung

Der Ischämie-Reperfusionsschaden ist definiert als ein metabolischer, struktureller und funktioneller Gewebeschaden, hervorgerufen durch die Ischämie selbst oder durch die Reperfusion zuvor nicht-letal ischämischen Gewebes⁶. Die Situationen, in denen der Anästhesist mit Organischämien gefolgt von Reperusionsphasen und deren Folgen konfrontiert werden kann, sind vielfältig und betreffen neben rein prozeduralen Risiken kardiochirurgischer (koronarerterielle Bypass-Operationen) und nicht-kardiochirurgischer Eingriffe (Organ-Transplantationen, gefäßchirurgische Eingriffe) auch peri- und postoperative sowie posttraumatische Komplikationen (Myokardinfarkt, Blutungen, hämorrhagischer Schock). Hierbei treten neben den direkten ischämiebedingten Schädigungen nach der für das Überleben des betroffenen Gewebes essentiellen Wiederherstellung der Perfusion weitere indirekte Schäden auf, die somit den initialen Schaden verstärken. Klinisch kann es je nach Lokalisation des Ischämie-Reperfusionsschadens neben lokalen inflammatorischen Reaktionen (*no reflow*-Phänomen, myokardiales *stunning*, Reperusions-Arrhythmien) auch zu systemischen Reaktionen kommen, so dass entferntere, primär nicht ischämische Organe in die Schädigung mit einbezogen werden können. Je nach Ausprägung kann dies bis hin zum „systemischen inflammatorischen Response-Syndrom“ (*systemic inflammatory response syndrome*, SIRS) oder zum Multiorganversagen (*multiple organ dysfunction syndrome*, MODS) führen⁶.

1.2.2 Pathophysiologie

Nach einer prolongierten Ischämie kommt es neben den direkten pathologischen Veränderungen der Parenchymzellen zu inflammatorischen Veränderungen in der Mikrozirkulation (mikrovaskuläre Dysfunktion)⁶. Diese mikrovaskuläre Dysfunktion ist durch eine verminderte Dilatation der Arteriolen und eine Zunahme der leukozytären Adhärenz an den Gefäßwänden des Kapillarnetzes gekennzeichnet. Beides gipfelt in einer Verstärkung der Organ-Minderperfusion und somit in einer Zunahme des Parenchymschadens.

Das Endothel spielt als innerste Gefäßschicht eine entscheidende Rolle in der Entstehung und Unterhaltung der mikrovaskulären Dysfunktion. Einerseits kommt es ischämiebedingt zur intrazellulären Verarmung an energiereichen Phosphaten (insbesondere Adenosin-Triphosphat, ATP), wodurch die Funktionalität der ATP-abhängigen Ionenpumpen herabgesetzt ist. Folge dessen ist ein Anstieg des intrazellulären Kalziums und Natriums mit konsekutivem Zellödem. Andererseits wird ATP vermehrt zu Hypoxanthin abgebaut. Dieser Prozess begünstigt in der Phase der Reperfusion die Bildung von Sauerstoffradikalen (*reactive oxygen species*, ROS)⁸.

Die Gewebhypoxie führt zudem zu einer Änderung der endothelialen Genexpression, wobei als Folge proinflammatorische Proteine vermehrt und „protektive“ Proteine vermindert synthetisiert werden. Endogene, kardiomyozytäre Zellbestandteile, wie zum Beispiel Cardiolipin, können - ischämiebedingt freigesetzt - zur Komplementaktivierung führen⁵. Dadurch steigt der Gehalt chemotaktischer Komplementkomponenten (C5a, C3a, iC3b, C5b-9) und der Gehalt proinflammatorischer Zytokine wie Tumor Nekrose Faktor α (TNF α), *monocytes chemoattractant protein-1* (MCP-1), Interleukin-1 (IL-1) und Interleukin-6 (IL-6). Diese Mediatorfreisetzung führt einerseits über endotheliale, transmembranäre Zytokin-Rezeptoren zur intrazellulären Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B (*nuclear factor kappa B*) und zur konsekutiv gesteigerten Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle (ICAM-1, VCAM-1, E-Selektin)⁷ (Abb. 1.2), andererseits werden Leukozyten rekrutiert und aktiviert. „Protektive“ Genprodukte wie die endotheliale Stickstoffmonoxid (*nitric oxide*, NO) Synthase (*endothelial nitric oxide synthase*, eNOS) werden hingegen vermindert synthetisiert. Die reduzierte NO-Produktion führt zur Erhöhung des arteriellen Gefäßtonus und begünstigt somit die Ischämie.

Während der Reperfusion wird intrazellulär akkumuliertes Hypoxanthin durch die Xanthin-Oxidase mit dem nun wieder vorliegenden Sauerstoff zu Xanthin oxidiert. Dabei fallen ROS an. Diese Sauerstoffradikale unterstützen die inflammatorische Reaktion sowohl durch eine direkte Zellmembranschädigung durch Lipidperoxidation, als auch durch einen chemotaktischen Effekt, der die Zytokin- und CAM-Expression fördert und zur Leukozytenaktivierung führt⁸.

Die Leukozyten nähern sich über die Interaktion mit den CAM dem ansonsten als Barriere fungierenden Endothel an (Abb. 1.1). Erster Schritt hierbei sind wiederholte, kurze Bindungen niedriger Affinität zwischen endotheliale E-Selektin und P-Selektin und ihren leukozytären Liganden, wie z. B. dem P-Selektin-Glykoprotein-Ligand-1 (PSGL-1). Die hierdurch entstehende rollende Bewegung (*rolling*) führt zu einer Verlangsamung des Leukozytenstroms. Eine feste Adhärenz (*sticking*) wird durch die Interaktion der leukozytären β_2 -Integrine CD11a/CD18 (*leukocyte function antigen 1*, LFA-1) und CD11b/CD18 (*macrophage-1 antigen*, Mac-1 bzw. Komplementrezeptor Typ 3, CR3) mit den endothelialen

Adhäsionsmolekülen ICAM-1⁹ und VCAM-1 geschaffen. Die feste Bindung der Leukozyten an das Endothel ist die Voraussetzung für die Transmigration (*diapedesis*)^{10,11}. Diese Transmigration wird über die leukozytäre Bindung an das entlang der interendothelialen Zellverbindungen exprimierte Adhäsionsmolekül PECAM-1 (*platelet-endothelial cell adhesion molecule-1*) vermittelt. Begünstigend auf die Migration wirkt hierbei ein von Kardiomyozyten gebildeter chemotaktischer Gradient¹², der zudem zu einer Steigerung der adhäsiven Eigenschaften des Endothels führt und vom Ausmaß des oxidativen Stresses der Endothelzellen abzuhängen scheint. Auch die Expression von ICAM-1 auf ischämischen Kardiomyozyten trägt wesentlich zur Generierung des durch die Leukozyten hervorgerufenen myokardialen Schadens bei¹³.

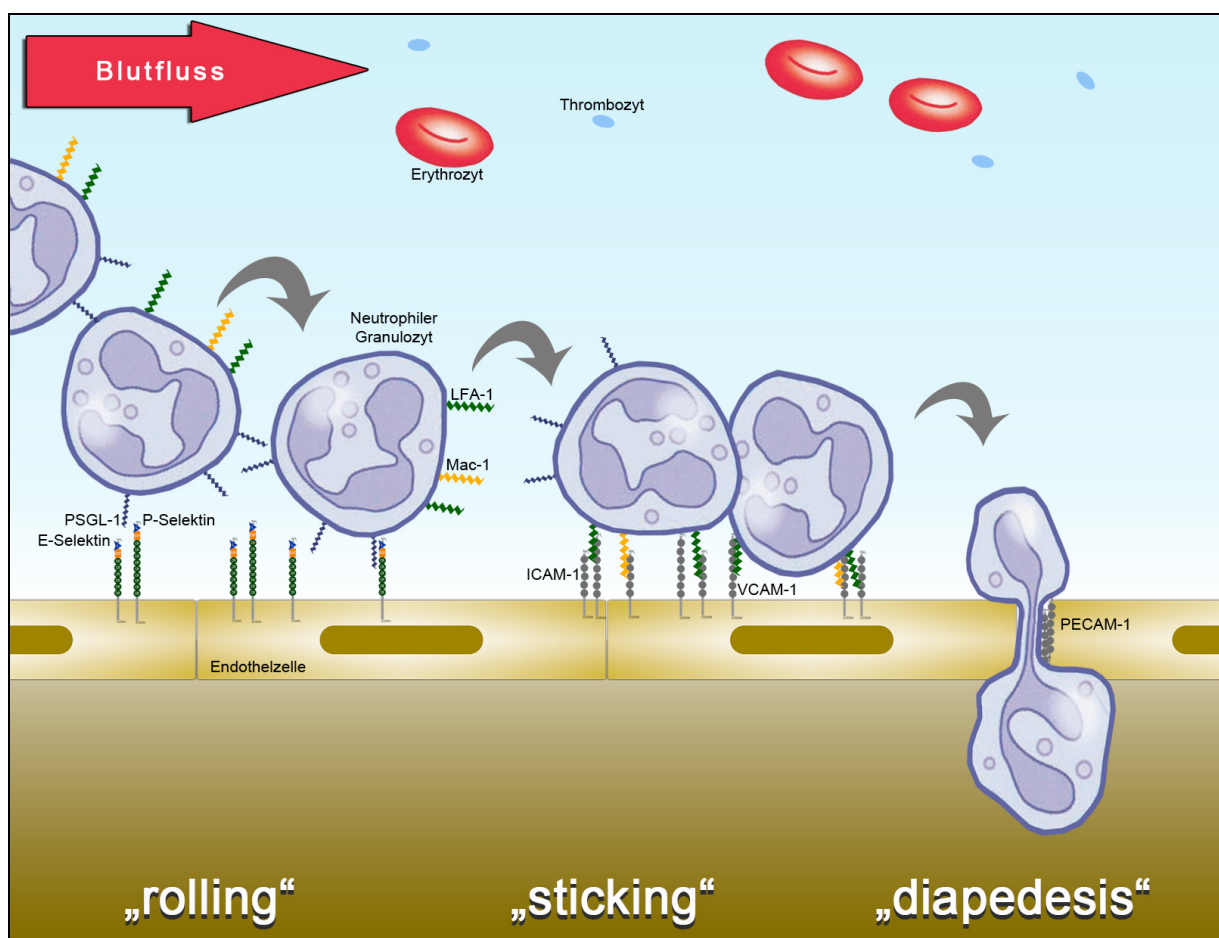


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der leukozytären transendothelialen Diapedese

Erläuterungen siehe Text. PSGL-1: P-Selektin-Glykoprotein-Ligand-1, LFA-1: *lymphocyte function antigen 1*, Mac-1: *macrophage-1 antigen*, ICAM-1: *intercellular adhesion molecule-1*, VCAM-1: *vascular cell adhesion molecule-1*, PECAM-1: *platelet-endothelial cell adhesion molecule-1*. Modifiziert nach Collard CD, Gelman S¹⁶.

Die transmigrierten Leukozyten setzen im aktivierten Zustand ROS, Proteasen und Elastasen frei, was zu einer gesteigerten mikrovaskulären Permeabilität, einer interstitiellen Ödembildung, zur Thrombosierung und zum Zelltod mit entsprechenden organbezogenen klinischen Erscheinungen führt.

Die teils durch aktivierte Thrombozyten verstärkte Aggregation der Leukozyten in der Mikrozirkulation in Verbindung mit oxidativem Stress und einer interstitiellen Ödembildung scheint hierbei der maßgebliche, zur kapillären Malperfusion führende Faktor zu sein. Hinweise darauf liefern verschiedene Tierstudien. So konnte gezeigt werden, dass bei genetisch veränderten, leukozyten- und CAM-defizienten Mäusen nach Ischämie und Reperfusion eine Verbesserung der kapillären Perfusion erzielt werden kann^{6,14}. Zudem vermindert eine Behandlung mit monoklonalen Antikörpern gegen endotheliale Adhäsionsmoleküle (anti-ICAM-1 mAb) den oxidativen Stress in postischämischen Venolen¹⁵. Eine Reduktion des oxidativen Stresses durch die Superoxid-Dismutase und die Verwendung ICAM-1-spezifischer Antikörper setzt die pathologisch gesteigerte mikrovaskuläre Permeabilität herab⁸.

1.2.3 Tumor Nekrose Faktor α (TNF α)

1.2.3.1 Grundlagen

Das proinflammatorische Zytokin TNF α moduliert die zellulären Adhäsionsmoleküle sowie weitere Zytokine und Chemokine^{6,16} und trägt somit entscheidend zur Entstehung der mikrovaskulären Dysfunktion bei. Im Rahmen des myokardialen Ischämie-Reperfusionsschadens kommt es zu einer Freisetzung von TNF α , zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B und zur Hochregulation der zellulären Adhäsionsmoleküle¹⁷. Die Freisetzung von TNF α korreliert im Rattenmodell mit der myokardialen Nekrose, der Kreatinkinase- und Myeloperoxidase-Aktivität sowie der Überlebensrate¹⁸, weshalb es in dem Zellkulturmodell der vorliegenden Arbeit zur Induktion des Zellschadens verwendet wurde.

TNF α ist ein (vornehmlich) von Makrophagen, Monozyten und Lymphozyten produziertes proinflammatorisches Zytokin, das gemeinsam mit zahlreichen verwandten Liganden und verschiedenen interagierenden Rezeptoren zur „TNF/TNF-Rezeptor-Superfamilie“ gezählt wird. Hierbei kann TNF α an zwei unterschiedliche Rezeptoren binden, nämlich den TNF-Rezeptor-1 (TNFR-1, 55 kDa Molekulargewicht) oder den TNF-Rezeptor-2 (TNFR-2, 75 kDa Molekulargewicht). Das als Ligand fungierende Glykoprotein führt über die Rezeptorbindung in seinen Effektorzellen (Endothelzellen, Monozyten, Lymphozyten) zu unterschiedlichen aktivitätsregulierenden Veränderungen. Einerseits werden hierbei für den Organismus positive Effekte wie eine suffiziente inflammatorische Immunantwort auf Infektionen und die Organogenese vermittelt. Andererseits ist die Liganden-Rezeptorinteraktion ebenfalls an der Generierung pathologischer Veränderungen beteiligt. Hierzu zählen autoimmune Erkrankungen (rheumatoide Arthritis, chronisch entzündliche Darmerkrankungen), Sepsis sowie Fiebersyndrome¹⁹. Und auch nicht-infektiöse inflammatorische Reaktionen, wie im

Rahmen des Ischämie-Reperfusionsschadens, werden über $\text{TNF}\alpha$ und den TNFR-1 vermittelt.

1.2.3.2 Effekte von $\text{TNF}\alpha$ auf Endothelzellen

Durch die Freisetzung von $\text{TNF}\alpha$ kommt es neben der gesteigerten vaskulären Permeabilität, die durch die Actin-vermittelte Kontraktion der Zellen mit einer interzellulären Lückenbildung vergesellschaftet ist²⁰, zur gesteigerten Expression zellulärer Adhäsionsmoleküle. Zudem werden Chemokine vermehrt produziert²¹ und Leukozyten aktiviert.

Da die Induktion der endothelialen ICAM-1-, VCAM-1- und E-Selektin-Bildung fast vollständig über die Interaktion zwischen $\text{TNF}\alpha$ und dem TNFR-1 vermittelt wird²², soll an dieser Stelle lediglich auf die über diesen Rezeptor vermittelte Signalkaskade eingegangen werden.

Die Ligandenbindung am TNFR-1 (Abb. 1.2) führt bei intakter, nicht-blockierter zellulärer Proteinbiosynthese über intrazellulär gelegene Rezeptorabschnitte, die sogenannten *death domains* (DD), zur Bindung des zytoplasmatischen DD-Adapterproteins *TNFR-associated death domain* (TRADD). TRADD aktiviert im Komplex mit *TNFR-associated factor 1* und *2* (TRAF 1 und 2) sowie *receptor interacting protein* (RIP) verschiedene intrazelluläre Kinasen. Durch diese Kinasen wird der $\text{I}\kappa\text{B}$ -Kinase-Komplex (IKK, bestehend aus $\text{IKK}\alpha$, $\text{IKK}\beta$ und $\text{IKK}\gamma$)¹⁹ wiederum in seine aktive Form überführt. Bei blockierter zellulärer Proteinbiosynthese wird hingegen die Apoptose über Caspasen induziert.

IKK phosphoryliert den aus α -, β - und ϵ -Untereinheiten bestehenden, an den Transkriptionsfaktor $\text{NF}\kappa\text{B}$ gebundenen $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Inhibitor ($\text{I}\kappa\text{B}$), was zu dessen Abspaltung und somit zur Disinhibition, also zur Aktivierung von $\text{NF}\kappa\text{B}$ führt. Dieser als Heterodimer (meist $\text{p50/NF}\kappa\text{B1}$ - und p65/RelA -Untereinheit) vorliegende Transkriptionsfaktor kann dann vom Zytosol in den Zellkern translozieren und - vermittelt durch Wasserstoffperoxid - an die entsprechenden Promotorregionen der jeweiligen Gene binden. Nach Phosphorylierung der p65 -Untereinheit²³ wird die Transkription entsprechender Gene, wie die für ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin eingeleitet^{24,25,26}.

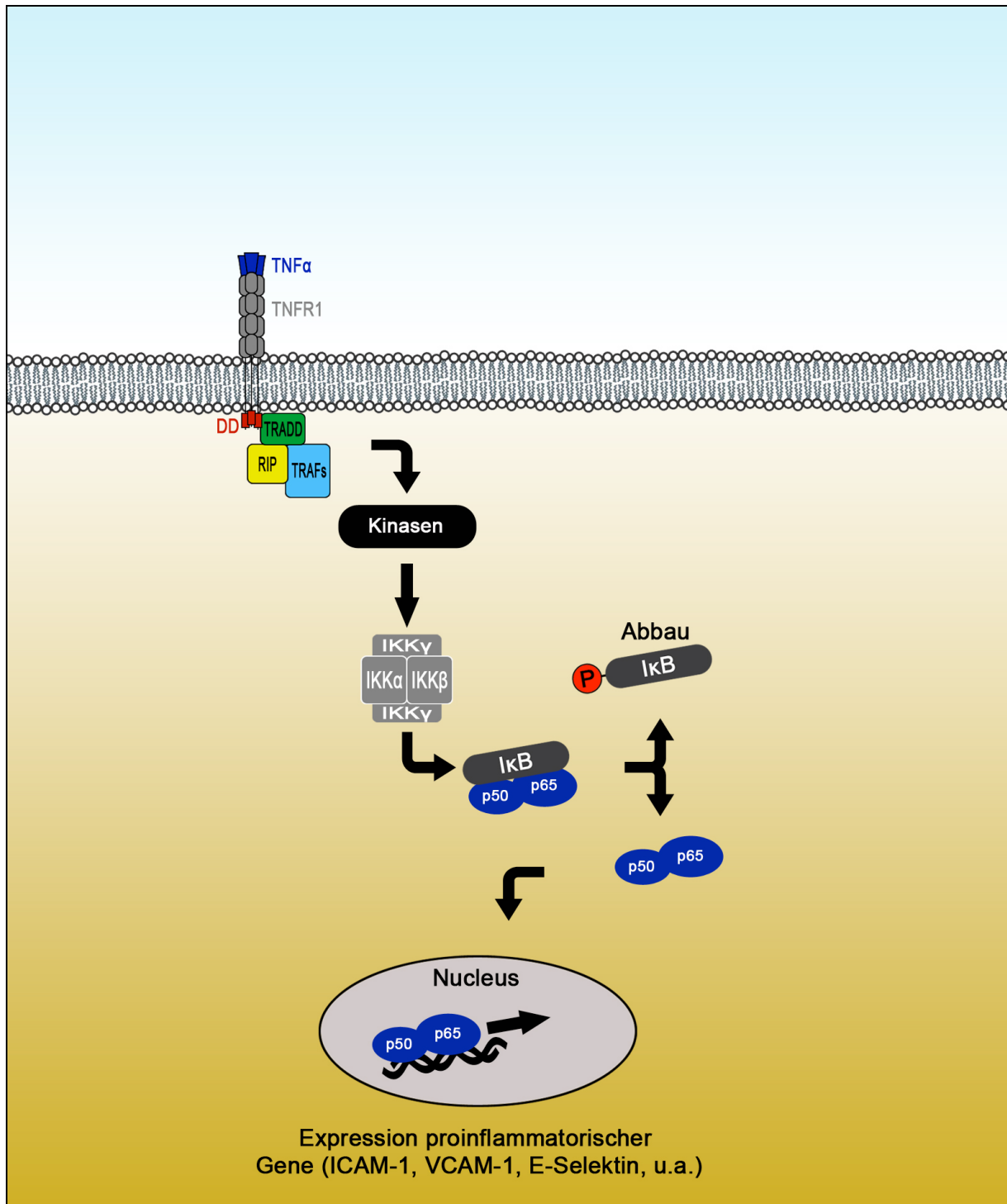


Abb. 1.2: Schematische Darstellung des TNF α -Signalweges über den TNF α -Rezeptor 1

Erläuterungen siehe Text. TNF α : Tumor Nekrose Faktor α , TNFR-1: Tumor Nekrose Faktor Rezeptor 1, DD: *death domains*, TRADD: *tumor necrosis factor receptor-associated death domain*, TRAFs: *tumor necrosis factor receptor-associated factors*, RIP: *receptor interacting protein*, IKK (bestehend aus IKK α , IKK β und IKK γ): I κ B-Kinase-Komplex, I κ B: NF κ B-Inhibitor, p50/p65 (Heterodimer): NF κ B, P: Phosphat-Rest, ICAM-1: *intercellular adhesion molecule-1*, VCAM-1: *vascular cell adhesion molecule-1*. Modifiziert nach Hehlhans T, Pfeffer K¹⁹.

1.2.4 Zelluläre Adhäsionsmoleküle (CAM)

1.2.4.1 Grundlagen

Zelluläre Adhäsionsmoleküle vermitteln die Kommunikation der Zellen mit ihrer Umgebung²⁷. Ihre Expression findet auf Endothelzellen und auf Zellen des Immunsystems (Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen) statt. Unter physiologischen Bedingungen ist ihre endotheliale und leukozytäre Expression neben der Zytokin-vermittelten Zell-Zell-Kommunikation ein entscheidender Faktor zur erfolgreichen Abwehr von Pathogenen. Im Rahmen des Ischämie-Reperfusionsschadens hingegen trägt die $\text{TNF}\alpha$ -induzierte Hochregulation der CAM-Expression entscheidend zur Entstehung der Parenchymschädigung bei (siehe Abschnitt 1.2.2).

1.2.4.2 Klassifikation

Nach ihrer biochemischen Beschaffenheit können die CAM in vier Gruppen eingeteilt werden: die Immunglobulin-Superfamilie, die Selektine, die Integrine und die Cadherine. Da die leukozytäre Rekrutierung vornehmlich über Vertreter der Immunglobulin-Superfamilie, nämlich ICAM-1 und VCAM-1 sowie das Selektin E-Selektin vermittelt wird²⁸, wurden diese Adhäsionsmoleküle in dieser Arbeit untersucht und sollen daher an dieser Stelle genauer betrachtet werden.

1.2.4.2.1 Immunglobulin-Superfamilie:

Hierbei handelt es sich um eine große Gruppe verschiedener transmembranärer Glykoproteine (Abb. 1.3), deren gemeinsames Merkmal die Ausbildung extrazellulärer, von der Beschaffenheit der Polypeptidketten immunglobulin-ähnlicher Abschnitte mit Cystein-Sequenzen ist, die über Disulfidbrücken eine β -Faltblattstruktur stabilisieren. Je nach Molekül variiert dabei die Anzahl dieser Immunglobulindomänen. Es sind über 70 verschiedene Glykoproteine dieser Gruppe mit unterschiedlichen Funktionen bekannt, von denen 5 auf Endothelzellen expremiert werden und an der Leukozytenrekrutierung beteiligt sind: *intercellular adhesion molecule-1* und *-2* (ICAM-1, -2), *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1), *platelet-endothelial cell adhesion molecule-1* (PECAM-1) und *mucosal adressin* (MAdCAM-1)²⁸.

ICAM-1:

Dieses Adhäsionsmolekül besteht aus 5 Immunglobulindomänen und wird bereits auf unstimulierten Endothelzellen²⁹, aber auch auf Leukozyten expremiert. Unter Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen wie $\text{TNF}\alpha$, IL-1 und IFN- γ (Interferon- γ) steigt die Anzahl der Oberflächenmoleküle durch die induzierte Gentranskription und die daraus folgende *de-novo* Proteinbiosynthese deutlich an. ICAM-1 fungiert als Rezeptor für die leukozytären β_2 -

Integrine CD11a/CD18 (LFA-1) und CD11b/CD18 (Mac-1) und vermittelt über deren Bindung die feste Adhärenz der Leukozyten am Endothel (siehe Abschnitt 1.2.2).

VCAM-1:

Von VCAM-1 existieren zwei Formen: die erstbeschriebene besitzt 6 Immunglobulindomänen (6D VCAM-1) und entsteht neben der endothelial prädominant expremierten Form mit 7 Immunglobulindomänen (7D VCAM-1) durch alternatives Spleißen^{30,31}. Die Bildung von VCAM-1 wird ebenfalls durch die proinflammatorischen Zytokine $\text{TNF}\alpha$, IL-1 und $\text{IFN-}\gamma$ induziert und fungiert vornehmlich als Rezeptor für das auf Lymphozyten und Monozyten expremierte Integrin VLA-4 (*very late antigen-4*) und verstärkt damit deren Adhäsion.

PECAM-1:

Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (=CD31) besitzt ebenfalls 6 Immunglobulindomänen und wird vornehmlich im Interzellularraum benachbarter Endothelzellen, aber auch auf Thrombozyten und Leukozyten expremiert. Hierbei ist die Ausprägung der Expression zytokin-unabhängig²⁸. Mittels PECAM-PECAM-Interaktionen können die Leukozyten schließlich interzellulär die Transmigration vollziehen. Hierbei wird die Rate und die Richtung der Migration durch PECAM-1 reguliert³².

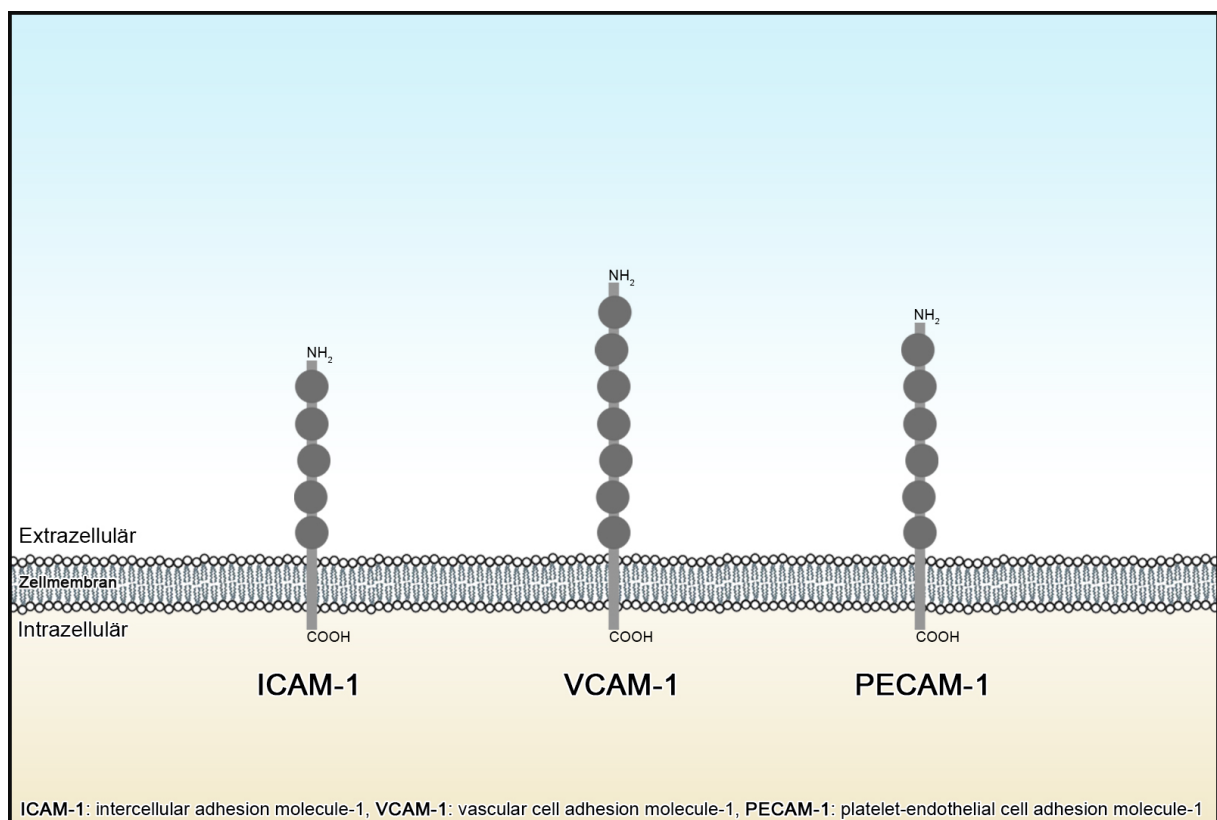


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der Immunglobulin-Superfamilie

Graue Kreise: Immunglobulindomänen, graue Stäbe: Polypeptidketten, NH_2 : aminoterminales Ende der Polypeptidketten, COOH : Carboxylgruppe der Polypeptidketten. Modifiziert nach Aplin AE et al.²⁷ und Carlos TM et al.²⁸.

1.2.4.2.2 Selektine:

Zu den Selektinen (Abb. 1.4) zählen drei Rezeptormoleküle: E- (*endothelial*), P- (*platelet*) und L- (*leukocyte*) Selektin. Diese Glykoproteine bestehen aus einem extrazellulären, einem transmembranären und einem intrazellulären Abschnitt. Das extrazelluläre Kompartiment setzt sich wiederum aus drei Domänen zusammen. Am N-terminalen Ende befindet sich die sogenannte Lektin-Domäne, die in der Lage ist, kalziumabhängig Kohlenhydratabschnitte verschiedener Glykoproteine zu erkennen, über welche die Ligandenbindung vermittelt wird. Daher wird dieser Abschnitt auch als *carbohydrate recognition domain* (CRD) bezeichnet. Der Lektin-Domäne schließt sich die EGF-ähnliche (*epidermal growth factor-like*) Domäne an, gefolgt von einer je nach Molekül unterschiedlich langen Domäne, die aus sogenannten *consensus repeats* (CR) besteht, die Sequenzhomologien zu Proteinen des Komplementsystems aufweisen^{33,34}. Den zytoplasmatischen Teil bildet ein kurzer C-terminaler Abschnitt.

E-Selektin:

E-Selektin zeichnet sich durch 6 CR aus und wird auf aktivierten Endothelzellen durch die Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen wie $\text{TNF}\alpha$ und IL-1 nach 4 bis 6h maximal expremiert³⁵. $\text{IFN}\gamma$ scheint diesen Effekt ohne eigene expressionsinduzierende Wirkung zu unterstützen³⁶. Die kurzen, niedrig-affinen Bindungen mit dem am besten bekannten Liganden E-Selektin-Ligand-1 (ESL-1)³⁷ führen zum Rollen der Leukozyten und somit zur Verlangsamung ihrer Fließgeschwindigkeit.

P-Selektin:

P-Selektin weist 9 der beschriebenen CR auf und ist damit das größte Molekül der Selektin-Familie. Es wird auf Thrombozyten und in geringen Mengen konstitutionell auf Endothelzellen expremiert und präformiert in sogenannter thrombozytärer „ α -Granula“ bzw. endothelial in „Weibel-Palade-Körpern“ zytoplasmatisch gespeichert. Durch inflammatorische Stimuli (proinflammatorische Zytokine, Thrombin, Histamin, Wasserstoffperoxid) kann die Anzahl der Oberflächenmoleküle rasch innerhalb von Minuten erhöht werden^{27,33}. Ligand des P-Selektins ist der auf Leukozyten expremierte P-Selektin-Glykoprotein-Ligand-1 (PSGL-1), dessen Bindung ebenfalls das Leukozytenrollen vermittelt.

L-Selektin:

Das aus 2 CR bestehende kleinste Selektin wird im Gegensatz zu E- und P-Selektin ausschließlich auf Leukozyten expremiert. Zu den Liganden von L-Selektin gehören das Adressin MAdCAM-1, GlyCAM-1 und CD34^{27,28}. L-Selektin ist ebenfalls an der Vermittlung des Leukozytenrollens beteiligt.

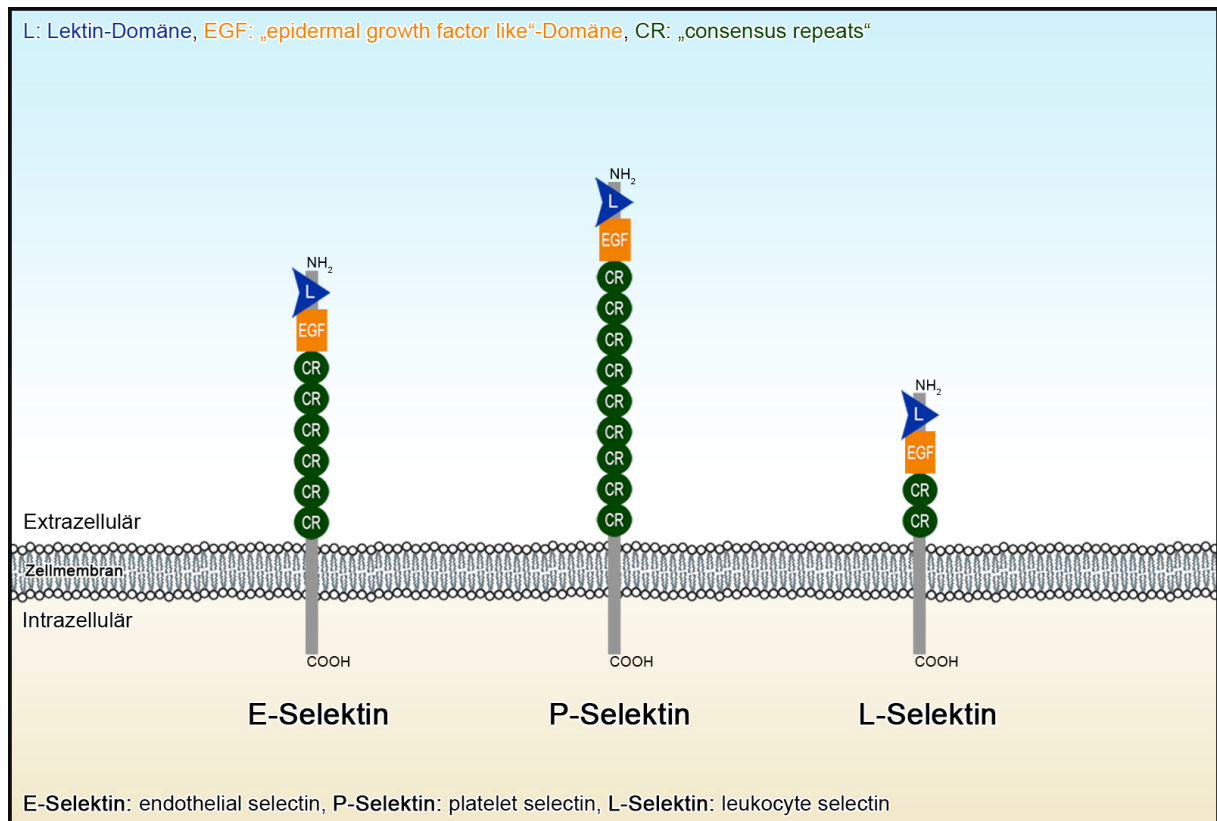


Abb. 1.4: Schematische Darstellung der Selektine

Graue Stäbe: Polypeptidketten mit einem intrazellulären, transmembranären und extrazellulären Kompartiment. NH₂: aminoterminals Ende der Polypeptidketten, COOH: Carboxylgruppe der Polypeptidketten. Abschnitte des extrazellulären Kompartiments: L: Lektin-Domäne, EGF: EGF-ähnliche (*epidermal growth factor-like*) Domäne, CR: *consensus repeats*. Modifiziert nach Aplin AE et al.²⁷ und Carlos TM et al.²⁸.

1.2.5 Klinische Manifestationen

Die klinischen Folgen des Ischämie-Reperfusionsschadens sind vielfältig und führen im Myokard im Falle einer zuvor nicht-letalen Ischämie vornehmlich zu einer verminderten myokardialen Kontraktilität (myokardiales *stunning*) sowie zum Auftreten von Arrhythmien (Reperfusions-Arrhythmien). Das sogenannte *no-reflow*-Phänomen scheint hierbei zur Persistenz bzw. Progression dieser Dysfunktion des Myokards beizutragen. Durch die leukozytäre Adhärenz am Endothel, eine interstitielle Ödembildung sowie eine in dieser Situation verminderte endothelial vermittelte Vasodilatation kommt es zu einer mechanischen Obstruktion der mikrovaskulären Strombahn. Dies hat trotz einer makroskopisch wiederhergestellten Perfusion eine klinisch beobachtbare persistierende Minderperfusion des betroffenen Organs zur Folge¹⁶.

Myokardiales *stunning*:

Das myokardiale *stunning* beschreibt eine temporäre kontraktile Dysfunktion des Myokards, die nach einer postischämischen Reperfusion trotz vollständiger Wiederherstellung des koronaren Blutflusses und fehlender irreversibler Parenchymschädigung Stunden bis Tage persistiert³⁸. Eine definitive Klärung der zu diesem Phänomen führenden Pathomechanismen gibt es bislang nicht. Verschiedene Mechanismen werden postuliert, unter anderem geht man von einer verminderten ATP-Synthese, einer ROS-vermittelten Schädigung von Enzymen und Zellorganellen und einem veränderten zellulären Kalziumstoffwechsel mit zudem verminderter Ansprechbarkeit der Myofilamente auf Kalzium aus. Zu den klinischen Situationen, in denen ein *stunning* auftreten kann, zählen die koronararterielle Bypass-Operation, koronare Vasospasmen oder auch eine spontane (spontane Thrombolyse) oder interventionelle (PTCA) Koronarreperfusion. *Stunning* zu erkennen und von potentiell revaskularisierbaren Zuständen abzugrenzen ist von zentraler Bedeutung.

Unterschieden werden muss *stunning* vom *hibernating myocardium*. Dabei handelt es sich um ein 1981 von Flameng et al.³⁹ bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit erstbeschriebenes Phänomen. Hierbei zeigt sich eine auf die Phase der chronischen Hypoperfusion beschränkte kontraktile Dysfunktion des Myokards, die mit der Wiederherstellung der Koronarperfusion endet. Man nimmt an, dass der Grund für die verminderte Kontraktilität eine Senkung des Energieverbrauchs im Sinne einer Anpassungsreaktion ist⁴⁰. Klinisch ist es von großer Bedeutung das *hibernating* Myokard durch die Stressechokardiographie, Myokardszintigraphie oder Kernspintomographie zu erkennen, da Reperfusionsmaßnahmen eine Verbesserung der Pumpfunktion erzielen können.

1.3 Kardioprotektion

Kardioprotektive Anästhetika können das Myokard vor den Folgen des Ischämie-Reperfusionsschadens schützen. Hierbei kann der protektive Stimulus vor (Präkonditionierung), während oder nach der Ischämie und somit während der Reperfusion (Postkonditionierung) appliziert werden.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den Aspekten der Präkonditionierung, weshalb im folgenden Abschnitt dieser Bereich behandelt werden soll.

1.3.1 Ischämische Präkonditionierung

1986 konnten Murry et al.⁴¹ erstmals an Hunden zeigen, dass kurze subletale myokardiale Ischämiephasen, hervorgerufen durch Koronarokklusionen, gefolgt von kurzen Reperusionsphasen vor den Folgen einer anschließenden längeren Ischämiephase schützen können. Zahlreiche Studien folgten, die diesen Effekt an einzelnen Kardiomyozyten, an Myokardpräparaten, perfundierten Herzen sowie verschiedenen Organen, Tierspezies und auch an Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen reproduzieren konnten und sich mit den hierzu führenden pathophysiologischen und molekularen Mechanismen befassten^{42-52,57,63,70,71,85-87,89-91}.

Auch konnte gezeigt werden, dass die durch eine prolongierte Ischämie hervorgerufenen pathologischen Veränderungen in der Mikrozirkulation (Ischämie-Reperfusionsschaden im Sinne der mikrovaskulären Dysfunktion) durch die ischämische Präkonditionierung verringert werden können.

Bezüglich des zeitlichen Auftretens der protektiven Effekte unterscheidet man zwischen der 1. akuten / frühen („klassischen“) und der 2. späten / verzögerten Präkonditionierung bzw. „ischämischen Toleranz“, was auch als *second window of protection* (SWOP) bezeichnet wird. Die protektiven Veränderungen treten hierbei etwa innerhalb der ersten 2 bzw. 24h nach den präkonditionierenden Stimuli auf und sind im ersten Fall unabhängig⁵³, im zweiten Fall hingegen abhängig⁵⁴ von einer veränderten Proteinbiosynthese.

Initialer molekularer Mechanismus ist in beiden Fällen die Aktivierung von Adenosin- und / oder α_1 -adrenergen (G-Protein-gekoppelten) Rezeptoren. Die durch die Ligandenbindung vermittelte Konformationsänderung des Rezeptors hat die intrazelluläre, Guanosintriphosphat (GTP)-abhängige Freisetzung der α_s -Untereinheit des Rezeptors zur Folge, die zu einer Aktivierung der Phospholipasen C und / oder D führt. Die Phospholipase C hydrolysiert membranständiges Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu den *second-messenger* Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃). Je nach Isoform wird entweder mit oder ohne Kalzium bzw. DAG und Phosphatidylserin (PS) die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) vermittelt, was eine Translokation bestimmter

Isoformen dieses Enzyms vom Zytosol zur Zellmembran zur Folge hat⁵⁵. Die PKC phosphoryliert und aktiviert ATP-abhängige Kaliumkanäle (K_{ATP}) in der sarkolemmalen und mitochondrialen Membran⁵⁶ und vermittelt die Translokation der 5'-Nukleotidase zur Zelloberfläche. Folge hiervon ist einerseits eine gesteigerte zelluläre ATP-Produktion, andererseits eine Hemmung der Leukozytenadhärenz. Diese Mechanismen scheinen wichtige Schritte bei der Generierung der frühen Protektion durch Präkonditionierung zu sein^{57,58}.

Die späten Effekte der ischämischen Präkonditionierung werden über die gleichen Stimuli ausgelöst. Entscheidender Unterschied ist hierbei aber die Veränderung der zellulären Genexpression und Proteinbiosynthese, was die zeitliche Latenz bis zum Auftreten der Protektion erklärt. Die oben beschriebene Aktivierung bestimmter PKC-Isoformen und anderer Proteinkinasen beeinflusst die über den Transkriptionsfaktor NF κ B regulierte Proteinexpression und führt letztlich zu einer gesteigerten Synthese antioxidativer Enzyme (Superoxid-Dismutase, Katalase, Glutathion-Peroxidase)^{44,59,60}, zu einer Induktion zytoprotektiver, das Zytoskelett stabilisierender Hitzeschockproteine (HSP)^{61,62} und zur verminderten leukozytären Adhärenz in der Reperfusionsphase⁶³.

Die ischämische Präkonditionierung reduziert in der Reperfusionsphase die Akkumulation neutrophiler Granulozyten sowie die myokardiale Apoptoserate und verbessert die ventrikuläre Funktion⁶³. Der durch die ischämische Präkonditionierung generierte protektive Effekt ist nicht nur an Kardiomyozyten, sondern auch koronaren Endothelzellen nachweisbar, es wird also die endotheliale Dysfunktion verringert⁶⁴⁻⁶⁷.

Beauchamp et al.⁶⁸ fanden heraus, dass dieser Effekt am Endothel durch die Verringerung der ICAM-1-Expression mit einer konsekutiv verminderten Leukozytenadhärenz bedingt ist. Sie konnten an Endothelzellen aus der Rattenaorta zeigen, dass die ischämische Präkonditionierung zu einer Verringerung der ICAM-1-Expression führte, was unter anderem über die Proteinkinase C vermittelt wurde. Auch Zahler et al.⁶⁹ belegten, dass die ischämische Präkonditionierung einen Effekt auf das Endothel und dort insbesondere auf die Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und E-Selektin hat. Sie konnten in einem Zellkulturmodell mit menschlichen Nabelschnurendothelzellen zeigen, dass die den präkonditionierenden Stimulus imitierende, transiente Behandlung mit Wasserstoffperoxid die durch den Ischämie-Reperfusionsschaden entstehende, TNF α -induzierte Expression der endothelialen Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und E-Selektin verringern kann. Alle diese Arbeiten belegen somit den protektiven Effekt der ischämischen Präkonditionierung auf die Mikrozirkulation.

1.3.2 Pharmakologische Präkonditionierung

1.3.2.1 Hintergrund

Auch durch die Applikation verschiedener pharmakologischer Substanzen wie die halogenierten Fluorkohlenstoffe (Halothan, Isofluran, Sevofluran und Desfluran), aber auch durch das Edelgas Xenon und das Opiat Morphin können die präkonditionierenden Effekte *in vitro* und in verschiedenen Tierspezies *in vivo* ausgelöst werden⁷⁰⁻⁸³. Dieses Phänomen wird als pharmakologische bzw. Anästhetika-induzierte Präkonditionierung bezeichnet. Dieses Verfahren der perioperativen Kardioprotektion ist praktikabler und scheint im Gegensatz zur ischämischen Präkonditionierung eine besser vorhersagbare und somit besser steuerbare Änderung der Genexpression mit entsprechenden morphologischen und funktionellen Effekten hervorzubringen⁸⁴.

1.3.2.2 Klinische Studien

Kardioprotektion durch pharmakologische Präkonditionierung ist auch auf den Menschen übertragbar, wie verschiedene klinische Studien an Patienten während koronararterieller Bypass-Operationen zeigen konnten⁸⁵⁻⁹⁰. Hierbei handelt es sich allerdings um Studien mit relativ kleinen Fallzahlen, bei denen zudem größtenteils Surrogatparameter der Organprotektion erhoben wurden. 2006 zeigte eine Metaanalyse von Symons und Kollegen⁹¹ den Nutzen durch kardioprotektive Anästhetika. Die Arbeitsgruppe untersuchte die bis zu diesem Zeitpunkt publizierten randomisierten kontrollierten Studien auf die Surrogatparameter einer Kardioprotektion und die harten Endpunkte Myokardinfarkt und Tod. Eingeschlossen wurden 27 Studien, bei denen 2979 Patienten unter *on-* und *off-pump-CABG* (*coronary artery bypass graft surgery*) randomisiert einer kardioprotektiven Narkose mit volatilen Anästhetika oder einer total intravenösen Anästhesie (TIVA) unterzogen wurden. Es konnten in der Gruppe der volatilen Anästhetika deutliche Hinweise auf eine Kardioprotektion erhoben werden, nämlich ein 20% höherer *cardiac index* (=Herzminutenvolumen pro Körperoberfläche), niedrigere Troponin-I-Konzentrationen, ein geringerer postoperativer Bedarf inotroper Substanzen sowie eine kürzere Beatmungs- und Krankenhausverweildauer. Harte Endpunkte wie Myokardinfarkt, myokardiale Ischämie, intensivmedizinische Behandlungsdauer und Tod blieben unbeeinflusst. Weitere Studien zeigten eine Verkürzung der Verweildauer auf Intensivstationen und im Krankenhaus durch kardioprotektive Anästhetika-Protokolle^{92,93} und retrospektiv konnte eine Verbesserung des *Outcomes* im Vergleich zu totaler intravenöser Anästhesie gezeigt werden⁹⁴.

Erstmals wurde 2004 prospektiv von Garcia et al.⁹⁵ der Einfluss der Präkonditionierung auf späte kardiale Ereignisse untersucht. Sie konnten bei 72 Patienten, die sich einer elektiven koronararteriellen Bypass Operation unterzogen, unter einer präkonditionierenden Anästhetika-Behandlung mit Sevofluran eine signifikante Reduktion perioperativ bestimmter

Marker des myokardialen Stresses bzw. Schadens (NT-proBNP, Troponin) und eine damit einhergehende Reduktion der Inzidenz kardialer Ereignisse (Herzinsuffizienz, koronararterielle Reokklusion) nach 6 und 12 Monaten dokumentieren. Zudem konnte in den nach der Präkonditionierung entnommenen Biopsien aus dem Atrium eine Verringerung der transkriptionellen Aktivität für PECAM-1 nachgewiesen werden. PECAM-1 gehört wie ICAM-1 und VCAM-1 zur Gruppe der Immunglobulin-Superfamilie und vermittelt die transendotheliale Leukozytenmigration (siehe Abschnitte 1.2.2 und 1.2.4.2.1) und wurde als prognostischer Faktor angesehen, da dessen gesteigerte Expression den Übergang von einem stabilen zu einem instabilen koronararteriellen Plaque zu begünstigen scheint⁹⁶⁻⁹⁸.

1.3.2.3 Molekularbiologie – Kardiomyozyten versus Endothelzellen

Zunehmend werden die molekularen Zusammenhänge verstanden, die die pharmakologische Präkonditionierung auf zellulärer Ebene vermitteln⁹⁹⁻¹⁰¹. Bislang konzentrierte man sich hierbei primär auf die Parenchymzellen des Myokards und konnte Ähnlichkeiten, aber auch wichtige Unterschiede¹⁰² zu den Mechanismen der ischämischen Präkonditionierung feststellen. So konnte gezeigt werden, dass die pharmakologische Präkonditionierung von Kardiomyozyten über die Aktivierung von Adenosin- und ATP-abhängigen Kaliumkanälen (K_{ATP}), die Phosphorylierung und Translokation der PKC- ϵ vom Zytosol zur Zellmembran, die Aktivierung der *p38 mitogen-activated protein kinase* (p38 MAPK) und über die Aktivierung des Hitzeschockproteins 27 (HSP 27) sowie die damit verbundene Stabilisierung des Zytoskeletts vermittelt wird^{103,104}. Morphin vermittelt seinen präkonditionierenden Effekt über die Aktivierung von ATP- (mK_{ATP})^{105,106} und kalziumabhängigen, mitochondrialen Kaliumkanälen (mK_{Ca})⁸².

Über die Effekte der pharmakologischen Präkonditionierung auf die Mikrozirkulation, als wichtige am Ischämie-Reperfusionsschaden beteiligte Struktur, ist bislang verhältnismäßig wenig bekannt. Die in diesem Kontext relevanten untersuchten Zielstrukturen sind das Endothel und die Leukozyten bzw. deren Interaktion, da sie für die Generierung der mikrovaskulären Dysfunktion entscheidend sind. Verschiedene Arbeiten konnten bereits einen Einfluss volatiler Anästhetika auf diesen Prozess, der zur Leukozytenrekrutierung führt, aufzeigen. Kowalski et al.¹⁰⁷ hatten 1997 in einem Langendorff-Modell erstmals eine Reduktion der postischämischen Adhärenz neutrophiler Granulozyten in den Koronarien von Meerschweinchenherzen durch die kontinuierliche Behandlung mit den volatilen Anästhetika Halothan, Isofluran und Sevofluran nachgewiesen. Möbert et al.¹⁰⁸ beschäftigten sich 1999 mit dem Einfluss der volatilen Anästhetika Halothan, Isofluran und Sevofluran auf die Adhärenz neutrophiler Granulozyten an isolierten Endothelzellen und konnten eine Reduktion der Leukozytenadhäsion durch alle Substanzen belegen. Dabei legten sie besonderes Augenmerk darauf, ob der beobachtete antiadhäsive Effekt über die

Beeinflussung der Leukozyten oder der Endothelzellen vermittelt wird. Sie konnten zeigen, dass es durch die Behandlung der neutrophilen Granulozyten mit den genannten volatilen Anästhetika zur Reduktion der Hochregulation des leukozytären Adhäsionsmoleküls CD11b/CD18 (Mac-1) kommt. Diese verminderte Mac-1-Expression wurde als Mechanismus gewertet, der die Reduktion der leukozytären Adhärenz am Endothel vermittelt. Eine weitere Arbeit¹⁰⁹ an isolierten Meerschweinchenherzen konnte für Sevofluran und Isofluran zeigen, dass deren Applikation die postischämische Adhäsion neutrophiler Granulozyten verringern und damit die Pumpfunktion des Myokards schützen kann. Diese Effekte waren ebenfalls mit einer Reduktion der CD11b/CD18-Expression assoziiert. Auch das chemisch inerte Edelgas Xenon scheint in die im Rahmen des Ischämie-Reperfusionsschadens gesteigerte Interaktion zwischen Leukozyten und Endothel einzugreifen. De Rossi et al.¹¹⁰ zeigten, dass Xenon die Oberflächenexpression von P-Selektin-Glykoprotein-Ligand-1 (PSGL-1) und L-Selektin in isolierten neutrophilen Granulozyten reduziert, ohne jedoch die β_2 -Integrine zu beeinflussen.

Doch auch am Endothel sind Effekte durch Anästhetika nachweisbar, die in diese Leukozyten-Endothel-Interaktion eingreifen. Verschiedene Arbeiten hatten bereits gezeigt, dass die ischämische Präkonditionierung einen Effekt auf das Endothel und dort insbesondere auf die Expression der Adhäsionsmoleküle hat (siehe Abschnitt 1.3.1) und dass die Proteinkinase C an dieser Signalkaskade beteiligt ist⁶⁸. Auch konnte in Zellkulturen gezeigt werden, dass volatile Anästhetika sowohl durch die Reduktion der endothelialen Adhäsionsmolekülexpression¹¹¹ als auch hiervon unabhängig¹¹² eine Minderung der leukozytären Adhärenz zur Folge haben.

Diese Daten legen es nahe, dass Anästhetika verschiedener Substanzgruppen imstande sind unter anderem über eine Beeinflussung der Zytokin-induzierten Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle den Ischämie-Reperfusionsschaden zu mindern.

1.4 Fragestellung

Dass diverse Pharmaka verschiedener Substanzklassen einen kardioprotektiven Effekt im Sinne einer Präkonditionierung vermitteln können, ist gut belegt. Insbesondere gilt dies für die Effekte auf Kardiomyozyten. Auch gibt es experimentelle Hinweise darauf, dass diese pharmakologische Präkonditionierung über die Reduktion der leukozytären Adhärenz am Endothel vermittelt wird. Es kann vermutet werden, dass dieser Schutz durch die Reduktion der Zytokin-induzierten CAM-Expression generiert wird.

Ziel dieser Arbeit war es, den Effekt verschiedener, im Kontext der pharmakologischen Präkonditionierung des Myokard bereits untersuchter Pharmaka, auf die $\text{TNF}\alpha$ -induzierte Expression der an diesem pathophysiologischen Schritt beteiligten Adhäsionsmoleküle darzustellen. Dabei sollte auf verschiedenen Ebenen der Proteinexpression geklärt werden, ob die Substanzen in diesem Versuchsaufbau letztlich die Oberflächenexpression der CAM reduzieren können.

Es ergaben sich folgende Fragestellungen:

1. Wie beeinflussen Xenon, Distickstoffmonoxid (N_2O , „Lachgas“), Morphin und Isofluran die $\text{TNF}\alpha$ -induzierte Transkriptionsaktivität des für die CAM-Expression primär verantwortlichen Transkriptionsfaktors $\text{NF}\kappa\text{B}$?
2. Wie beeinflussen Xenon, Distickstoffmonoxid (N_2O , „Lachgas“), Morphin und Isofluran die $\text{TNF}\alpha$ -induzierte mRNA-Expression der zellulären Adhäsionsmoleküle?
3. Wie beeinflussen Xenon, Distickstoffmonoxid (N_2O , „Lachgas“), Morphin und Isofluran die $\text{TNF}\alpha$ -induzierte Proteinexpression der zellulären Adhäsionsmoleküle?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Standardmaterialien

Anästhetika	
Isofluran (Forene®)	Abbott (Wiesbaden, Deutschland)
Xenon und Distickstoffmonoxid („Lachgas“, N ₂ O)	Linde Gas AG (Pullach, Deutschland)

Zellkulturmaterialien (HUVEC)	
Collagenase A	Roche (Mannheim, Deutschland)
25cm ² -, 75cm ² -Zellkulturflaschen	TPP (Trasadingen, Schweiz)
6-, 12-, 24-Well-Platten	Peske (Aindling-Pichl, Deutschland)
Endothelial Cell Growth Medium (ECGM)	Promocell (Heidelberg, Deutschland)
M199	PAN (Aidenbach, Deutschland)
Fetal Bovine Serum (FBS)	Biochrom AG (Berlin, Deutschland)
Trypsin/EDTA	Biochrom AG (Berlin, Deutschland)
L-Glutamin	PAA (Pasching, Österreich)

Infrarot elektrophoretischer Mobilitäts-Shift-Assay (IR-EMSA)	
22-mer Doppelstrang-Oligonucleotid-Sonde, NFκB-bindend, IRDye 700 markiert	Licor Biosciences GmbH (Bad Homburg, Deutschland)

Reverse-Transkription-Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR)	
Oligo sense/antisense (ICAM-1, VCAM-1, E-Selectin)	MWG-Biotech AG (Ebersberg, Deutschland)

Alle weiteren Materialien wurden, sofern nicht anders aufgeführt, von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland), Merck-Eurolab GmbH (München, Deutschland) oder der Apotheke des Universitätsklinikums Düsseldorf bezogen.

2.1.2 Antikörper

von-Willebrand-Faktor (vWF)-Färbung	
Sheep anti-human-vWF polyklonales IgG (Fluorescein-5-Isothiocyanat [FITC]-markiert)	Serotec LTD (Wiesbaden, Deutschland)

Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS)	
Mouse (monoclonal) anti-human CD54 (ICAM-1) (Fluorescein-5-Isothiocyanat [FITC]-markiert)	Biosource (Nivelles, Belgien)
Mouse (monoclonal) anti-human CD106 (VCAM-1) (Fluorescein-5-Isothiocyanat [FITC]-markiert)	Calbiochem®, Merck (Darmstadt, Deutschland)
Mouse (monoclonal) anti-human CD62E (E-Selectin) (Fluorescein-5-Isothiocyanat [FITC]-markiert)	Biosource (Nivelles, Belgien)

2.2 Methoden

Zur Bearbeitung unserer Fragestellungen wählten wir ein *in-vitro* Zellkulturmodell. Es wurden humane Nabelschnurendothelzellen (*human umbilical vein endothelial cells*, HUVEC), basierend auf der Methode von Jaffe et al.¹¹³ standardisiert isoliert und bis in die zweite oder dritte Generation (Passage 2 bzw. 3) kultiviert (Abschnitt 2.2.1). Darauf folgten Färbungen zur Verifizierung der Isolierungs- und Kultivierungsmethode (Abschnitt 2.2.2) und das experimentelle Protokoll der Anästhetikabehandlung (Abschnitt 2.2.3). Um die vermutete präkonditionierende Wirkung der Anästhetika auf das Endothel im Sinne einer Beeinflussung der zellulären Adhäsionsmolekülexpression nachvollziehen zu können, wurden die Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin sowohl auf transkriptioneller Ebene (IR-EMSA, RT-PCR), als auch auf Ebene der Proteinexpression (FACS) untersucht (Abschnitt 2.2.4).

2.2.1 Isolierung und Kultivierung humaner Nabelschnurendothelzellen (HUVEC)

Lösungen:

1. PBS-	
NaCl	8,00 g
KCl	0,20 g
Na ₂ HPO ₄	1,15 g
KH ₂ PO ₄	0,20 g
+ Aqua dest. ad 1000 ml	

2. PBS+	
NaCl	8,00 g
KCl	0,20 g
Na ₂ HPO ₄	1,15 g
KH ₂ PO ₄	0,20 g
+ Aqua dest. ad 1000 ml	
Autoklavieren der Lösung	
Zugabe von:	
MgCl ₂	0,10 g
CaCl ₂	0,10 g
Sterile Filtration in ein autoklaviertes Behältnis	

3. Abstopp-Medium	
M199 (PAN, Aidenbach, Deutschland)	500 ml
Entnahme von 65 ml	
Zugabe von:	
Fetal Bovine Serum (FBS, Biochrom AG, Berlin, Deutschland)	50 ml
Penicillin 100 U/ml, Streptomycin 100 ng/ml	5 ml
Amphotericin B	5 ml
L-Glutamin (PAA, Pasching, Österreich)	5 ml

4. Endothelial Cell Growth Medium (ECGM)	
ECGM (Promocell, Heidelberg, Deutschland)	500 ml
Penicillin 100 U/ml, Streptomycin 100 ng/ml	5 ml

5. Collagenase A 0,1 g/l	
Collagenase A, 1 g/l (Roche, Mannheim, Deutschland)	
+ PBS- ad 5 ml	
Einfrieren bei -20°C	
Zum Gebrauch: Auftauen und Zugabe von PBS+ ad 50 ml	

6. Trypsin/EDTA:	
Trypsin/EDTA Lösung (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)	

Durchführung:

Isolierung:

Die Durchführung der Versuche wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf genehmigt (Studiennummer 3862). Die für die Isolierung der Nabelschnurendothelzellen benötigten Nabelschnüre wurden von der Frauenklinik des Universitätsklinikums Düsseldorf zur Verfügung gestellt.

Um die Wahrscheinlichkeit einer Kontamination so gering wie möglich zu halten wurden die Nabelschnüre bei 4°C in PBS+ mit Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 ng/ml) aufbewahrt und innerhalb von max. 48h verwendet.

Die nun im Folgenden aufgeführten Tätigkeiten wurden unter möglichst sterilen Bedingungen an der Zellkulturbank unter Beachtung der Hygienevorschriften durchgeführt.

Die Nabelschnüre wurden aus ihren Transportgefäßen entnommen und die Nabelschnurvene an einer Seite mit einer gefäßchirurgischen Knopfkanüle kanüliert. Diese wurde mittels zirkulärer Kompression der Nabelschnur durch einen autoklavierten Kabelbinder in der Nabelschnur fixiert. Über die eingebrachte Kanüle wurde die

Nabelschnurvene mit (je nach Größe der Schnur) ca. 20 ml PBS+ vorsichtig gespült. Daraufhin wurde die Nabelschnurvene an der anderen Seite kanüliert und in entgegengesetzter Richtung gespült. An den Enden der Kanülen wurde nun jeweils ein Dreiwegehahn (Discofix®) befestigt, über den von einer Seite Collagenase A 0,1 g/l zugespritzt wurde, bis der Vorlauf von PBS+ verworfen war. Daraufhin wurde der andere Dreiwegehahn geschlossen und weiter Collagenase A in die Vene der Nabelschnur eingebracht, bis diese prall gefüllt war. Dann wurde der Hahn auf der Seite der Spritze ebenfalls geschlossen, so dass die Collagenase A nicht entweichen konnte. In einem autoklavierten Metallbehälter wurden die Nabelschnüre in diesem Zustand 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

Nach Ablauf der Zeit wurde ein Ende der Nabelschnur mit dem Dreiwegehahn über einem 50 ml Falcon fixiert, beide Hähne geöffnet und so die Collagenase A mit den gelösten Endothelzellen zum Abfließen in das Falcon gebracht. Weiterhin wurde über den zweiten Dreiwegehahn zum Beenden des enzymatischen Verdauens Abstopp-Medium durch die Nabelschnurvene gespritzt, bis das Falcon gefüllt war.

Dieses wurde anschließend bei 4°C und 1100 rpm 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, zum Pellet jeweils 2,5 ml ECGM hinzu gegeben, dieses kurz gevortext und schließlich der Inhalt zweier Falkons in eine 25 cm² Zellkulturflasche (TPP, Trasadingen, Schweiz) gegeben, so dass die Zellisolate zweier Nabelschnurvenen *gepoolt* eine Primärkultur ergaben. Diese wurde im Brutschrank bei 37°C aufbewahrt.

Die Primärkulturen entstanden immer aus mindestens zwei *gepoolten* Zellisolaten, um interindividuelle Unterschiede als Ursache möglicher Ergebnisabweichungen auszuschließen. Alle folgenden Versuche wurden wiederum jeweils mit den aus drei verschiedenen Primärkulturen stammenden Passagen 2 oder 3 durchgeführt.

Kultivierung:

Voraussetzung für die Überführung in die nächst höhere Passage war ein konfluenten Zellrasen. Die Überführung erfolgte dann immer im Verhältnis 1:3. Die Primärkultur wurde in einer 25 cm² Flasche gezüchtet und somit in eine 75 cm² Flasche (Passage 1) überführt. Die Zellen der Passage 2 konnten insgesamt auf der maximal dreifachen Fläche, also auf 225 cm² wachsen. Je nach durchzuführendem Versuch wurden dann für Passage 2 passend 75 cm² Flaschen, 6-, 12-, oder 24-Well Platten (je 50 cm²) zusammengestellt. Sofern in Passage 2 75 cm² Flaschen benutzt wurden konnten diese wiederum wie beschrieben auf je 225 cm² aufgeteilt werden (Passage 3).

Der Wachstumszustand der Zellen wurde täglich kontrolliert und das ECGM erneuert, bis die Zellen zur Konfluenz gewachsen waren.

Bei mikroskopisch feststellbarem konfluenten Zellrasen wurde das Nährmedium verworfen, mit PBS+ gespült, 2 Minuten trypsinisiert und die resultierenden suspendierten Zellen in Abstopp-Medium aufgefangen. Danach wurden die Zellen im Verhältnis 1:3 in Falkons aufgeteilt, zentrifugiert und anschließend in ECGM in die jeweiligen Behältnisse (Flaschen, Platten, je nach Experiment) ausgesät.

Eine Identifizierung der HUVEC erfolgte fluoreszenzmikroskopisch mittels von-Willebrand-Faktor (vWF)-Färbung (Abschnitt 2.2.2) und durch *fluorescence-activated cell sorting* (FACS) von mit vWF gefärbten Zellen. Die FACS Analyse ergab ein zu 92% reines HUVEC-Wachstum in den Passagen 2 und 3.

2.2.2 Von-Willebrand-Faktor-Färbung

Lösungen/Chemikalien:

1. PBS+
2. Paraformaldehyd (3,7 Vol%)
3. Triton-X-100 (0,01%)
4. Schafserum

Antikörper:

Sheep anti-human-vWF polyklonales IgG (Fluorescein-5-Isothiocyanat [FITC]-markiert)	Serotec LTD (Wiesbaden, Deutschland)
--	--------------------------------------

Durchführung:

Für die Identifizierung der Zellen als Endothelzellen erfolgte deren Anfärbung mit polyklonalen Schafs-Antikörpern (IgG), deren Fab-Regionen menschlichen von-Willebrand-Faktor binden und mit Fluorescein-5-Isothiocyanat markiert sind.

Hierfür wurden die Zellen in 24-Well Platten, in deren Wells vorher Deckgläschen gelegt wurden, ausgesät. Waren die Zellen auf den Deckgläschen zur Konfluenz gewachsen, so wurde das Nährmedium abgesaugt und die Wells vorsichtig drei Mal mit PBS+ gewaschen. Dann wurden pro Well 200 µl Paraformaldehyd hinzu gegeben und die Zellen für 10 Minuten bei Raumtemperatur auf diese Weise fixiert. Danach wurden sie wiederum drei Mal mit PBS+ gewaschen und es wurden pro Well für 3 bis 5 Minuten 200 µl Triton-X-100 hinzugefügt, um die Zellen zu permeabilisieren. Dann erfolgte ein weiteres dreimaliges Waschen mit PBS+ und anschließend die Zugabe von 200 µl Schafserum, um unspezifische Bindungsstellen der Schafs-Antikörper zu belegen. Pro Well wurden nun 50 µl des Antikörpers gegen den vWF hinzu gegeben und die Zellen für 30 Minuten im Dunkeln bei 4°C inkubiert. Darauf folgte ein

weiteres Spülen mit PBS+. Dann wurden die Deckgläschen aus den Wells entnommen und mit der Wachstumsseite auf einem Objektträger fixiert.

Die Darstellung der Zellen (Abb. 2.1) erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie (Fluoreszenzmikroskop der Firma Leica-DML, Wetzlar). Wellenlängen: Anregung: 490 nm, Emission: 520 nm. Vergrößerung: 100-fach.

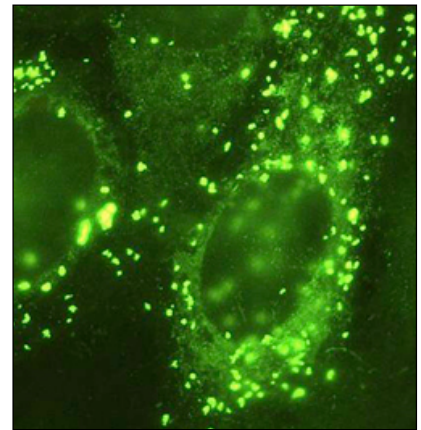


Abb. 2.1: HUVEC von-Willebrand-Faktor-Färbung, Vergrößerung 100-fach

2.2.3 Experimentelles Protokoll

Jede Versuchsreihe (IR-EMSA, RT-PCR und FACS für ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin) wurde drei Mal mit Zellen aus unterschiedlichen Präparationen durchgeführt.

Nachdem die Zellen in 6-Well Platten zur Konfluenz gewachsen waren, wurden sie den jeweiligen Versuchsgruppen zugeführt.

Alle Versuche wurden in einer speziellen Begasungskammer durchgeführt (Abb. 2.2). Diese bot in der Mitte Platz für eine 6-Well Platte oder 8 einzelne Petrischalen, die auf einer Halterung platziert werden konnten. Die jeweiligen Inhalationsanästhetika- bzw. Gas-Gemische wurden von unten über mehrere Öffnungen der Kammer zugeführt und über einen an der Unterseite des luftdicht schließenden

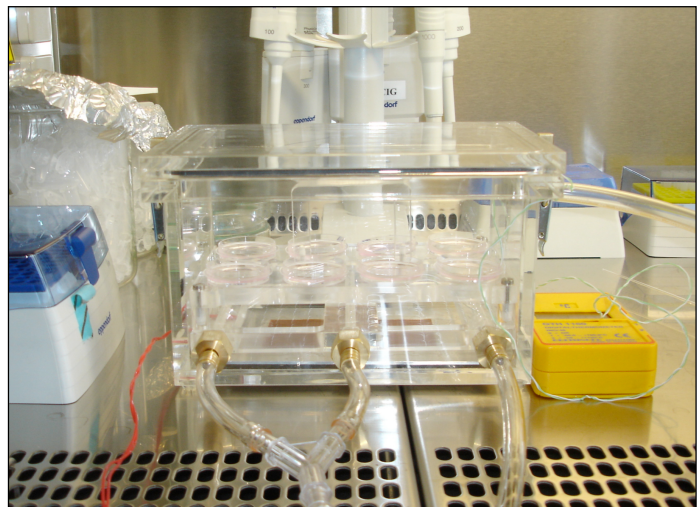


Abb. 2.2: HUVEC-Begasungskammer

Deckels befindlichen Ventilator gleichmäßig verteilt. Die jeweiligen Konzentrationen und Zusammensetzungen wurden mittels eines Gas-Analysators (Capnomatic Ultima; Datex, Helsinki, Finnland) am Auslass der Kammer gemessen. Um immer gleiche Versuchstemperaturen (37°C) gewährleisten zu können, wurde am Boden der Kammer eine Wärmeplatte angebracht, die mit einem Thermometer und einer Temperaturkontrolleinheit verbunden war.

Es wurden vier Versuchsgruppen (Abb. 2.3) gebildet:

1. Kontrolle
2. $\text{TNF}\alpha$
3. Anästhetikum
4. Anästhetikum + $\text{TNF}\alpha$

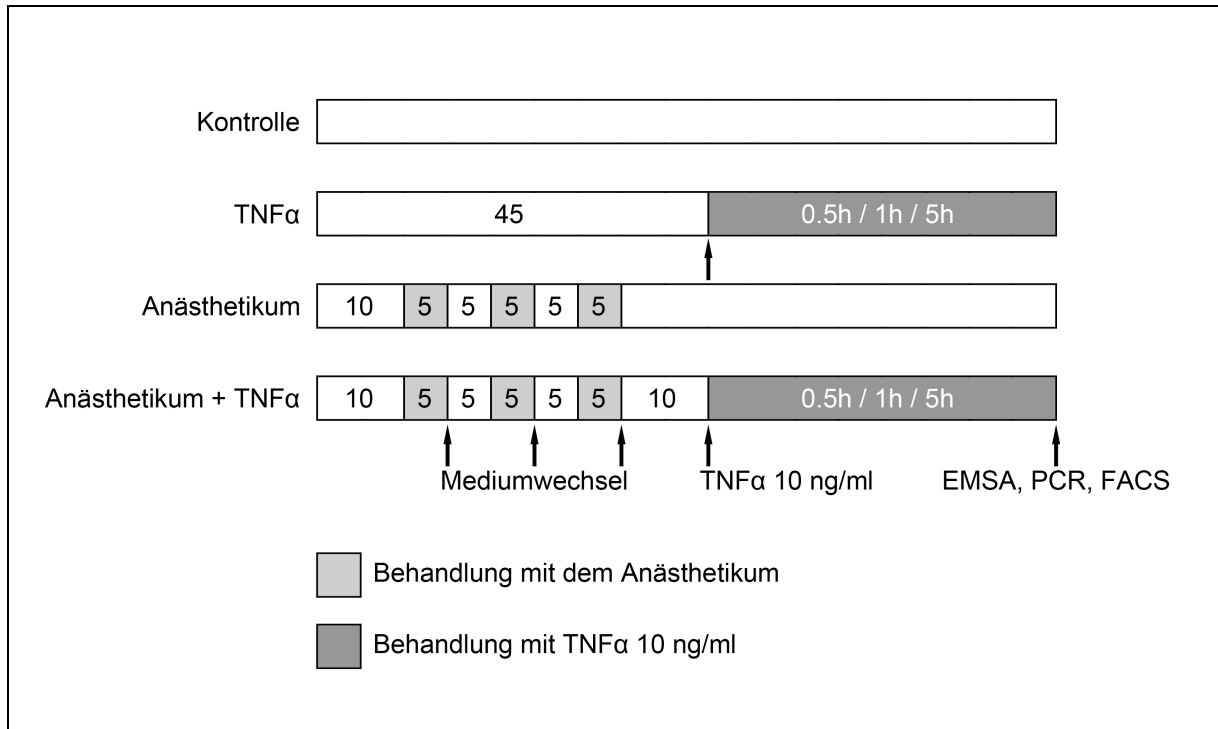


Abb. 2.3: Experimentelles Protokoll. Die Zellen der Kontrollgruppe (Kontrolle) blieben unbehandelt. Die Zellen der Tumor Nekrose faktor α ($\text{TNF}\alpha$)-Gruppe ($\text{TNF}\alpha$) wurden für 0,5, 1, bzw. 5h mit 10ng/ml $\text{TNF}\alpha$ behandelt. Die Zellen der Anästhetikum-Gruppe (Anästhetikum) wurden intermittierend für drei Mal 5 Minuten mit den Anästhetika Xenon, Distickstoffmonoxid (N_2O), Isofluran bzw. mit dem Opiat Morphin behandelt. Die Zellen der Anästhetikum+ $\text{TNF}\alpha$ -Gruppe (Anästhetikum+ $\text{TNF}\alpha$) wurden nach selbiger pharmakologischer Behandlung für 0,5, 1, bzw. 5h mit 10ng/ml $\text{TNF}\alpha$ stimuliert. Am Ende erfolgte die molekularbiologische Aufarbeitung aller Gruppen mittels IR-EMSA (Infrarot elektrophoretischer Mobilitäts-Shift-Assay), RT-PCR (Reverse-Transkription-Polymerase-Ketten-Reaktion bzw. FACS (Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung). Alle Versuche wurden mit den aus drei verschiedenen Primärkulturen stammenden Zellen durchgeführt. Modifiziert nach Weber NC, Kandler J et al.¹²².

Zu 1. Kontrolle:

Die Zellen blieben unbehandelt.

Zu 2. $\text{TNF}\alpha$:

Nach 45 Minuten wurden die Zellen mit 10 ng/ml $\text{TNF}\alpha$ behandelt. Dabei richtete sich die Dauer der Behandlung nach dem zu detektierenden *target*, also Transkriptionsfaktor, RNA oder Protein, da diese zu unterschiedlichen Zeiten expremiert werden:

IR-EMSA: 0,5h $\text{TNF}\alpha$ -Inkubation

RT-PCR: 1,0h $\text{TNF}\alpha$ -Inkubation

FACS: 5,0h $\text{TNF}\alpha$ -Inkubation

Zu 3. Anästhetikum:

Die Zellen wurden nach einer 10 minütigen Vorlaufzeit in der Kammer unter Raumluft intermittierend für drei Mal 5 Minuten mit den jeweiligen Anästhetika bzw. mit dem Opiat Morphin behandelt:

Xenon: 70% Xenon, 25% O₂, 5% N₂

N₂O: 70% N₂O, 25% O₂, 5% CO₂

Morphin: 100 ng/ml Morphin

Isofluran: 0,6% Isofluran, 75% O₂, 24,4% N₂

Um eine tatsächlich intermittierende Behandlung sicherstellen zu können, wurde am Ende der 5 minütigen Behandlungsphasen das Medium jeweils gewechselt.

Zu 4. Anästhetikum + TNF α :

Nach selbiger Vorbehandlung der Zellen wie in der Gruppe „Anästhetikum“, wurde nach einer letzten 10 minütigen Auswaschphase TNF α (10 ng/ml) zugefügt. Hierbei richtete sich die Dauer der Inkubation wiederum nach dem zu detektierenden *target*:

IR-EMSA: 0,5h TNF α -Inkubation

RT-PCR: 1,0h TNF α -Inkubation

FACS: 5,0h TNF α -Inkubation

Um ausschließen zu können, dass weder der Mediumwechsel, noch die unterschiedlichen Sauerstoff-Konzentrationen in den verschiedenen Anästhetika-Gas-Gemischen einen Einfluss auf das Ausmaß der ICAM-1-, VCAM-1- bzw. E-Selektin-Expression hatten, wurden Kontroll-FACS-Messungen durchgeführt. Bei diesen wurden die Zellen drei Mal 5 Minuten mit 25% bzw. 80% Sauerstoff behandelt, während den Auswaschphasen herrschten Raumluftbedingungen. Die weiteren Behandlungsschritte glichen denen der oben erwähnten Versuchsgruppen. Hierbei zeigte sich, dass weder der Mediumwechsel noch die unterschiedlichen Sauerstoff-Konzentrationen einen Einfluss auf die Expression der Adhäsionsmoleküle hatte.

2.2.4 Molekularbiologie

2.2.4.1 Infrarot elektrophoretischer Mobilitäts-Shift-Assay (IR-EMSA)

Diese Methode dient der Untersuchung von Wechselwirkungen von Proteinen mit DNA bzw. Oligonucleotiden¹¹⁴. In diesem Fall soll das Verhalten des Transkriptionsfaktors und somit sequenzspezifischen DNA-bindenden Proteins NF κ B (*nuclear factor kappa B*) als Teil der proinflammatorischen Signalkaskade im Rahmen des oben dargestellten Präkonditionierungsprotokolls untersucht werden.

Beim EMSA wird initial die Kernfraktion isoliert. Durch Zugabe einer mit einem Infrarotfarbstoff markierten Oligonucleotid-Sonde wird NF κ B gebunden, sofern der Transkriptionsfaktor, je nach Inflammationszustand der Zelle, im Zellkern vorliegt. Dann folgt die elektrophoretische Auftrennung der Proben. Die Methode macht sich die Tatsache zu Nutze, dass Protein-DNA-Komplexe im Vergleich zu nicht-proteingebundener DNA in einem nicht denaturierenden Polyacrylamid- (oder Agarose-) Gel eine geringere Mobilität während der elektrophoretischen Auftrennung besitzen. Die Protein-DNA-Komplexe bezeichnet man als *geschiftet* gegenüber ungebundener DNA.

A. Kern-Extraktion

Lösungen/Chemikalien:

1. PBS+	
NaCl	8,00 g
KCl	0,20 g
Na ₂ HPO ₄	1,15 g
KH ₂ PO ₄	0,20 g
+ Aqua dest. ad 1000 ml	
Autoklavieren der Lösung	
Zugabe von:	
MgCl ₂	0,10 g
CaCl ₂	0,10 g
Sterile Filtration in ein autoklaviertes Behältnis	

2. BUFFER I (Membran-Lyse)	
HEPES 1M, pH 8,0	1,00 ml
MgCl ₂ 1M	0,15 ml
KCl 1M	1,00 ml
DTT 1M	0,10 ml
+ Aqua dest. ad 100 ml	
Sterile Filtration in ein autoklaviertes Behältnis	
Zugabe von Protease Inhibitor (1000:1)	
Lagerung bei 4°C	

3. BUFFER II (Kernhüllen-Lyse)	
HEPES 1M, pH 8;0	2,00 ml
MgCl ₂ 1M	0,15 ml
Glycerol	25,00 ml
NaCl 1M	42,00 ml
EDTA 0,5M	0,04 ml
DTT 1M	0,10 ml
+ Aqua dest. Ad 100 ml	
Sterile Filtration in ein autoklaviertes Behältnis	
Zugabe von Protease Inhibitor (1000:1)	
Lagerung bei 4°C	

4. NP 40 (10%)	Sigma-Aldrich
----------------	---------------

Durchführung:

In Anlehnung an die Methode von Schreiber et al.¹¹⁵ wurde die Kernfraktion, wie im Folgenden beschrieben, gewonnen.

Alle Schritte wurden auf Eis, mit gekühlten Lösungen und Materialien durchgeführt, um die Proteasen-Aktivität so gering wie möglich zu halten.

Als erstes wurde das Nährmedium aus den 6-Well Platten abgesaugt und die Zellen drei Mal mit kaltem PBS+ gewaschen. Dann wurden pro Well jeweils 1 ml PBS+ hinzugefügt, die Zellen mit einem Schaber vorsichtig vom Boden gelöst und in 1,5 ml Röhrchen gefüllt. Diese wurden 5 Minuten bei 4°C mit 500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und für 15 Minuten mit 1 ml BUFFER I auf Eis inkubiert, um die Zellen anschwellen zu lassen. Dann wurden 100 µl NP40 zugefügt, die Zellen 10 Sekunden gevortext und daraufhin bei 12.000g 2-3 Minuten zentrifugiert. Der Überstand (die zytoplasmatische Fraktion) wurde vorsichtig dekantiert und es wurden 175 µl kalter BUFFER II zum Pellet zugefügt. Es folgten 30 Sekunden Vortexen und 30 Minuten starkes Schütteln bei 4°C. Dann wurde 15 Minuten bei 4°C und 12.000g zentrifugiert, der Überstand in gekühlte Röhrchen überführt und die Proben entweder sofort verwendet, oder bei -80°C gelagert. Es folgte die Proteinbestimmung nach Lowry.

B. Proteinbestimmung nach Lowry

In Anlehnung an die Methode nach Lowry¹¹⁶ wurde eine Bestimmung der in den verschiedenen Proben enthaltenen Proteinmenge durchgeführt. Basierend auf diesen Ergebnissen konnten dann die einzelnen Proben in Bezug auf ihre Proteinmenge durch Verdünnung aneinander angeglichen werden.

Lösungen/Chemikalien:

1. Reagenz A	
Aqua dest.	500 ml
NaOH	2,00 g
Na ₂ CO ₃	10,00 g

2. Reagenz B	
KNa-Tartrat	2,00 g
+ Aqua dest. ad 100 ml	

3. Reagenz C	
CuSO ₄ x 5H ₂ O	1,00 g
+ Aqua dest. ad 100 ml	

4. Lowry Reagenz	
Vor der Bestimmung frisch herzustellen. Für jede Probe und jeden der sieben Standards (Eichreihe) werden 500 µl Lowry Reagenz benötigt. Die dann hergestellte Menge setzt sich aus Reagenz A, B und C zusammen, und zwar im Verhältnis 100:1:1.	

5. BSA	
Bovines Serum Albumin	100 µg/ml

Durchführung:

3 µl der Probenlösung wurden mit 197 µl destilliertem Wasser verdünnt (1:67). Von dieser verdünnten Probe wurden 100 µl mit 500 µl Lowry-Reagenz versetzt und dann für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden jeweils 50 µl Folin-Chiocalteus-Phenolreagenz (Sigma, Taufkirchen) zugegeben, das zuvor frisch 1:1 mit destilliertem Wasser verdünnt wurde. Das Gemisch wurde gut gevortext und dann für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Durch eine Reaktion der Proteine mit der alkalischen Kupferlösung und die folgende Reduktion des Folin-Chiocalteus-Phenolreagenz durch den Protein-Kupfer-Komplex kommt es zu einer Farbkomplexbildung. Diese ist proportional zu der enthaltenen Proteinmenge und lässt sich durch die Extinktionsmessung bei 740 nm mit einem Plate Reader (µQuant, BioTek Instruments, Winooski, Vermont, USA) quantifizieren. Die Berechnung der Konzentration

wurde mit der KC4 Software durch Bezugnahme auf eine jeweils parallel vermessene Eichreihe (0-100 µg/ml BSA) durchgeführt. Jede Proteinbestimmung wurde als Doppelbestimmung angesetzt. Nach der Proteinmengenbestimmung wurden die Proben mit destilliertem Wasser auf eine einheitliche Proteinkonzentration eingestellt.

C. Gel-Präparation

Lösungen/Chemikalien:

Nicht denaturierendes Polyacrylamid-Gel 6% (Mengenangaben für 2 Gele)	
Polyacrylamid 40%	3,75 ml
Sigma 1M, pH 7,5	1,00 ml
Glycin 1M	3,80 ml
EDTA 0,5M	80,00 µl
Wasser	11,75 ml
APS 10%	0,10 ml
TEMED	15,00 µl

Durchführung:

Alle Substanzen wurden gemischt und in den Gelkammern (Dicke der Glasplatten 1 mm, Abstand zwischen den Glasplatten und somit Gel-Dicke 0,75 mm) 1 bis 2 Stunden zur Polymerisation aufbewahrt.

D. Bindungs-Reaktion

Lösungen/Chemikalien:

1. Binding Buffer 10x	
Tris-HCl 100 mM	1,576 g
KCl 500 mM	3,727 g
Dithiothreitol (DTT) 10 mM	0,154 g
+ Aqua dest. ad 100 ml	
Lagerung bei 8°C	

2. RNase-freies Wasser

3. DTT (25 mM)/Tween-20 (2,5%)	
Dithiothreitol (DTT) 100 mM	10,00 µl
Autoklaviertes Wasser	30,00 µl
Tween-20 2,5%	1,00 µl

4. NFκB Oligo IR dye	
22-mer Doppelstrang-Oligonucleotid-Sonde, NFκB-bindend, IRDye 700 markiert	Licor Biosciences GmbH (Bad Homburg, Deutschland)

Durchführung:

Alle Proben wurden ausschließlich auf Eis gelagert. Es wurden 1 µl Binding Buffer 10x, 4 µl RNase-freies Wasser, 1 µl DTT/Tween und 2 µl der nach der Lowry-Proteinmengenbestimmung eingestellten Probe des Kernextrakts (5 µg) gemischt. Anschließend wurde jeder Probe 1 µl der 22-mer Doppelstrang-Oligonucleotid-Sonde (Licor Biosciences, Bad Homburg, Germany) zugefügt, die eine übereinstimmende Bindungssequenz für NFκB (5'-AGT-TGA-GGG-GAC-TTT-CCC-AGG-C-3') besitzt und die am 5'-Ende mit einem Infrarotfarbstoff (IRDye 700) markiert ist. Das Gemisch inkubierte für 20 Minuten im Dunklen bei Raumtemperatur.

Es folgte die elektrophoretische Auftrennung der Oligonucleotid-NFκB-Komplexe.

E. Elektrophorese**Lösungen/Chemikalien:**

1. 1x TBE Puffer (=10x TBE Puffer, 1:10 verdünnt mit autoklaviertem Aqua dest.)	
10x TBE Puffer (s.u.)	100 ml
Autoklaviertes Aqua dest.	900 ml

2. 10x TBE Puffer	
Sigma 7-9	107,80 g
Na-EDTA	7,44 g
Borsäure, pH 8,3	55,00 g
+ autoklaviertes Aqua dest. ad 1000 ml	

3. 10x Orange G loading dye	(LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg)
-----------------------------	--

Durchführung:

Nach der 20 minütigen Inkubation mit der NFκB Oligo IR dye wurde den Proben je 1 µl 10x Orange G loading dye zugefügt. Nach Beladen der Gelkammern lief die Elektrophorese für 45 Minuten bei 80V in 1x TBE Buffer. Es folgten die Visualisierung und Quantifizierung des Shifts.

F. Odyssey® Imaging

Die Gele wurden in den Gel-Kammern auf den Odyssey IR Imager® (LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg, Deutschland) aufgebracht. Die Einstellungen des Scanvorgangs wurden so gewählt, dass der Fokus in der Mitte des Geles lag (*focus offset: 0,9 mm, intensity setting: 6 or 7 for channel 700, preset: protein gel, resolution: 84, quality: medium*). Die Quantifizierung erfolgte durch Messung der mittleren Lichtintensität (*average light intensity [AVI]*) der geshifteten NFκB-Banden.

2.2.4.2 Reverse-Transkription-Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR)

Um das Ausmaß der Gen-Expression der zellulären Adhäsionsmoleküle (CAMs) im Rahmen unseres Versuchsprotokolles auf transkriptioneller Ebene in Form von gebildeter *messenger-RNA* (mRNA) darstellen zu können, wählten wir die semiquantitative *one-step* Reverse-Transkription-Polymerase-Ketten-Reaktion. Hierbei untersuchten wir die Expression der jeweiligen CAM-spezifischen Gene bezogen auf die Expression des *housekeeping-Genes* Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), das somit als Referenzgen und interner Standard fungierte.

Jede RT-PCR teilt sich in folgende Einzelschritte:

- Isolierung der RNA aus HUVEC
- Bestimmung des RNA-Gehaltes
- Beurteilung der RNA-Qualität mittels Elektrophorese
- *One-step* RT-PCR
- Elektrophorese der PCR-Produkte und semiquantitative Auswertung

Allgemeines zur PCR, RT-PCR und One-step RT-PCR:

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist es möglich, definierte DNA-Abschnitte sequenzspezifisch zu vervielfachen und zu analysieren¹¹⁷. Dabei besteht jeder PCR-Zyklus aus drei Schritten:

1. Denaturierung / *melting*:

Durch eine Temperaturerhöhung auf ca. 95°C wird der DNA-Doppelstrang getrennt, das heißt die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Basenpaaren werden gelöst, so dass die DNA in zwei Einzelsträngen vorliegt.

2. Primerhybridisierung / *annealing*:

Bei einer niedrigeren Temperatur (ca. 50-65°C) erfolgt das Anlagern von Oligonukleotidprimern (*sense* und *antisense*). Diese sequenzspezifischen Oligonukleotide begrenzen den gewünschten DNA-Abschnitt, indem sie sich gegenläufig an jeweils komplementäre DNA-Abschnitte anlagern.

3. Elongation / *extension*:

Bei ca. 72-75°C erfolgt durch eine DNA-abhängige DNA-Polymerase in 5'-3'-Richtung die Synthese bzw. Verlängerung der jeweiligen Gegenstränge. Wir verwendeten das *one-step RT-PCR kit* der Firma QIAGEN®, bei dem die HotStarTaq DNA Polymerase die DNA-Synthese durchführt. Es handelt sich um eine modifizierte Form der rekombinanten 94-kDa-DNA-Polymerase (Desoxynukleosid-Triphosphat: DNA-Desoxynukleotidyltransferase, EC 2.7.7.7), die ursprünglich aus *Thermus aquaticus* isoliert wurde und in *E. coli* expremiert wird.

Viele Protokolle durchlaufen ca. 30 Zyklen. Ziel ist es hierbei durch eine Verdopplung der vorhandenen DNA-Moleküle pro Zyklus eine hohe Anzahl an Ziel-Molekülen zu erzeugen. Diese werden anschließend mittels Agarosegelelektrophorese oder weiteren Techniken analysiert und ausgewertet.

Liegt als Ausgangsmaterial für die PCR nicht DNA, sondern wie in unserem Fall RNA, genauer mRNA vor, so ist, da RNA nicht amplifiziert werden kann, als Schritt vor der PCR eine Umsetzung der RNA in DNA (=reverse Transkription) erforderlich. Dies geschieht durch eine virale reverse Transkriptase (=RNA-abhängige DNA-Polymerase). Wir verwendeten das *one-step RT-PCR kit* der Firma QIAGEN®, bei dem die *omniscrypt reverse transcriptase* und *sensiscrypt reverse transcriptase* eingesetzt werden. Dabei handelt es sich um rekombinante, heterodimere Enzyme, die in *E. coli* expremiert werden (QIAGEN® *one-step RT-PCR* Handbuch). Die reversen Transkriptasen synthetisieren zur vorliegenden RNA einen komplementären DNA-Einzelstrang (=copy-DNA / cDNA). Dieser dient dann als *template* / Matrize für die anschließende Amplifikation.

Zur Bindung am Poly-A-Schwanz am 3'-Ende der mRNA benötigen die reversen Transkriptasen Primer. Hier werden häufig Oligo-dT(Desoxythymidin)-Nukleotide verwendet. Sofern diese eingesetzt werden, schließt sich ein zweiter Schritt an, in dem der Gen-spezifische Primer zugefügt wird und somit gewährleistet werden soll, dass nur der gewünschte DNA-Abschnitt amplifiziert wird. Um dabei eventuell auftretende Kontaminationen zu minimieren, gibt es die Möglichkeit der *one-step RT-PCR*. Dabei wird direkt ein Gen-spezifischer Primer verwendet, so dass beide Reaktionen im selben Gefäß durchgeführt werden können.

A. Isolierung der RNA aus HUVEC

Zur RNA-Isolierung verwendeten wir das *RNeasy® fibrous tissue mini kit* (QIAGEN®) und orientierten uns am *RNeasy® mini Protokoll* für die Isolierung von Gesamt-RNA aus tierischen Zellen, *spin-Protokoll* (*RNeasy® Mini* Handbuch, QIAGEN®, April 2002). Alle Arbeitsschritte wurden in einer RNase-freien Arbeitskammer mit RNase-freien Materialien durchgeführt. Die so erhaltene RNA wurde entweder direkt weiter verarbeitet oder bei -80°C eingefroren.

B. Bestimmung des RNA-Gehaltes und der RNA-Reinheit

Bevor die isolierte RNA zur eigentlichen RT-PCR verwendet werden kann, musste der RNA-Gehalt der verschiedenen Proben bestimmt werden, so dass standardisiert immer eine Menge von 1 µg RNA zur RT-PCR verwendet werden konnte.

Physikalische Grundlagen

Die RNA-Konzentration bzw. der gesamte RNA-Gehalt einer Probe lässt sich, basierend auf dem Lambert-Beer'schen Gesetz (Abb. 2.4), photometrisch bestimmen.

Wird ein Lichtstrahl in eine Probelösung eingestrahlt, so wird er dabei von der in der Probe enthaltenen Substanz mindestens teilweise absorbiert. Das Lambert-Beer'schen Gesetz besagt, dass die Extinktion (E) bei einer bestimmten Wellenlänge (λ) dem Logarithmus aus dem Verhältnis von Intensität des eingestrahltten Lichtes (I_0) und Intensität des abgeschwächten Lichtstrahls (I) entspricht, was wiederum dem Produkt

$$E_{\lambda} = \log \left(\frac{I_0}{I} \right) = d \times c \times \epsilon$$

E = Extinktion
 λ = Wellenlänge
 I_0 = Intensität des eingestrahltten Lichtes
 I = Intensität des abgeschwächten Lichtstrahls
 d = Schichtdicke
 c = Stoffkonzentration
 ϵ = Extinktionskoeffizient

Abb. 2.4: Lambert-Beer'sches Gesetz

aus der Schichtdicke des Behältnisses (d), der Stoffkonzentration (c) und dem molaren Extinktionskoeffizient (ϵ) entspricht, der für die physikalischen Eigenschaften des jeweiligen Stoffes eingeführt wurde, da ein Stoff je nach Molekülstruktur mehr oder weniger Licht einer bestimmten Wellenlänge absorbiert.

Kennt man ϵ und hält man die Schichtdicke konstant, so kann man aus der Absorption die Konzentration errechnen. Ist das Volumen bekannt, so ergibt sich daraus die absolute Stoffmenge.

Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration

Wird die Extinktion einer Probe von Nukleinsäuren bei 260 nm Wellenlänge und einer Schichtdicke von 1 cm gemessen, so kann man unter Kenntnis der unten aufgeführten Äquivalenzwerte die Konzentration der Nukleinsäuren errechnen. Dieses Verhältnis ist nur bei neutralem pH gültig.

Der eigentlich physikalische Begriff der „optischen Dichte“ (OD) wird in diesem Fall als Stoffmengeneinheit für Nukleinsäuren gebraucht.

1 OD ₂₆₀	
ds-DNA	≈ 50 µg/ml
ss-DNA	≈ 33 µg/ml
ss-RNA	≈ 40 µg/ml
Oligonukleotide	20-30 µg/ml

Tabelle 2.1: Optische Dichte der verschiedenen Nukleinsäuren

Lese-Beispiel: Eine Lösung, die einzelsträngige RNA enthält und bei einer Wellenlänge von 260 nm einen Absorptionswert (optische Dichte, OD) von 1,0 zeigt, hat eine ss-RNA-Konzentration von $\approx 40 \mu\text{g pro ml}$.

Üblicherweise wird die Extinktion von einer verdünnten Probe RNA bei 260 nm und in RNase-freien Quartz-Küvetten gemessen. Um Signifikanz gewährleisten zu können sollte der gemessene Wert zwischen 0,15 und 1,0 liegen. Dieser Wert (OD_{260}) wird mit dem Verdünnungsfaktor und bei ss-RNA mit $40 \mu\text{g/ml}$ multipliziert, wodurch man die RNA-Konzentration erhält:

$$\text{RNA-Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260} \times 40 [\mu\text{g/ml}] \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Durch Bezugnahme auf das Messvolumen erhält man die absolute Menge RNA.

Photometrische Bestimmung der RNA-Reinheit:

Um den Reinheitsgrad der RNA zu bestimmen, wird von der Probe die Extinktion bei 260 und 280 nm gemessen und die Ergebnisse zueinander ins Verhältnis gesetzt (A_{260}/A_{280}). Bei 260 nm haben die Basen der Nukleinsäuren, bei 280 nm die aromatischen Seitenketten der Aminosäuren von Proteinen ihre Absorptionsmaxima. Bei einer sauberen RNA-Präparation sollte dieser Quotient bei etwa 1,8 bis 2,0 liegen¹¹⁸. Sollten Kontaminationen mit Proteinen oder Phenolen vorliegen, so findet man deutlich niedrigere Werte.

C. Beurteilung der RNA-Qualität mittels Elektrophorese

Um sicherzustellen, dass im Rahmen der RNA-Isolierung intakte RNA gewonnen wurde, führten wir die übliche Qualitäts-Kontrolle mittels gelelektrophoretischer Auftrennung der RNA-Moleküle nach ihrer Größe in einem denaturierenden Formaldehyd-Gel und anschließender Detektion der hierbei entstandenen Banden mittels Ethidiumbromidfärbung durch.

Allgemeines zur Elektrophorese von Nukleinsäuren

Die Elektrophorese ist ein etabliertes biochemisches Trennverfahren, bei dem die Tatsache genutzt wird, dass geladene Moleküle in einem elektrischen Feld wandern. Als Matrix, in der die Moleküle aufgetrennt werden, dienen üblicherweise Agarose- oder Polyacrylamid-Gele, die elektrisch neutral sind.

Zur Auftrennung von Nukleinsäuren (DNA, RNA) werden üblicherweise Agarosegele verwendet. Diese besitzen je nach Agarosekonzentration unterschiedlich große Poren, wobei

die Porengröße mit steigender Agarosekonzentration abnimmt. Diese Porenstruktur bewirkt eine größenabhängige Verzögerung der Molekülwanderung im elektrischen Feld.

Wanderungsverhalten der Moleküle

Laufrichtung:

Die Laufrichtung wird durch die Ladung der Moleküle bestimmt, die bei dem pH-Wert des verwendeten Puffers vorliegt. Nukleinsäuren sind aufgrund ihres Phosphat-Desoxyribose-Rückgrats innerhalb eines breiten pH-Bereichs negativ geladen. Daher wandern sie bei der Elektrophorese zur Anode.

Wanderungsgeschwindigkeit:

Die Wanderungsgeschwindigkeit hängt bei den negativ geladenen Molekülen bei konstanter elektrischer Spannung, Temperatur und Konzentration des verwendeten Geles von 2 Faktoren ab:

1. Größe:

- Wanderungsgeschwindigkeit umgekehrt proportional zur Größe

2. Konformation:

- Lineare DNA-Moleküle: Konformation hat keinen Einfluss auf die Wanderungsgeschwindigkeit, Wanderungsgeschwindigkeit entsprechend der Größe
- Zirkuläre DNA-Moleküle: 1. Relaxiert: langsamer wandernde Form. 2. Superspiralisiert: schneller wandernde Form.
- RNA-Moleküle: Neigen zur Sekundärstrukturbildung, was Einfluss auf das Wanderungsverhalten der Moleküle hat. Um die Ausbildung von Sekundärstrukturen zu verhindern, wird der Elektrophorese Formaldehyd zugefügt.

Detektion

Zur Größenbestimmung der aufgetrennten Proben wird eine Größenreferenz benötigt. Hierzu dient ein Marker, der definierte Fragmentlängen besitzt und der mit den Proben gemeinsam aufgetragen und aufgetrennt wird.

Die Detektion erfolgt durch Zugabe von Ethidiumbromid. Die in den Nukleinsäuren interkalierten Ethidiumbromidmoleküle werden durch ultraviolettes Licht zur Fluoreszenz angeregt und so nachgewiesen. Ethidiumbromid-RNA-Komplexe zeigen im UV-Licht (254-366 nm Wellenlänge) eine erhöhte Fluoreszenz gegenüber dem unkomplexierten Farbstoff, so dass die der Größe nach aufgetrennten RNA-Banden sichtbar werden. Bei intakter RNA kommen die rRNA-Banden scharf zur Darstellung und die 28S rRNA-Bande weist eine etwa doppelt so hohe Intensität auf wie die 18S rRNA. Zeigen die rRNA-Banden einer Bahn Unschärfe und Schlieren in Richtung kleinerer rRNA-Banden, so ist von einer Schädigung der RNA während der Isolierung auszugehen. Da die 28S rRNA labiler ist als die 18S rRNA,

sprechen gleiche Intensitäten der beiden Banden ebenfalls für eine Schädigung (RNA-Info, QIAGEN®).

Lösungen/Chemikalien:

1. 10x FA Gel-Puffer (pH 7)	
200 mM 3-MOPS (free acid)	41,85 g
50 mM Sodium Acetat	4,102 g
10 mM EDTA	2,92 g
RNase-freies Wasser	1000 ml

2. Formaldehydhaltiges Agarose-Gel (1,2%)	
Agarose	1,2 g
10x FA Gel-Puffer	10 ml
DEPC Wasser	90 ml
Ethidiumbromid (5 mg/ml)	2 µl
Formaldehyd (37%)	1,8 ml

3. Loading Buffer	
Hinf loading dye (Promega)	1 ml
Formaldehyd (37%)	72 µl

4. 1x FA Gel running Buffer	
10x FA Gel-Puffer	100 ml
Formaldehyd (37%)	20 ml
RNase-freies Wasser	880 ml

Durchführung:

Als erster Schritt wurde das Agarose-Gel gegossen. Hierfür wurden 1,2 g Agarose mit 10 ml 10x FA Gel-Puffer und 90 ml DEPC-Wasser gemischt und für 2 Minuten bei 600 Watt in die Mikrowelle gegeben. Nachdem dieses Gemisch abgekühlt war (optimalerweise auf circa 65-70°C um ein Verdunsten des Formaldehyds zu verhindern), wurden 1,8 ml Formaldehyd (37%) und 2 µl Ethidiumbromid hinzugefügt. Daraufhin wurde das Gemisch in die vorbereiteten Gelkammern gefüllt, eventuell vorhandene Luftblasen entfernt und das Gel für circa eine Stunde zum Härten ruhen gelassen.

Es folgte die Vorbereitung der zu verwendenden Proben und des RNA-Größen-Markers. Für die folgende Elektrophorese wurden die RNA-Proben, basierend auf der OD-Bestimmung, so eingestellt, dass 5 µg RNA gelöst in 10 µl RNase-freiem Wasser enthalten waren. Diese Proben wurden mit 2,5 µl Loading Buffer gemischt. Von dem RNA-Marker wurden 2 µl mit 19 µl Loading Buffer gemischt. Alle Proben wurden anschließend 5 Minuten bei 65°C im Heizblock erhitzt.

Zur Elektrophorese wurde das gehärtete Gel in die Elektrophoresekammer eingesetzt und bis zur Bedeckung des Gels 1x FA Gel running Buffer hinzugegeben, der Marker und die Proben in die Geltaschen eingefüllt und für 2 Stunden 60 Volt Spannung angelegt.

Abschließend erfolgte mit einer Kodak Image Station® (Eastman Kodak Comp., Rochester, NY, USA) die Visualisierung durch UV-Licht.

D. One-step RT-PCR

Zur One-step RT-PCR verwendeten wir das *one-step reverse-transcription polymerase chain reaction kit* der Firma QIAGEN® (Hilden, Deutschland) und genspezifische Primer der Firma MWG-Biotech AG. Bei der Durchführung orientierten wir uns an dem *one-step RT-PCR kit* Handbuch (QIAGEN®) und in der Literatur vorbeschriebenen Rahmenbedingungen¹¹⁹. Alle Arbeitsschritte wurden in einer RNase-freien Arbeitskammer mit RNase-freien Materialien durchgeführt.

Lösungen/Chemikalien:

PCR-Mastermix (pro Probe mit je 1 µg RNA/10 µl)		
Substanz	Menge	Endkonzentration in der Reaktion
RNase-freies Wasser	20 µl	-
dNTP Mix (10 mM) Jeweils 10 mM an dATP, dCTP, dGTP und dTTP	2 µl	400 µM
5x QIAGEN® One-step RT-PCR Puffer 5x konzentriert; enthält Tris-Cl, KCl, (NH₄)₂SO₄, 12,5 mM MgCl₂, DTT; pH 8,7 (20°C)	10 µl	1x
QIAGEN® One-step RT-PCR Enzym Mix Omniscript Reverse Transcriptase, Sensiscript Reverse Transcriptase und HotStarTaq DNA Polymerase, in Lagerungspuffer: 20 mM Tris-Cl, 100 mM KCl, 1 mM Dithiothreitol (DTT), 0,1 mM EDTA, 0,5 % (v/v) Nonidet® P-40, 0,5 % (v/v) Tween® 20, 50 % (v/v) Glycerol, Stabilisator; pH 9,0 (20°C)	2 µl	-
Primer A (Oligo sense)	3 µl	0,6 µM
Primer B (Oligo antisense)	3 µl	0,6 µM
Summe	40 µl	-

Primer:

ICAM-1 (MWG-Biotech AG)	
Sense	5'-TAT-GGC-AAC-GAC-TCC-TTC-T-3'
Antisense	5'-CAT-TCA-GCG-TCA-CCT-TGG-3'
Konditionen: 30 Min., 50°C (1 Min. 94°C, 1 Min. 55°C, 1 Min. 72°C), 30 Zyklen	

VCAM-1 (MWG-Biotech AG)	
Sense	5'-ATG-ACA-TGC-TTG-AGC-CAG-G-3'
Antisense	5'-GTG-TCT-CCT-TCT-TTG-ACA-CT-3'
Konditionen: 30 Min., 50°C (1 Min. 94°C, 1 Min. 55°C, 1 Min. 72°C), 30 Zyklen	

E-Selectin (MWG-Biotech AG)	
Sense	5'-CTC-TGA-CAG-AAG-AAG-CCA-A-3'
Antisense	5'-ACT-TGA-GTC-CAG-TGA-AGC-CA-3'
Konditionen: 30 Min., 50°C (1 Min. 94°C, 1 Min. 55°C, 1 Min. 72°C), 30 Zyklen	

GAPDH (MWG-Biotech AG)	
Sense	5'-TCA-CTC-AAG-ATT-GTC-AGC-AA-3'
Antisense	5'-AGA-TCC-ACG-ACG-GAC-ACA-TT-3'
Konditionen: 30 Min., 50°C (24 Sek. 93°C, 30 Sek. 55°C, 1 Min. 73°C), 30 Zyklen	

Durchführung:

Für die folgende RT-PCR wurden die RNA-Proben, basierend auf der OD-Bestimmung, so eingestellt, dass 1 µg RNA gelöst in 10 µl RNase-freiem Wasser enthalten war. Die Proben mit der Template-RNA wurden auf Eis gelagert und jeweils mit den 40 µl des PCR-Mastermix versetzt. Der Thermocycler wurde auf 50°C vorgeheizt.

Es folgte das PCR-Programm am Thermocycler. Folgende Programmeinstellungen wurden verwendet:

Vorgang			Dauer	Temperatur
Reverse Transkription			30 Min.	50°C
Initiale Aktivierung der HotStarTaq DNA Polymerase Inaktivierung der reversen Transkriptasen			15 Min.	95°C
Denaturierung	ICAM-1	30 Zyklen	1 Min.	94°C
Annealing	VCAM-1		1 Min.	55°C
Extension	E-Selektin		1 Min.	72°C
Denaturierung	GAPDH	30 Zyklen	24 Sek.	93°C
Annealing			30 Sek.	55°C
Extension			1 Min.	73°C

Tabelle 2.2: Programmeinstellungen der *one-step RT-PCR*

Am Programmende erfolgte die Kühlung auf 4°C. Die Proben wurden daraufhin direkt weiter verarbeitet oder bei -20°C eingefroren.

E. Elektrophorese und semiquantitative Auswertung

Die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in einem 2,5 prozentigen Agarosegel, gefolgt von der Ethidiumbromidfärbung und der densitometrischen Analyse.

Um anschließend quantitative Aussagen über die Expression der CAM im Rahmen der Versuchsreihen treffen zu können, ist es notwendig, dass die Zielsequenzen der untersuchten Proben mit einer bekannten RNA-Menge, die als standardisierter Referenzwert dient, abgeglichen wird. Hierfür kann ein konstant vorhandener genetischer Faktor, z. B. die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet werden. In diesem Fall spricht man von einer differentiellen RT-PCR, welche wir verwendeten.

Lösungen/Chemikalien:

1. 10x TAE Puffer		
Sigma 7-9 (0,04 M)		48,4 g
EDTA Na-Salz (0,001 M)		4,16 g
Eisessig		11,42 ml
Wasser ad 1000 ml		
Autoklavieren		
2. 1x TAE Puffer		
10x TAE Puffer		200 ml
DEPC Wasser		1800 ml
3. Agarosegel (2,5%)		
Agarose		5 g
1x TAE Puffer		200 ml
Ethidiumbromid		10 µl
4. Blue/orange loading dye, 6x		Promega
5. 174 DNA/Hinf I Marker		Promega
Typical Number of Lanes: 50, Range (bp): 24–726, Number of Bands: 20		

Durchführung:

Für die Herstellung des Gels wurden 5 g Agarose und 200 ml 1x TAE Puffer gemischt, für 3 Minuten bei 600 Watt in die Mikrowelle gegeben und anschließend mit 10 µl Ethidiumbromid versetzt. Dieses Gemisch wurde in die Gelkammer gefüllt, eventuell vorhandene Luftblasen wurden entfernt und das Gel zum Aushärten ruhen gelassen.

Von den PCR-Produkten wurden 15 µl mit 5 µl blue/orange loading dye, von dem 174 DNA/Hinf I Marker 1 µl mit 19 µl blue/orange loading dye gemischt.

Zur Elektrophorese wurde das gehärtete Gel in die Elektrophoresekammer eingesetzt, bis zur Bedeckung des Gels 1x TAE Puffer hinzugegeben, der Marker und die Proben in die Geltaschen eingefüllt und für 3 Stunden 80 Volt Spannung angelegt.

Die mit Ethidiumbromid gefärbten Banden wurden mit einer Kodak Image Station® (Eastman Kodak Comp., Rochester, NY, USA) durch UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert. Die Länge der DNA-Fragmente wurde mit Hilfe des parallel aufgetrennten DNA-Längenstandards (174 DNA/Hinf I Marker, *typical number of lanes*: 50, *range* [bp]: 24–726, *number of bands*: 20, Promega, Mannheim, Deutschland) bestimmt. Zur Berechnung der relativen mRNA-Menge wurde die Fluoreszenz- bzw. mittlere Lichtintensität (*average light intensity* [AVI]) der jeweiligen CAM-Bande ins Verhältnis zur Fluoreszenz- bzw. mittleren Lichtintensität (*average light intensity* [AVI]) der GAPDH-Bande gesetzt. Dieser Vorgang erfolgte durch densitometrische Auswertung der Banden mit der Software der Kodak Image Station®.

2.2.4.3 Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS)

Zur Darstellung der zellulären Oberflächenexpression der Adhäsionsmoleküle im Rahmen unseres Präkonditionierungsprotokolls wählten wir die Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (*fluorescence activated cell sorting*, FACS) als durchflusszytometrisches Verfahren.

Allgemeines zum FACS

Beim FACS handelt es sich um eine durchflusszytometrische Methode mit der die gleichzeitige Bestimmung verschiedener Parameter (Größe, Granularität und Präsenz von Zellmarkern) bei jeder einzelnen Zelle in einer Zellpopulation möglich ist^{120,121} (Abb. 2.5). Die Zellen werden dafür in einem laminaren Probenstrom durch die sogenannte hydrodynamische Fokussierung einzeln an einem Laser vorbeigeleitet und aufgrund ihrer Lichtstreuung sowie, sofern mit Fluoreszenzfarbstoffen (Fluorochromen) markiert, ihrer Fluoreszenz analysiert. Das Licht, das bei dem Durchtritt der Zellen durch den Laserstrahl in einem Winkel von 3 bis 10 Grad abgelenkt wird, bezeichnet man als Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC). FSC gilt als Maß für die Zellgröße. Das Licht, das bei dem Durchtritt der Zellen durch den Laserstrahl rechtwinklig reflektiert wird, nennt man Seitwärtsstreulicht (*sideward scatter*, SSC). SSC lässt Rückschlüsse über das Ausmaß der Granularität der Zellen zu. Zur Analyse an der Zelloberfläche oder auch im Zytosol befindlicher Strukturen bedient man sich der Anwendung von Fluorochromen. Je nach verwendetem Fluorochrom kann entweder das gesamte Zytosol oder der Zellkern angefärbt werden, auch ist die Erfassung spezifischer Molekülstrukturen möglich. Hierfür verwendet man gegen diese Strukturen gerichtete monoklonale Antikörper, die mit fluoreszierenden Farbstoffen gekoppelt

sind. Diese Fluorochrome werden im FACS-Gerät durch monochromatisches Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt und emittieren daraufhin Licht, das durch hochempfindliche Lichtsensoren (Photomultiplier) vom optischen zunächst in ein elektrisches und dann in ein digitales Signal umgewandelt wird.

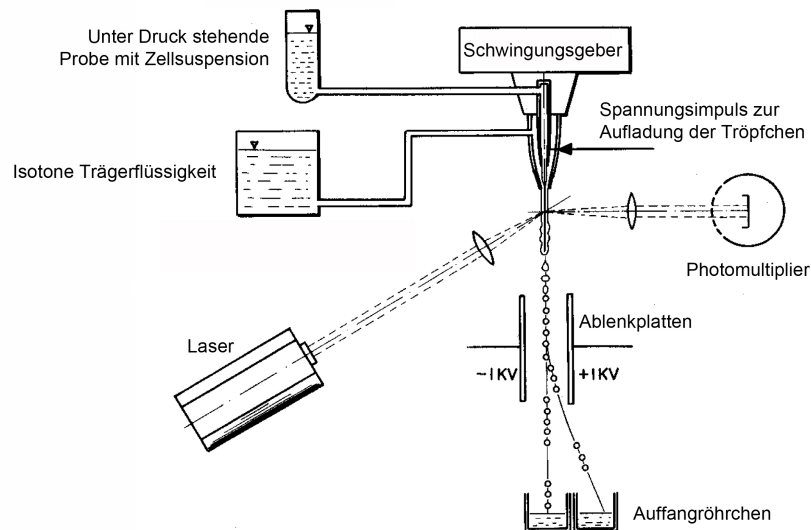


Abb. 2.5: Vereinfachte Darstellung der Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung (FACS)
Modifiziert nach Bonner et al.¹²⁰.

Im Rahmen unseres Versuchsprotokolles ging es um die Darstellung und die Quantifizierung der Oberflächenexpression der CAMs. Die Zellen wurden dafür mit monoklonalen, gegen menschliches ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin gerichteten Antikörpern inkubiert, die direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt waren (Fluorescein-5-Isothiocyanat [FITC]-markiert). Die Messung erfolgte am FACS Calibur™ der Firma Becton Dickinson (Franklin Lakes, USA). Die Auswertung erfolgte computergestützt mit Hilfe der Cell Quest-Software.

Lösungen/Chemikalien:

1. PBS+
2. M199
3. FBS 10%
4. Trypsin/EDTA
5. Mausserum
6. BSA 1%
7. PFA 3,7%

Antikörper:

Mouse (monoclonal) anti-human CD54 (ICAM-1) (Fluorescein-5-Isothiocyanat [FITC]-markiert)	Biosource (Nivelles, Belgien)
Mouse (monoclonal) anti-human CD106 (VCAM-1) (Fluorescein-5-Isothiocyanat [FITC]-markiert)	Calbiochem®, Merck (Darmstadt, Deutschland)
Mouse (monoclonal) anti-human CD62E (E-Selectin) (Fluorescein-5-Isothiocyanat [FITC]-markiert)	Biosource (Nivelles, Belgien)

Durchführung:

Nachdem die Zellen in den 24-Well Platten zur Konfluenz gewachsen waren wurden sie nach dem oben dargestellten Präkonditionierungsprotokoll behandelt. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und die Wells je drei Mal mit PBS+ gewaschen. Schrittweise wurden die Zellen nun durch Zugabe von je 200 µl Trypsin/EDTA pro Well bei 37°C gelöst. Der Verdauvorgang wurde durch Zugabe von Abstopp-Medium nach 2 Minuten unterbrochen und je 2 Wells gepoolt in einem FACS-Röhrchen aufgefangen. Die Zellsuspensionen wurden für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert und das Medium abdekantiert. Das Pellet wurde in 300 µl PBS+ resuspendiert, gevortext und anschließend erneut ca. 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, die Zellen erneut in 300 µl PBS+ gewaschen und die Zellsuspension 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand wieder abdekantiert und das Pellet in 50 µl Mausserum resuspendiert, gevortext und ca. 30 Minuten bei Raumtemperatur vorinkubiert, um evtl. unspezifische Bindungen des Antikörpers zu besetzen. Daraufhin wurden 10 µl (*mouse anti-human E-Selectin*) bzw. 4 µl (*mouse anti-human ICAM-1* bzw. *VCAM-1*) des Fluorochrom-markierten Antikörpers hinzugegeben und ca. 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Danach erfolgte entweder die direkte Weiterbearbeitung oder die Fixierung des Pellets mit 500 µl 3.7% PFA Lösung in PBS+.

Zur Weiterverarbeitung wurde 1 ml PBS+ zugegeben, kurz gevortext, 5 Minuten zentrifugiert und das Pellet zur Messung in 500 µl PBS+ gelöst.

Die Messung erfolgte am FACS Calibur™. Einstellungen: FL-1 (488 nm, Fluoreszenzmaximum von FITC 515 nm).

2.3 Statistische Auswertung:

Die Ergebnisse der Untersuchungen wurden als Mittelwerte mit Standardabweichung ($\text{mean} \pm \text{SD}$) dargestellt. Die statistische Auswertung sollte zeigen, ob 1.) zwischen den Mittelwerten der $\text{TNF}\alpha$ -Gruppe und den Mittelwerten der Kontrollgruppe, 2.) zwischen den Mittelwerten der Anästhetikum+ $\text{TNF}\alpha$ -Gruppe und den Mittelwerten der $\text{TNF}\alpha$ -Gruppe bzw. 3.) zwischen den Mittelwerten der Anästhetikum-Gruppe und den Mittelwerten der Kontrollgruppe signifikante Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ bestanden. Hierfür wurden die Gruppenvergleiche mittels Einweg Varianzanalyse (ANOVA) (Graph Pad Prism version 4.00; GraphPad Software, Inc., San Diego, USA) gefolgt vom Bonferroni Post Hoc Test für paarweise Vergleiche durchgeführt. Ergebnisse mit $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet.

3 Ergebnisse

Die Analyse der erhobenen Daten zeigte für $\text{TNF}\alpha$ -stimulierte Zellen für alle applizierten Substanzen eine signifikante Reduktion der $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Aktivität. Ebenso reduzierten alle Pharmaka signifikant die mRNA- und Proteinexpression von ICAM-1. Dies galt, mit Ausnahme für Morphin, auch für die Expression von VCAM-1. E-Selektin blieb hingegen sowohl auf mRNA-Ebene, als auch auf Protein-Ebene durch die vier applizierten Pharmaka völlig unbeeinflusst. An Zellen, die nicht mit $\text{TNF}\alpha$ behandelt wurden, zeigten die Pharmaka keinen signifikanten Einfluss auf das Expressionsverhalten der CAM.

Die Tabelle 3.1 gibt eine Übersicht der erhobenen Befunde. Auf den nächsten Seiten werden die Ergebnisse im Detail präsentiert.

Effekte		Xenon	Distickstoffmonoxid (N_2O)	Morphin	Isofluran
Reduktion der $\text{TNF}\alpha$ -induzierten $\text{NF}\kappa\text{B}$-Aktivität		+	+	+	+
Reduktion der $\text{TNF}\alpha$ -induzierten mRNA-Expression	ICAM-1	+	+	+	+
	VCAM-1	+	+	-	+
	E-Selektin	-	-	-	-
Reduktion der $\text{TNF}\alpha$ -induzierten Proteinexpression	ICAM-1	+	+	+	+
	VCAM-1	+	+	-	+
	E-Selektin	-	-	-	-

Tabelle 3.1: Übersicht der Effekte von Xenon, Distickstoffmonoxid (N_2O), Morphin und Isofluran auf die $\text{TNF}\alpha$ -induzierte Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin in HUVEC. Effekt nachweisbar: grün/+, Effekt nicht nachweisbar: rot/-. $\text{TNF}\alpha$: Tumor Nekrose Faktor α , $\text{NF}\kappa\text{B}$: nuclear factor kappa B, mRNA: messenger-RNA, ICAM-1: intercellular adhesion molecule-1, VCAM-1: vascular cell adhesion molecule-1, HUVEC: human umbilical vein endothelial cells.

3.1 Einfluss von Xenon, Distickstoffmonoxid, Morphin und Isofluran auf die $\text{TNF}\alpha$ -induzierte Transkriptionsaktivität von $\text{NF}\kappa\text{B}$

Wir untersuchten den Effekt der Anästhetika Xenon, Distickstoffmonoxid (N_2O) und Isofluran und des Opiats Morphin auf den für die CAM-Expression primär verantwortlichen Transkriptionsfaktor $\text{NF}\kappa\text{B}$ mittels IR-EMSA. Hierbei konnte für alle Substanzen gezeigt werden, dass sie imstande sind die $\text{TNF}\alpha$ -induzierte Transkriptionsaktivität von $\text{NF}\kappa\text{B}$ signifikant zu reduzieren (Abb. 3.1): Xenon [A]: 2.0 ± 1.6 , N_2O [B]: 3.5 ± 2.2 , Morphin [C]: 2.5 ± 1.5 , Isofluran [D]: 2.8 ± 0.7 vs. $\text{TNF}\alpha$: 6.6 ± 2.7 [A], 6.7 ± 1.4 [B], 5.7 ± 2.5 [C], 4.8 ± 0.9 [D] AVI; $P < 0.05$).

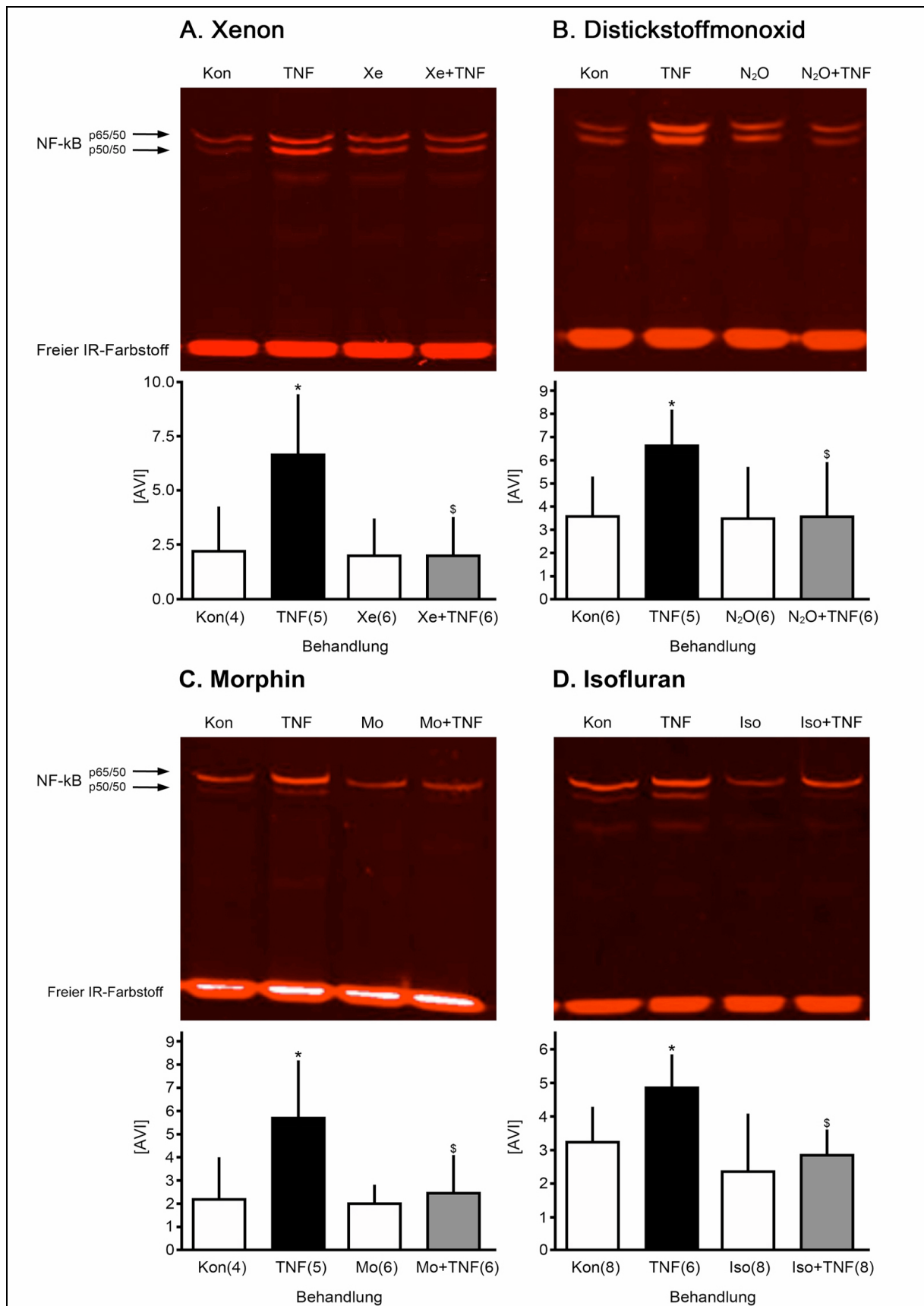


Abb. 3.1: Einfluss einer intermittierenden Applikation von Xenon, Distickstoffmonoxid (N₂O), Morphin und Isofluran auf die TNF α -induzierte Transkriptionsaktivität des für die ICAM-1-, VCAM-1- und E-Selektin-Expression primär verantwortlichen Transkriptionsfaktors NF κ B in HUVEC. Erläuterungen siehe S. 47. Modifiziert nach Weber NC, Kandler J et al.¹²².

Zu Abbildung 3.1:

Humane Nabelschnurendothelzellen (HUVEC) blieben entweder unbehandelt (Kontrollgruppe, Kon), oder wurden mit 10ng/ml $\text{TNF}\alpha$ (Tumor Nekrose Faktor α , TNF) bzw. mit den jeweiligen Pharmaka Xenon (A. Xe), Distickstoffmonoxid (B. N_2O), Morphin (C. Mo) oder Isofluran (D. Iso) alleine (Xe, N_2O , Mo, Iso) oder zusätzlich nachfolgend mit $\text{TNF}\alpha$ behandelt (Xe+TNF, N_2O +TNF, Mo+TNF, Iso+TNF). Die Bindungsaktivität von $\text{NF}\kappa\text{B}$ (*nuclear factor kappa B*) wurde mittels Infrarot (IR) EMSA ermittelt.

Alle Versuche wurden mit aus drei verschiedenen Primärkulturen stammenden Zellen durchgeführt. Die Abbildung 3.1 zeigt hieraus representative Daten einer Messung (oberer Bereich der Grafik). Bei den Werten handelt es sich um Mittelwerte + Standardabweichung (mittlere Lichtintensität [AVI]). Die Werte in den Klammern hinter den Gruppen geben die Anzahl der Messungen an. * $P < 0.05$ statistisch signifikant vs. Kontrollgruppe, \$ $P < 0.05$ statistisch signifikant vs. $\text{TNF}\alpha$ -Gruppe.

3.2 Einfluss von Xenon, Distickstoffmonoxid, Morphin und Isofluran auf die $\text{TNF}\alpha$ -induzierte mRNA-Expression von ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin

ICAM-1:

Sowohl die drei inhalativen Anästhetika, als auch Morphin verringerten die $\text{TNF}\alpha$ -induzierte mRNA-Expression von ICAM-1 signifikant (Abb. 3.2): Xenon [A]: 0.7 ± 0.3 , N_2O [B]: 0.6 ± 0.3 , Morphin [C]: 1.1 ± 0.4 , Isofluran [D]: 0.8 ± 0.3 vs. $\text{TNF}\alpha$: 1.3 ± 0.7 [A], 1.1 ± 0.5 [B], 3.4 ± 1.8 [C], 2.1 ± 1.1 [D], mittlere Lichtintensität (*average light intensity* [AVI]); $P < 0.05$.

VCAM-1:

Alle inhalativen Anästhetika reduzierten die $\text{TNF}\alpha$ -induzierte mRNA-Expression von VCAM-1 signifikant (Abb. 3.3, E, F, H): Xenon [E]: 4.7 ± 4.6 , N_2O [F]: 3.5 ± 2.2 , Isofluran [H]: 3.3 ± 2.4 vs. $\text{TNF}\alpha$: 10.8 ± 4.3 [E], 9.9 ± 1.7 [F], 9.6 ± 3.9 [H] AVI; $P < 0.05$). Dieser Effekt war geringer ausgeprägt im Vergleich zum Effekt auf die ICAM-1-Expression. Morphin hingegen hatte keinen Effekt auf die mRNA-Expression von VCAM-1 (Abb. 3.3, G): Morphin [G]: 10.5 ± 4.7 vs. $\text{TNF}\alpha$: 9.7 ± 3.6 [G], mittlere Lichtintensität (*average light intensity* [AVI]); $P < 0.05$.

E-Selektin:

Die $\text{TNF}\alpha$ -induzierte mRNA-Expression von E-Selektin blieb sowohl durch die Inhalationsanästhetika, als auch durch Morphin gänzlich unbeeinflusst (Abb. 3.4, I-L). Lediglich Xenon und N_2O zeigten nicht-signifikante Tendenzen zur Reduktion der mRNA-Expression von E-Selektin (Abb. 3.4, I und J).

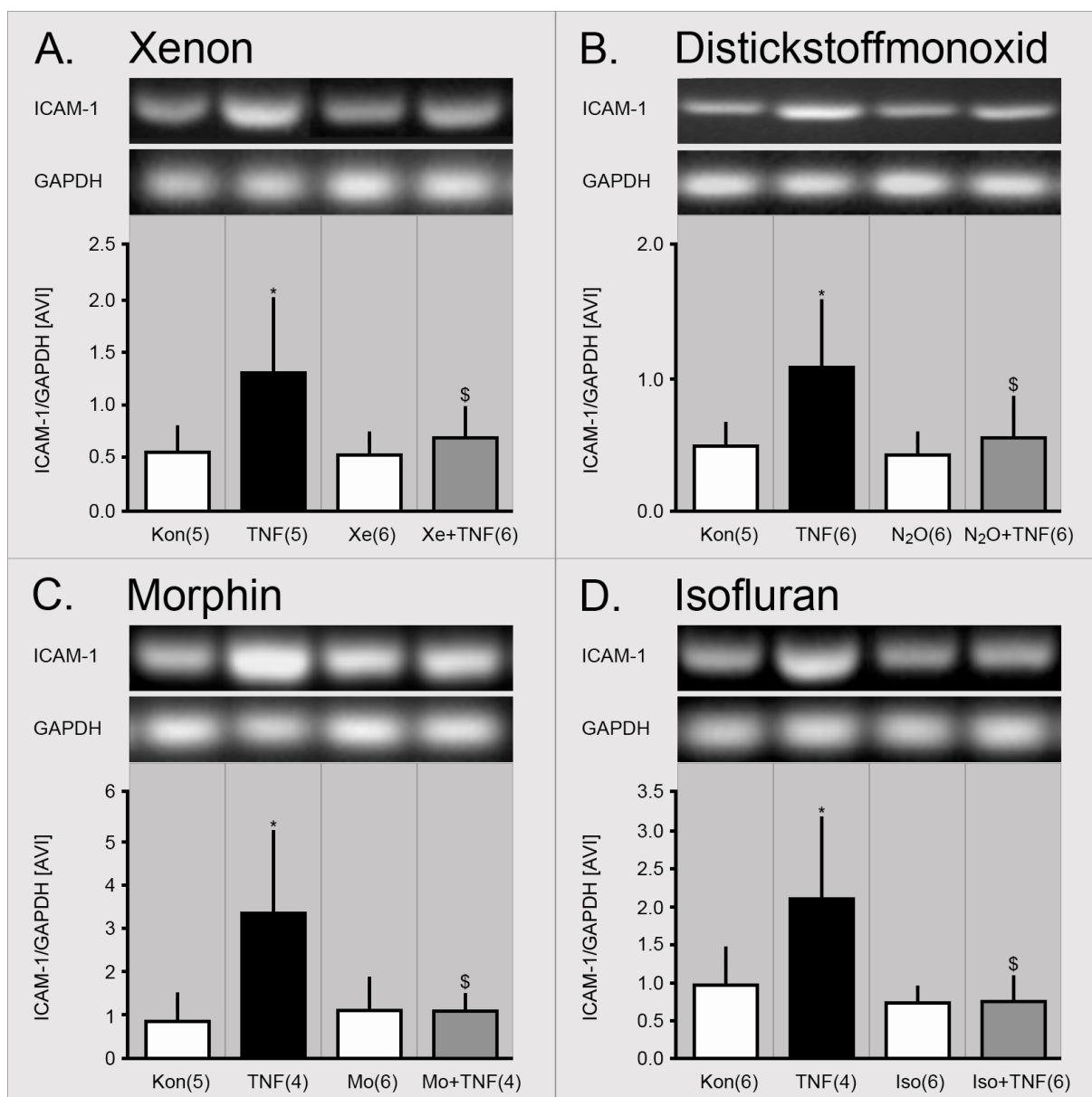


Abb. 3.2: Einfluss einer intermittierenden Applikation von Xenon, Distickstoffmonoxid (N₂O), Morphin und Isofluran auf die Tumor Nekrose Faktor α (TNF α)-induzierte *messenger-RNA* (mRNA) Expression des zellulären Adhäsionsmoleküls ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*) in humanen Nabelschnurendothelzellen (HUVEC)

Die Expression wurde jeweils im Verhältnis zur Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) mittels Reverse-Transkription-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) und anschließender Gelelektrophorese und Ethidiumbromidfärbung erhoben. HUVEC blieben entweder unbehandelt (Kontrollgruppe, Kon), oder wurden mit 10ng/ml TNF α (TNF) bzw. mit den jeweiligen Pharmaka Xenon (A.), Distickstoffmonoxid (N₂O, B.), Morphin (C.) oder Isofluran (D.) alleine (Xe, N₂O, Mo, Iso) oder zusätzlich nachfolgend mit TNF α behandelt (Xe+TNF, N₂O+TNF, Mo+TNF, Iso+TNF). Alle Versuche wurden mit aus drei verschiedenen Primärkulturen stammenden Zellen durchgeführt. Die Abbildung zeigt hieraus repräsentative Daten einer Messung (oberer Teil der Grafik). Bei den Werten handelt es sich um Mittelwerte + Standardabweichung (mittlere Lichtintensität [AVI]) bezogen auf das Expressionsausmaß der GAPDH. Die Werte in den Klammern hinter den Gruppen geben die Anzahl der Messungen an. * P<0.05 statistisch signifikant vs. Kontrollgruppe, \$ P<0.05 statistisch signifikant vs. TNF α -Gruppe. Modifiziert nach Weber NC, Kandler J et al.¹²².

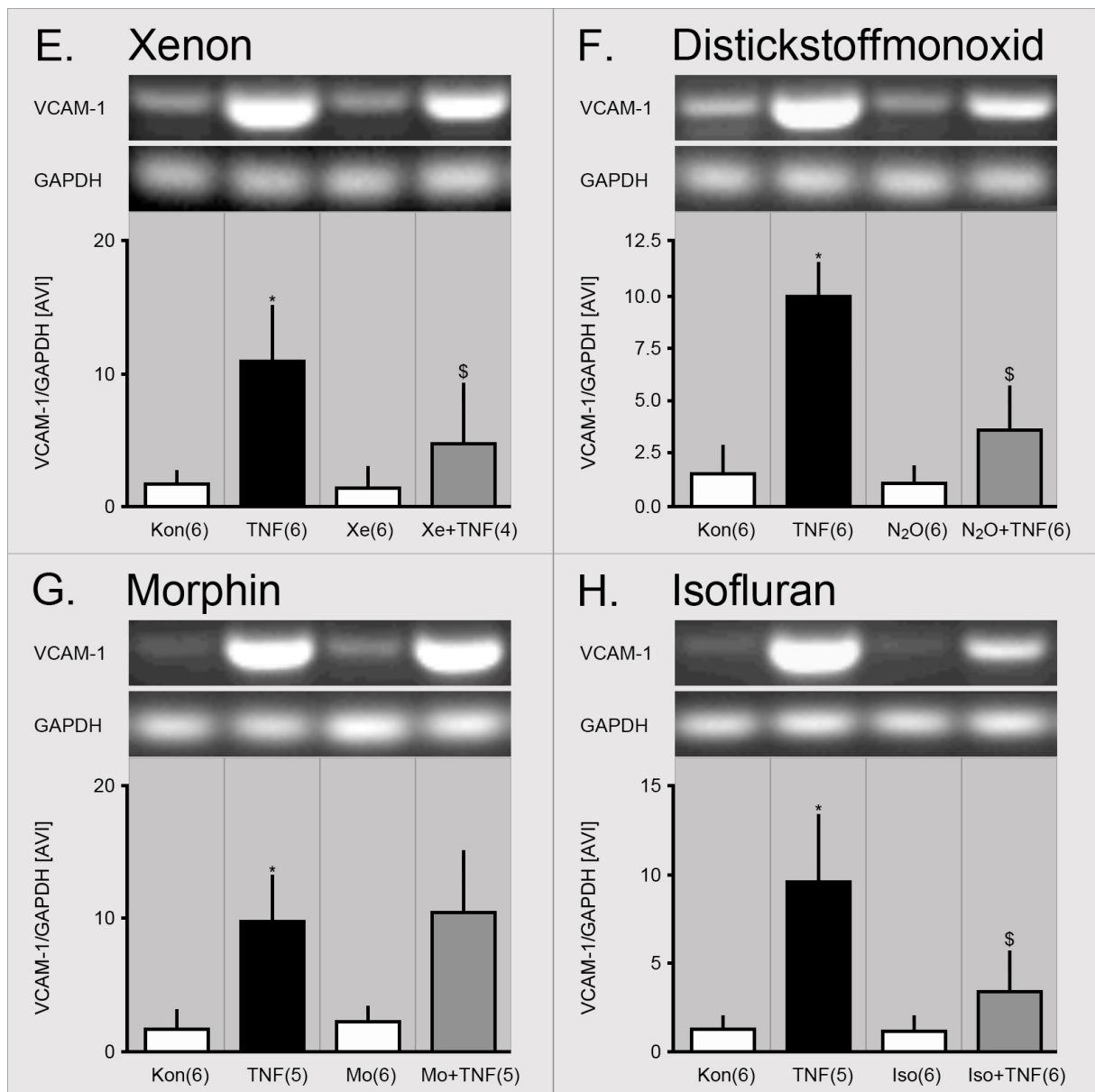


Abb. 3.3: Einfluss einer intermittierenden Applikation von Xenon, Distickstoffmonoxid (N₂O), Morphin und Isofluran auf die Tumor Nekrose Faktor α (TNF α)-induzierte *messenger-RNA* (mRNA) Expression des zellulären Adhäsionsmoleküls VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*) in humanen Nabelschnurendothelzellen (HUVEC)

Die Expression wurde jeweils im Verhältnis zur Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) mittels Reverse-Transkription-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) und anschließender Gelelektrophorese und Ethidiumbromidfärbung erhoben. HUVEC blieben entweder unbehandelt (Kontrollgruppe, Kon), oder wurden mit 10ng/ml TNF α (TNF) bzw. mit den jeweiligen Pharmaka Xenon (E.), Distickstoffmonoxid (N₂O, F.), Morphin (G.) oder Isofluran (H.) alleine (Xe, N₂O, Mo, Iso) oder zusätzlich nachfolgend mit TNF α behandelt (Xe+TNF, N₂O+TNF, Mo+TNF, Iso+TNF). Alle Versuche wurden mit aus drei verschiedenen Primärkulturen stammenden Zellen durchgeführt. Die Abbildung zeigt hieraus repräsentative Daten einer Messung (oberer Teil der Grafik). Bei den Werten handelt es sich um Mittelwerte + Standardabweichung (mittlere Lichtintensität [AVI]) bezogen auf das Expressionsausmaß der GAPDH. Die Werte in den Klammern hinter den Gruppen geben die Anzahl der Messungen an. * P<0.05 statistisch signifikant vs. Kontrollgruppe, \$ P<0.05 statistisch signifikant vs. TNF α -Gruppe. Modifiziert nach Weber NC, Kandler J et al.¹²².

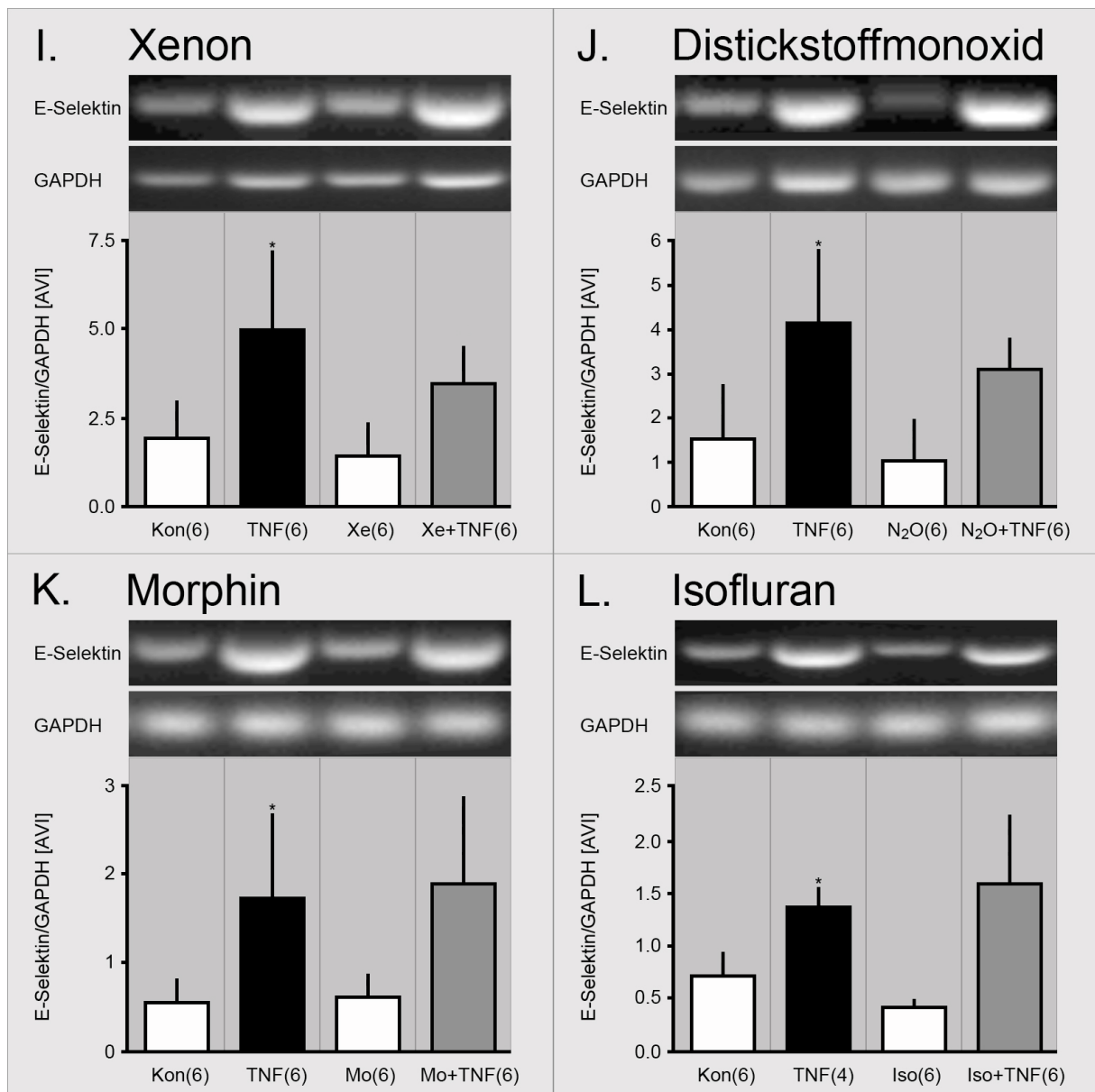


Abb. 3.4: Einfluss einer intermittierenden Applikation von Xenon, Distickstoffmonoxid (N₂O), Morphin und Isofluran auf die Tumor Nekrose Faktor α (TNF α)-induzierte *messenger-RNA* (mRNA) Expression des zellulären Adhäsionsmoleküls E-Selektin in humanen Nabelschnurendothelzellen (HUVEC)

Die Expression wurde jeweils im Verhältnis zur Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) mittels Reverse-Transkription-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) und anschließender Gelelektrophorese und Ethidiumbromidfärbung erhoben. HUVEC blieben entweder unbehandelt (Kontrollgruppe, Kon), oder wurden mit 10ng/ml TNF α (TNF) bzw. mit den jeweiligen Pharmaka Xenon (I.), Distickstoffmonoxid (N₂O, J.), Morphin (K.) oder Isofluran (L.) alleine (Xe, N₂O, Mo, Iso) oder zusätzlich nachfolgend mit TNF α behandelt (Xe+TNF, N₂O+TNF, Mo+TNF, Iso+TNF). Alle Versuche wurden mit aus drei verschiedenen Primärkulturen stammenden Zellen durchgeführt. Die Abbildung zeigt hieraus repräsentative Daten einer Messung (oberer Teil der Grafik). Bei den Werten handelt es sich um Mittelwerte + Standardabweichung (mittlere Lichtintensität [AVI]) bezogen auf das Expressionsausmaß der GAPDH. Die Werte in den Klammern hinter den Gruppen geben die Anzahl der Messungen an. * P<0.05 statistisch signifikant vs. Kontrollgruppe, \$ P<0.05 statistisch signifikant vs. TNF α -Gruppe. Modifiziert nach Weber NC, Kandler J et al.¹²².

3.3 Einfluss von Xenon, Distickstoffmonoxid, Morphin und Isofluran auf die TNF α -induzierte Proteinexpression von ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin

Zur Evaluation der Oberflächenexpression der CAM führten wir für die Adhäsionsmoleküle FACS-Messungen durch. Ziel war es, herauszufinden ob die pharmakologisch induzierbare Reduktion der NF κ B-Aktivität und die oben genannte Beeinflussung der mRNA-Expression der CAM mit einer entsprechenden Oberflächenexpression von ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin korreliert. Hierbei konnte folgendes beobachtet werden:

ICAM-1:

Alle vier Substanzen verringerten die TNF α -induzierte Expression von ICAM-1 (Abb. 3.5, A-D): Xenon [A]: 52.8 ± 2.7 , N₂O [B]: 35.3 ± 12.0 , Morphin [C]: 47.9 ± 22.5 , Isofluran [D]: 33.4 ± 4.5 vs. TNF α : 67.5 ± 1.8 [A], 57.7 ± 19.2 [B], 89.6 ± 62.6 [C], 45.0 ± 18.9 [D], mittlere Fluoreszenzintensität; $P < 0.05$.

VCAM-1:

Die TNF α -induzierte Expression von VCAM-1 wurde ebenfalls durch die Inhalationsanästhetika supprimiert (Abb. 3.6, E, F, H): Xenon [E]: 31.9 ± 5.1 , N₂O [F]: 40.3 ± 3.5 , Isofluran [H]: 76.4 ± 5.5 vs. TNF α : 60.9 ± 28.0 [E], 60.3 ± 6.6 [F], 92.6 ± 9.2 [H]; $P < 0.05$. Morphin hingegen hatte, in Analogie zu den Ergebnissen der PCR, keinen Effekt (Abb. 3.6, G): Morphin [G]: 27.8 ± 2.5 vs. TNF α : 30.5 ± 5.9 [G].

E-Selektin:

Die TNF α -induzierte Expression von E-Selektin blieb sowohl durch die Inhalationsanästhetika, als auch durch Morphin gänzlich unbeeinflusst (Abb. 3.7, I-L). Lediglich Morphin zeigte nicht-signifikante Tendenzen zur Reduktion der Expression von E-Selektin im Vergleich zu den anderen Substanzen (Abb. 3.7, K).

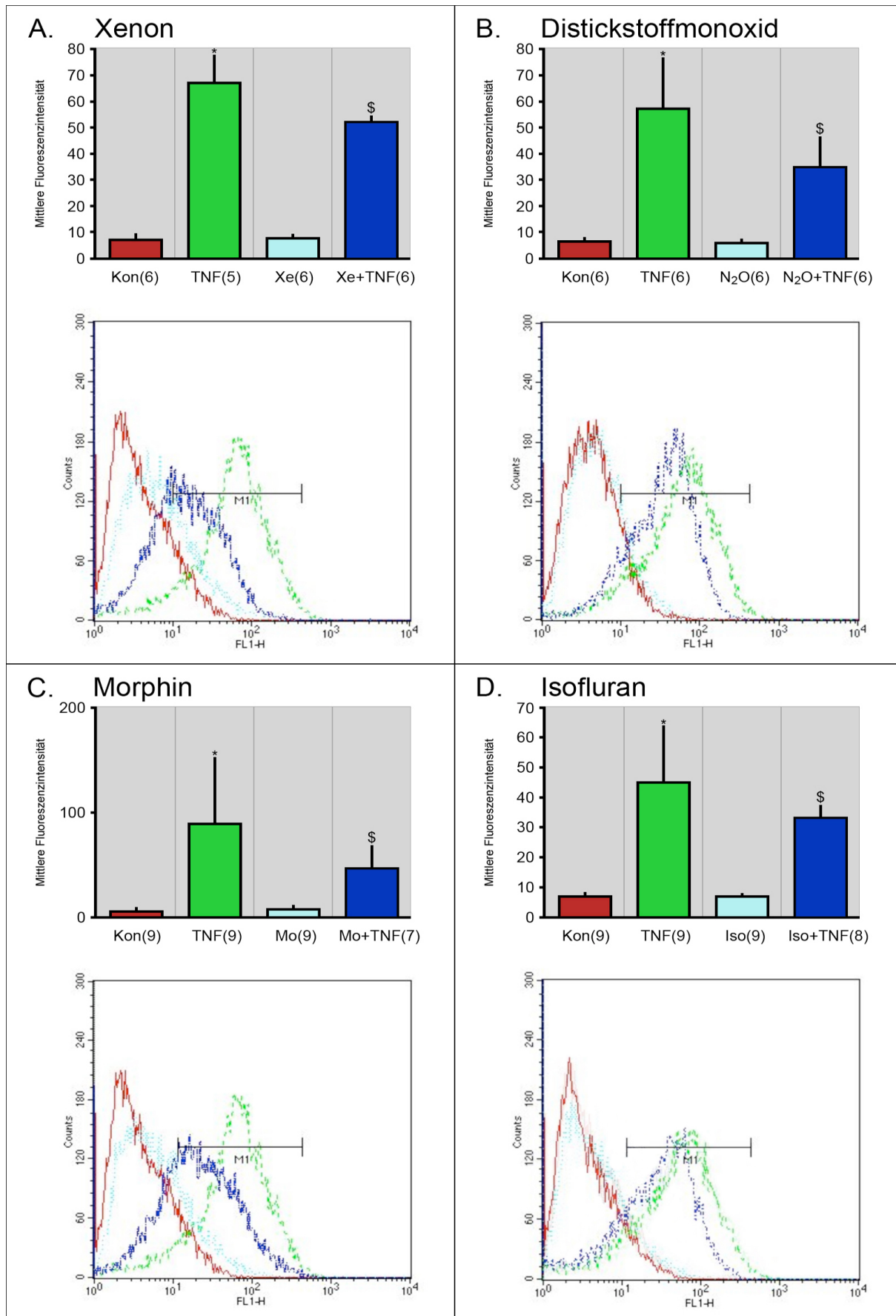


Abb. 3.5: Einfluss einer intermittierenden Applikation von Xenon, Distickstoffmonoxid (N₂O), Morphin und Isofluran auf die TNF α -induzierte Oberflächenexpression des zellulären Adhäsionsmoleküls ICAM-1 in HUVEC. Erläuterungen siehe S. 55.

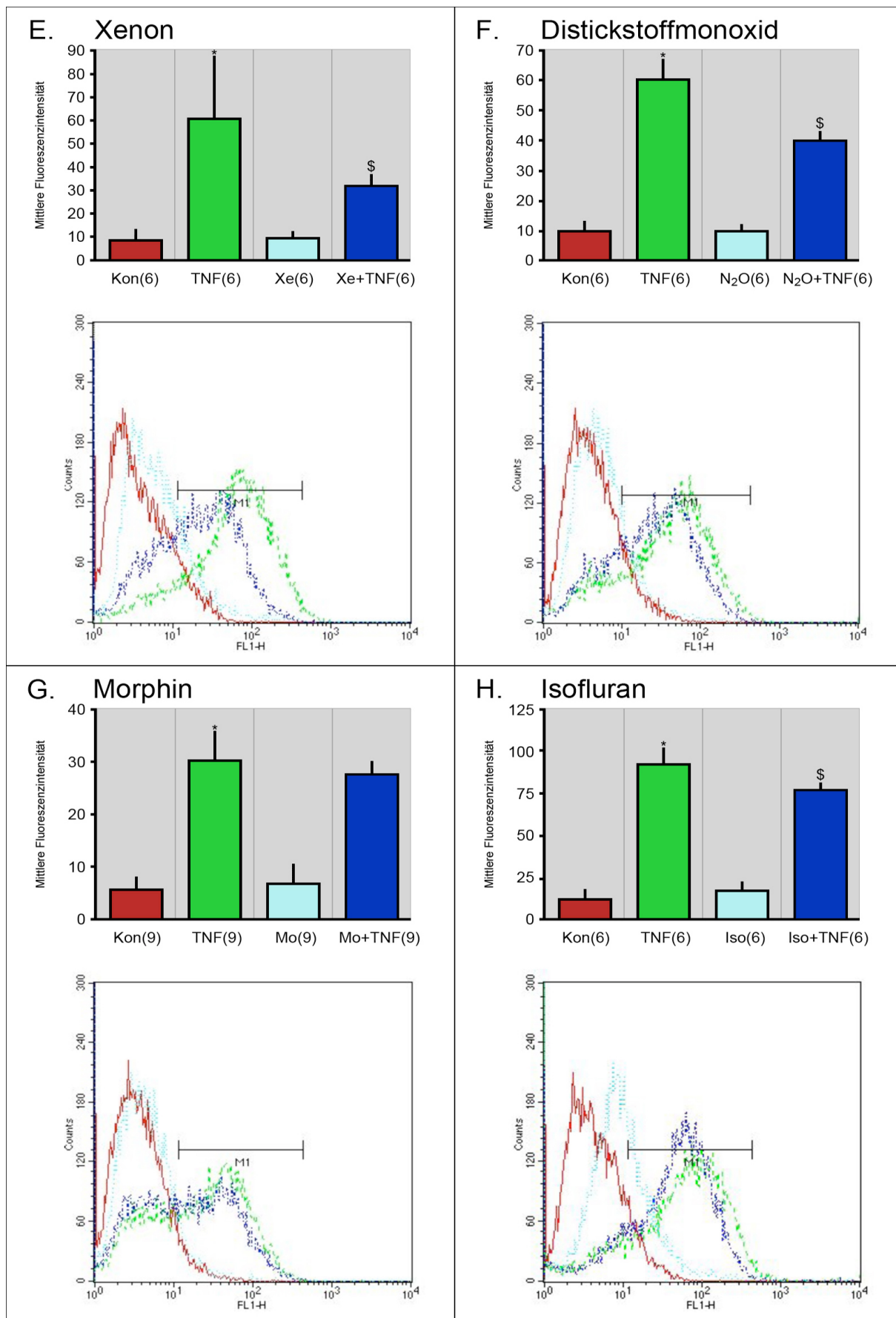


Abb. 3.6: Einfluss einer intermittierenden Applikation von Xenon, Distickstoffmonoxid (N₂O), Morphin und Isofluran auf die TNF α -induzierte Oberflächenexpression des zellulären Adhäsionsmoleküls VCAM-1 in HUVEC. Erläuterungen siehe S. 55.

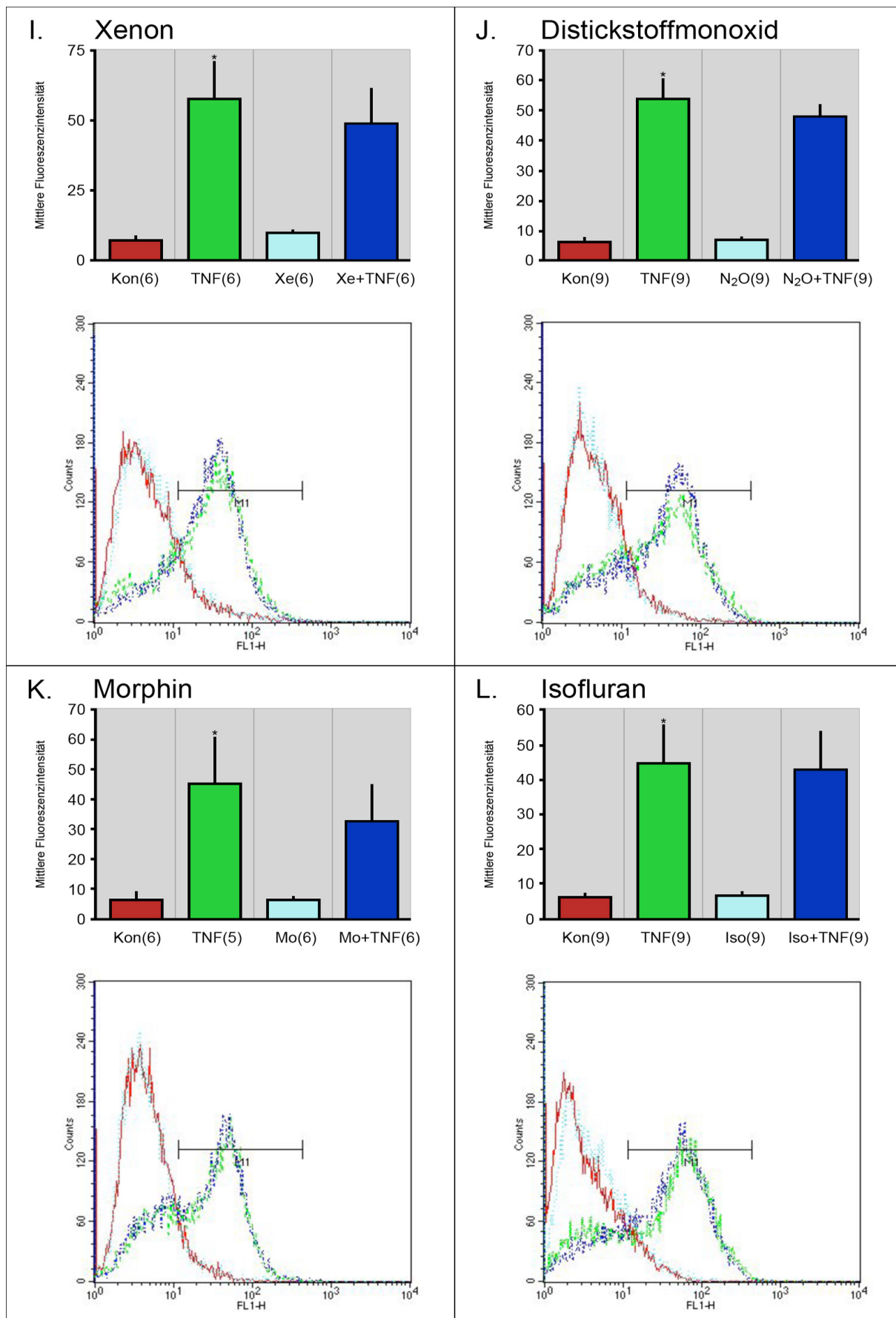


Abb. 3.7: Einfluss einer intermittierenden Applikation von Xenon, Distickstoffmonoxid (N₂O), Morphin und Isofluran auf die TNF α -induzierte Oberflächenexpression des zellulären Adhäsionsmoleküls E-Selektin in HUVEC. Erläuterungen siehe S. 55.

Zu den Abbildungen 3.5 - 3.7:

Die Abbildungen zeigen den Einfluss einer intermittierenden Applikation von Xenon, Distickstoffmonoxid (N_2O), Morphin und Isofluran auf die Tumor Nekrose Faktor α ($TNF\alpha$)-induzierte Oberflächenexpression der zellulären Adhäsionsmoleküle (CAM) ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*, Abb. 3.5, A-D), VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*, Abb. 3.6, E-H) und E-Selektin (Abb. 3.7, I-L). Humane Nabelschnurendothelzellen (HUVEC) blieben entweder unbehandelt (Kontrollgruppe, Kon), oder wurden mit 10ng/ml $TNF\alpha$ (TNF) bzw. mit den jeweiligen Pharmaka Xenon (Abb. 3.5-3.7, A, E, I), Distickstoffmonoxid (N_2O , Abb. 3.5-3.7, B, F, J), Morphin (Abb. 3.5-3.7, C, G, K) oder Isofluran (Abb. 3.5-3.7, D, H, L) alleine (Xe, N_2O , Mo, Iso) oder zusätzlich nachfolgend mit $TNF\alpha$ behandelt (Xe+TNF, N_2O +TNF, Mo+TNF, Iso+TNF). Die Expression der CAM auf der endothelialen Zelloberfläche wurde durchflusszytometrisch mittels Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS) ermittelt. Hierfür erfolgte die Markierung der Zellen mit monoklonalen, gegen menschliches ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin gerichteten Antikörpern, die direkt mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein-5-Isothiocyanat (FITC) gekoppelt waren. Die Ergebnisse sind in den Histogrammen im unteren Abschnitt der Grafiken dargestellt und zeigen die Zellzahl im Verhältnis zur Fluoreszenzaktivität bei 520 nm (rote Linie: Kon, grüne Linie: TNF, hellblaue Linie: Anästhetikum bzw. Morphin, dunkelblaue Linie: Anästhetikum+TNF bzw. Morphin+TNF). Die über den Histogrammen befindlichen Säulendiagramme zeigen die Quantifizierung aus zwei bis drei Experimenten, die mindestens dreifach durchgeführt wurden. Bei den Werten handelt es sich um Mittelwerte + Standardabweichung (mittlere Fluoreszenzintensität). Die Werte in den Klammern hinter den Gruppen geben die Anzahl der Messungen an. * $P < 0.05$ statistisch signifikant vs. Kontrollgruppe, \$ $P < 0.05$ statistisch signifikant vs. $TNF\alpha$ -Gruppe. Die Abbildungen sind modifiziert nach Weber NC, Kandler J et al.¹²².

4 Diskussion

4.1 Pharmakologische Präkonditionierung – Einfluss auf die Mikrozirkulation

Die morphologischen und funktionellen Effekte der pharmakologischen Präkonditionierung durch Anästhetika, insbesondere durch die halogenierten Fluorkohlenstoffe Halothan, Isofluran, Sevofluran und Desfluran, aber auch durch das Edelgas Xenon und das Opiat Morphin, auf das Myokard und die diesem Phänomen auf Ebene der Kardiomyozyten zugrunde liegenden Mechanismen sind bekannt (siehe Abschnitt 1.3).

Aber nicht nur die direkte Beeinflussung der Kardiomyozyten, sondern auch die Reduktion der leukozytären Adhärenz in der Mikrozirkulation durch die Pharmaka und die dadurch verminderte Extravasation der Leukozyten ins Myokard spielt bei der Generierung der Kardioprotektion eine Rolle. Hierbei wird die verminderte Leukozytenrekrutierung über die Modifikation der endothelialen Adhäsionsmoleküle, der leukozytären Adhäsionsmoleküle und der Leukozyten-Endothel-Interaktion vermittelt¹²⁴⁻¹³³.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es in einem *in vitro* Zellkulturmodell den Einfluss verschiedener, klinisch häufig in der Vergangenheit (Distickstoffmonoxid) sowie weiterhin teilweise heutzutage (Isofluran) und perspektivisch gegebenenfalls zunehmend relevanter (Xenon) Inhalationsanästhetika und des Opiats Morphin auf die Zytokin-induzierte Expression verschiedener im Rahmen des Ischämie-Reperfusionsschadens essentieller endothelialer Adhäsionsmoleküle (ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin) zu untersuchen.

Haupterkenntnisse der vorliegenden Arbeit waren:

1. Alle vier Substanzen sind in diesem Versuchsaufbau in der Lage, die durch $\text{TNF}\alpha$ -Applikation induzierbare Aktivität des für die CAM-Expression primär verantwortlichen Transkriptionsfaktors $\text{NF}\kappa\text{B}$ in HUVEC aufzuheben.
2. Alle vier Substanzen verringern die $\text{TNF}\alpha$ -induzierte mRNA- und Proteinexpression für ICAM-1.
3. Xenon, Isofluran und Distickstoffmonoxid verringern die $\text{TNF}\alpha$ -induzierte mRNA- und Proteinexpression für VCAM-1.
4. Keine der vier Substanzen hatte einen signifikanten Effekt auf die $\text{TNF}\alpha$ -induzierte mRNA- und Proteinexpression für E-Selektin.

Der Einfluss volatiler Anästhetika auf die vor allem während der postischämischen Reperusionsphase ablaufende Interaktion zwischen Leukozyten und dem Endothel wurde bereits 1997 von Kowalski et al.¹⁰⁷ untersucht. Diese Arbeitsgruppe beschrieb „Membran-Effekte“ der lipophilen Anästhetika Halothan, Isofluran und Sevofluran, die die Interaktion von Leukozyten und dem Endothel scheinbar beeinflussten. An isolierten

Meerschweinchenherzen zeigten sie, dass die kontinuierliche Applikation von 1 und 2 MAC (*minimal alveolar concentration*) der genannten Substanzen die postischämische Adhärenz neutrophiler Granulozyten in den Koronarien reduziert.

Weitere Arbeiten folgten, die den Effekt der Anästhetika auf die postischämische Leukozytenrekrutierung und die zugrunde liegenden Mechanismen untersuchten. Potentiell möglich ist hierbei eine Beeinflussung der endothelialen und der leukozytären „Anker-Proteine“, aber auch eine inhibierende Wirkung auf die Rezeptor-Liganden-Interaktion erscheint plausibel.

Da sich die Auseinandersetzung mit diesem Thema initial auf die Beeinflussung der leukozytären Adhäsionsmoleküle konzentrierte, soll zur besseren Einbettung des Themas chronologisch mit diesem Abschnitt begonnen werden.

4.1.1 Stellenwert leukozytärer Adhäsionsmoleküle

Möbert et al.¹⁰⁸ untersuchten in einem Zellkulturmodell mit HUVEC und neutrophilen Granulozyten die Interaktion zwischen Leukozyten und dem Endothel. Es wurde die Rate am Endothel adhärenter neutrophiler Granulozyten unter dem Einfluss von Halothan, Isofluran und Sevofluran nach Stimulation der Leukozyten mit N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP) bzw. des Endothels mit Wasserstoffperoxid (H_2O_2) gemessen. Es konnte gezeigt werden, dass es durch die alleinige Vorbehandlung der neutrophilen Granulozyten mit den genannten Anästhetika zur Reduktion der am Endothel adhärenen Granulozyten und zur Reduktion der fMLP-induzierten Hochregulation des leukozytären Adhäsionsmoleküls CD11b/CD18 kommt. Diese Beeinflussung der Granulozyten wurde als entscheidender Mechanismus zur Reduktion der Leukozytenadhärenz angesehen. Als Marker für einen eventuell über das Endothel vermittelten Effekt wurde exemplarisch die unter 1 MAC Halothan nachweisbare Expression des Adhäsionsmoleküls P-Selektin nach Wasserstoffperoxidstimulation gemessen, die unbeeinflusst im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe blieb. Diese Beobachtung korrelierte mit dem Ergebnis, dass die alleinige Anästhetikabehandlung der HUVEC die leukozytäre Adhärenz nicht reduzieren konnte. Ebenso wie die Arbeit von Möbert et al. ließ das Ergebnis der Arbeitsgruppe von Heindl et al.¹⁰⁹ einen primär über eine Beeinflussung von Leukozyten vermittelten Effekt der Anästhetika auf die Reduktion der Leukozytenadhärenz am Endothel vermuten. Sie zeigten an Meerschweinchenherzen eine verringerte postischämische koronare Adhäsion neutrophiler Granulozyten und eine Reduktion der CD11b/CD18-Expression durch die Behandlung mit Sevofluran und Isofluran. Arbeiten, die sich mit dem Ischämie-Reperfusionsschaden bei adhäsionsmolekül-defizienten *knock-out* (-/-) Mäusen beschäftigen, belegen den Stellenwert des leukozytär vermittelten Parenchymschadens und

die Möglichkeit diesen durch die pharmakologische Reduktion der Adhäsionsmolekülexpression positiv zu beeinflussen. Vergleicht man nach 30 Minuten myokardialer Ischämie und 120 minütiger Reperfusion CD18- bzw. ICAM-1-defiziente *knock-out* Mäuse und den Wildtyp bezüglich leukozytärer Infiltration und Zellnekrose, so kann sowohl bei den Mäusen mit einer Defizienz des leukozytären (CD18), aber auch bei denen mit einer Defizienz des endothelialen Adhäsionsmoleküls (ICAM-1) eine signifikante Reduktion der leukozytären Infiltration und des Ausmaßes der Zellnekrose im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden. Dieser Effekt ist bei CD18-/- Mäusen etwas ausgeprägter¹³³. Daten, die einen Einfluss der kardioprotektiven Anästhetika auf leukozytäre Adhäsionsmoleküle zeigen, gibt es auch für das Edelgas Xenon. Es konnte *in vitro* gezeigt werden, dass Xenon in einer Konzentration von 30% und 60% nach einstündiger Applikation die fMLP-induzierte Expression von P-Selektin-Glykoprotein-Ligand-1 (PSGL-1) und L-Selektin in isolierten neutrophilen Granulozyten reduziert. Auf die β_2 -Integrine (LFA-1, Mac-1) war hingegen kein Effekt zu beobachten¹¹⁰. PSGL-1 und L-Selektin vermitteln das initiale Leukozytenrollen, während die β_2 -Integrine CD11a/CD18 und CD11b/CD18 über die Interaktion mit den Adhäsionsmolekülen ICAM-1 und VCAM-1 für die feste Adhärenz am Endothel essentiell sind. Da Xenon, auch wenn es ausschließlich in der Reperfusionsphase appliziert wird, die Infarktgröße im Tiermodell signifikant reduzieren kann¹³⁴, könnte die Einflussnahme auf den Mechanismus des Leukozytenrollens ein Grund für diesen dann per definitionem postkonditionierenden Effekt sein. Somit kann vermutet werden, dass Xenon sowohl durch die oben beschriebene Reduktion von PSGL-1 und L-Selektin und durch die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene Reduktion der ICAM-1- und VCAM-1-Expression eine präkonditionierende Wirkung vermittelt. Eine Postkonditionierung könnte durch hiervon unabhängige Mechanismen, wie zum Beispiel eine Aviditätsverminderung, also eine Minderung der Bindungsfähigkeit zwischen den leukozytären und endothelialen Adhäsionsmolekülen, vermittelt werden. Widersprüchlich zu diesen Daten sind allerdings die Ergebnisse von Bedi et al.¹³⁵, die in einem isolierten kardiopulmonalen Bypasssystem keinen Einfluss von Xenon auf die leukozytäre Expression von L-Selektin, CD11a/CD18 und CD11b/CD18 sehen konnten.

Isofluran hingegen reduziert *in vitro* sowohl die Expression von L-Selektin als auch die der β_2 -Integrine¹³⁶, so dass der gut belegte präkonditionierende Effekt dieser Substanz teilweise über diesen Mechanismus vermittelt zu werden scheint.

Distickstoffmonoxid kann in isolierten neutrophilen Granulozyten konzentrationsabhängig die fMLP- und C5a-induzierte Generierung von Wasserstoffperoxid reduzieren¹³⁷. Wasserstoffperoxid vermittelt einerseits eine antimikrobielle Wirkung als Teil der unspezifischen Immunantwort, andererseits den Parenchymschaden im Rahmen des Ischämie-Reperfusionsschadens. Weitere Studien, die einen Effekt auf die Beeinflussung der

leukozytären Adhäsionsmoleküle untersuchen, fehlen. Die vorliegende Arbeit konnte für Distickstoffmonoxid eine Reduktion der endothelialen ICAM-1- und VCAM-1-Expression auf mRNA- und Protein-Ebene nachweisen (Abb. 3.2, B, 3.3, F, 3.5, B, 3.6, F). Und auch die Aktivität des für die Transkription der genannten Adhäsionsmoleküle verantwortlichen Transkriptionsfaktors NF κ B wurde durch Distickstoffmonoxid reduziert (Abb. 3.1, B). Somit kann vermutet werden, dass durch die Hemmung der ICAM-1- und VCAM-1-Expression sowie die Hemmung der NF κ B-Aktivität eine verminderte leukozytäre Gewebemigration, wie sie im Rahmen des Ischämie-Reperfusionsschadens vorkommt, generiert werden kann. Da allerdings gezeigt werden konnte, dass Distickstoffmonoxid als einziges inhalatives Anästhetikum *in vivo* nicht kardioprotektiv wirkt¹²³, erscheinen sowohl die durch Distickstoffmonoxid hervorgerufene Reduktion der granulozytären Wasserstoffperoxidproduktion, als auch die Reduktion der CAM-Expression insgesamt wenig relevant.

4.1.2 Stellenwert endothelialer Adhäsionsmoleküle

Dass ein protektiver Effekt der klassischerweise präkonditionierenden Substanzen auf das Endothel und dessen Adhäsionsmoleküle besteht, bzw. dass zumindest ein Teil der präkonditionierenden Wirkung über eine Beeinflussung der in der Mikrozirkulation ablaufenden Vorgänge vermittelt wird, kann aufgrund der vorliegenden Literatur vermutet werden. Der genaue Stellenwert dieses Einflusses auf die morphologisch und funktionell darstellbare Kardioprotektion ist aber bislang relativ unklar.

Basierend auf den Daten der *in vivo* Studien, die die präkonditionierende Wirkung von Xenon¹³⁸, Isofluran¹⁰⁴ und Morphin^{80,82} belegen, wählten wir ein daran anknüpfendes Versuchsmodell und verwendeten die zuvor durch uns und andere Arbeitsgruppen¹³⁹ applizierten effektiven subanästhetischen Dosierungen (0,43 MAC). Der Versuchsaufbau beinhaltete eine intermittierende pharmakologischen Behandlung, gefolgt von kurzen Auswaschphasen (siehe Abschnitt 2.2.3). Dieses an die ischämische Präkonditionierung angelehnte Applikationsschema hatte sich sowohl experimentell¹⁴⁰ als auch im Rahmen klinischer Studien⁹⁰ gegenüber einer nur einmaligen Anwendung der Pharmaka als vorteilhaft erwiesen.

4.1.2.1 ICAM-1

Wir konnten den ausgeprägtesten Effekt auf ICAM-1 nachweisen, und zwar durch alle hier verwendeten Substanzen auf allen untersuchten Ebenen der Proteinexpression. Diese Ergebnisse lassen sich nur teilweise durch die Literatur bestätigen bzw. damit vergleichen. So konnten Wang et al.¹⁴¹ bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt durch eine einmalige Applikation von 3 mg Morphin eine signifikante Reduktion der ICAM-1- und L-Selektin-

Serumkonzentrationen nachweisen, was aufgrund des Studiendesigns lediglich als Hinweis auf eine antiinflammatorische Wirkung der Substanz gewertet werden sollte. Allerdings führten diese Ergebnisse zu weitergehenden Untersuchungen. Basierend auf Wangs Arbeit, bei der die Morphingabe nach dem koronarischämischen Ereignis erfolgte und somit formal die Voraussetzung für eine Postkonditionierung erfüllte, untersuchten Min et al.¹⁴² die Postkonditionierung durch Morphin. Sie konnten in einem *in vitro* Zellkulturmodell mit HUVEC zeigen, dass es nach 6 Stunden Anoxie gefolgt von einer 30 minütigen Morphingabe (3 und 30 μg) und anschließender 12 stündiger Reoxygenierung zu einer Reduktion der ICAM-1-Expression (mRNA und Oberflächenprotein) kommt, und dass dies mit einer ebenfalls verminderten Rate adhärenter neutrophiler Granulozyten einhergeht. Zudem konnte gezeigt werden, dass dieser Effekt über κ - und δ -Opioid-Rezeptoren und die PKC vermittelt wird, deren Rolle in der Anästhetika-induzierten Kardioprotektion gut belegt ist. Diese Daten legen es nahe, dass dieser in der Mikrozirkulation ablaufende Mechanismus an der vorbeschriebenen¹⁴³ postkonditionierenden Wirkung von Morphin beteiligt ist.

Unsere Daten zeigen ebenfalls, dass Morphin die ICAM-1-Expression reduziert, allerdings unter anderen Versuchsbedingungen. Wir wählten ein intermittierendes Applikationsschema, bei dem Morphin vor der den Reperfusionsschaden imitierenden $\text{TNF}\alpha$ -Exposition erfolgte, wodurch es die Bedingungen der Präkonditionierung erfüllt. Die verminderte ICAM-1-Expression war mit einer ebenfalls verminderten Aktivität des für die CAM-Expression primär verantwortlichen Transkriptionsfaktors $\text{NF}\kappa\text{B}$ verbunden. Interessanterweise blieb die Expression der anderen untersuchten CAMs (VCAM-1 und E-Selektin) unbeeinflusst.

Tierexperimentell gibt es ebenfalls Hinweise auf einen in der Mikrozirkulation ablaufenden, präkonditionierenden Effekt von Morphin. Wang et al.¹⁴⁴ konnten bei Ratten den bereits von Schultz und Kollegen⁸⁰ sowie von anderen Arbeitsgruppen^{81-83,145,146} beschriebenen, präkonditionierenden Effekt von Morphin bestätigen. Dieser Effekt war in genannten Arbeiten unter anderem auf den Agonismus von Opioid-Rezeptoren, die Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), der mitogenaktivierten Proteinkinase (MAPK), der Proteinkinase C (PKC) und die Aktivierung von mitochondrialen K_{ATP} - und K_{Ca} -Kanälen zurückgeführt worden. Die Arbeitsgruppe um Wang konnte zusätzlich zeigen, dass die präkonditionierende Wirkung auch über eine Hemmung der Aktivierung neutrophiler Granulozyten und des Endothels bzw. über eine Reduktion der Neutrophilen-Endothel-Interaktion vermittelt wird, gemessen an den Serumkonzentrationen von ICAM-1, L-Selektin und der Aktivität der NEP (neutrophile Endopeptidase). Unsere Daten erhärten diese Vermutung. Die vorliegende Arbeit zeigt nämlich, dass durch Morphin die $\text{TNF}\alpha$ -induzierte $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Aktivität (Abb. 3.1, C) und die $\text{TNF}\alpha$ -induzierte ICAM-1-Expression auf mRNA-Ebene (Abb. 3.2, C) und auf Protein-Ebene (Abb. 3.5, C) in HUVEC signifikant reduziert wird. Unklar bleiben bislang die genauen Signalwege, die die Präkonditionierung durch Morphin

vermitteln. Es scheint sich um einen vielschichtig regulierten Prozess zu handeln, bei dem sowohl die oben genannten Proteinkinasen (PI3K, MAPK, PKC) und Kalium-Kanäle (K_{ATP} - und K_{Ca}) sowie periphere, aber auch zentrale Opioid-Rezeptoren¹⁴⁷ und die leukozytären (L-Selektin) und endothelialen (ICAM-1, VCAM-1) Adhäsionsmoleküle eine Rolle spielen. Zum genaueren Verständnis der Morphin-induzierten Präkonditionierung, die auch im Menschen induzierbar zu sein scheint¹⁴⁸, sind folglich weitere Untersuchungen notwendig.

4.1.2.2 VCAM-1

Auch die $TNF\alpha$ -induzierte mRNA- und Proteinexpression von VCAM-1 war in der vorliegenden Arbeit durch Xenon (Abb. 3.3, E, 3.6, E), Distickstoffmonoxid (Abb. 3.3, F, 3.6, F) und Isofluran (Abb. 3.3, H, 3.6, H) inhibierbar. Lediglich Morphin hatte keinen Effekt auf die Expression dieses Adhäsionsmoleküls (Abb. 3.3, G, 3.6, G). Erstaunlicherweise war in der vorliegenden Arbeit auch Distickstoffmonoxid in der Lage, die $TNF\alpha$ -induzierte Zunahme der $NF\kappa B$ -Aktivität und der ICAM-1- und VCAM-1-Expression effektiv zu unterdrücken, obwohl für dieses Gas *in vivo* keine kardioprotektive Wirkung nachgewiesen wurde¹²³.

Aus der Literatur gibt es vereinzelte Hinweise zur pharmakologischen Hemmung der VCAM-1-Expression. Biao et al.¹¹¹ zeigten in HUVEC eine Reduktion der mRNA-Expression für VCAM-1 nach Desfluran-Präkonditionierung. Min et al.¹⁴⁹ beschreiben in HUVEC eine durch Morphin nachweisbare Reduktion der ICAM-1-, VCAM-1- und E-Selektin-Expression durch den Überstand Lipopolysaccharid- (LPS-) stimulierter kolorektaler Tumorzellen (HCT 116). Direkt vergleichbare Arbeiten zu den hier dargestellten Ergebnissen liegen in der Literatur aktuell nicht vor.

4.1.2.3 E-Selektin

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass E-Selektin als einziges Adhäsionsmolekül durch alle verwendeten Pharmaka sowohl auf Ebene der Transkription als auch auf Ebene der Proteinexpression gänzlich unbeeinflusst blieb (Abb. 3.4, I-L, 3.7, I-L). Dies stimmt mit den Ergebnissen von Hisano et al.¹¹² überein. Sie konnten zeigen, dass Isofluran und Sevofluran zwar konzentrationsabhängig die Adhäsion der granulozytären Zelllinie HL-60 sowohl an mit E-Selektin bestückten Platten, als auch an $TNF\alpha$ -aktivierten HUVEC verringern können, aber dass hierbei die Expression von E-Selektin nicht verändert wird. Einen signifikanten Effekt auf die Reduktion der Adhäsion sowie keinen Effekt auf die E-Selektin-Expression zeigten in diesem Fall, anders als bei uns, etwas höhere als klinisch relevante Dosen der Anästhetika, nämlich für Isofluran und Sevofluran Werte zwischen 2,5 und 3,0 MAC. Hierbei muss erwähnt werden, dass es für Sevofluran Hinweise darauf gibt, dass es bereits bei Konzentrationen von 2 MAC zu einer Zunahme der leukozytären Adhäsion in der Mikrozirkulation kommen kann¹⁵³.

Ausgehend von den Daten von Hisano et al.¹¹² scheint es also auch andere Mechanismen zu geben, die unabhängig von der reinen Änderung der Adhäsionsmolekül-Expression die Interaktion zwischen Leukozyten und Endothel beeinflussen. Um diese reversiblen, scheinbar konzentrationsabhängigen und gegebenenfalls rein die Avidität zwischen den leukozytären und endothelialen Rezeptormolekülen vermindernenden Effekte der Anästhetika zu untersuchen und um den Stellenwert der verschiedenen nebeneinander expremierten Adhäsionsmoleküle hervorzuheben, sind weitere Untersuchungen notwendig.

Dass eine Reduktion der E-Selektin-Expression durch Anästhetika aber durchaus möglich ist konnten Biao et al.¹¹¹ in einem anderen Versuchsaufbau zeigen. Sie behandelten HUVEC für 60 Minuten mit 1 MAC Desfluran, bevor eine Stimulation mit TNF α erfolgte und die mRNA-Expression von ICAM-1 und VCAM-1 bzw. die Proteinexpression von ICAM-1 und E-Selektin bestimmt wurde. Auch sie untersuchten die Rate am Endothel adhärenter neutrophiler Granulozyten. Dabei konnten sie zeigen, dass sowohl die mRNA-Expression von ICAM-1 und VCAM-1 als auch die Proteinexpression von ICAM-1 und E-Selektin im Zeitverlauf reduziert werden konnte und die neutrophile Adhärenz dazu korrelierend absank.

4.1.2.4 Limitierung einer mikrovaskulären Präkonditionierung

Die in den Abschnitten 4.1.1 bis 4.1.2.3 erläuterten experimentellen Daten über den Einfluss verschiedener inhalativer Anästhetika und des Opiats Morphin auf die leukozytäre und endotheliale Adhäsionsmolekülexpression zeigen abermals, dass die Effekte der verschiedenen Substanzen stark vom Versuchsaufbau abhängen und legen damit nahe, dass Studien zur Schaffung exakter Anästhetika-Protokolle mit dem Ziel eines kardioprotektiven Effektes essentiell sind. Zudem ist die Übertragbarkeit der teils variierenden Ergebnisse dieser *in vitro* und *in vivo* Tier-Studien auf die im lebenden menschlichen Organismus ablaufenden pathophysiologischen Vorgänge eingeschränkt. Und auch die vorliegenden klinischen Studien (siehe Abschnitt 1.3.2.2) mit relativ kleinen Fallzahlen belegen bislang keinen eindeutigen Nutzen. Um letztlich einen Einfluss der kardioprotektiv wirkenden Substanzen auf die MACCE (*major adverse cardiovascular and cerebrovascular events*) und somit einen evidenten klinischen Nutzen zu untersuchen, sind weitere klinische Studien mit prospektivem Studiendesign, großen Fallzahlen, harten Endpunkten und Langzeitdaten notwendig.

Auch die Bedeutung des die Leukozyten-Adhäsion hemmenden Effektes der Anästhetika auf die tatsächliche Organschadenreduktion ist bislang unklar und es gilt herauszufinden, ob dieser Effekt tatsächlich klinisch relevant ist. So konnte in ICAM-1- und P-Selektin-defizienten *knock-out* Mäusen¹⁵⁰ nach einstündiger Ischämie gefolgt von mehrstündiger Reperfusion zwar eine bis zu 40 prozentige Reduktion der leukozytären Akkumulation im Myokard nachgewiesen werden (Beginn nach 3h, Maximum nach 24h und Abfall nach 72h),

ein nicht unerheblicher Teil, nämlich 60% der Leukozyten, konnte aber entsprechend rekrutiert werden und die Infarktgröße blieb im Vergleich zum Wildtyp unbeeinflusst. Dies ist als Hinweis darauf zu werten, dass die alleinige Reduktion der Adhäsionsmolekülexpression keinen suffizienten Schutz vor dem Ischämie-Reperfusionsschaden vermitteln kann.

Auch scheint es eine breite Variabilität in den molekularen Mechanismen der leukozytären Extravasation zu geben, die von dem jeweiligen Gewebe und Stimulus abhängig sind¹⁵¹, was unter anderem durch die unterschiedlichen Expressionsmuster der Adhäsionsmoleküle je nach betrachteter Mikrozirkulation¹⁵² und deren unterschiedliche Expressionskinetik²⁸ bedingt sein mag. Diese Hinweise auf eine variabel regulierte leukozytäre Extravasation könnten unter anderem auch die konträren Daten von Morisaki et al. erklären¹⁵³. Sie hatten unter hohen Konzentrationen (2 MAC) von Halothan und Sevofluran eine Zunahme der leukozytären Adhäsion in der mesenterialen Mikrozirkulation der Ratte darstellen können, die durch die Behandlung mit monoklonalen Antikörpern gegen P-Selektin und ICAM-1 aufhebbar war.

4.1.2.5 Rolle von NFκB in der Präkonditionierung

TNFα bewirkt in Endothelzellen eine Induktion der transkriptionellen Aktivität von NFκB und darüber eine Steigerung der endothelialen Expression von ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin^{7,25,26}. Führt eine pharmakologische Substanz zu einer Reduktion der Expression eines bestimmten Genproduktes, wie zum Beispiel von ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin, so muss erst einmal vermutet werden, dass diese pharmakologische Substanz auch eine verminderte Aktivität des primär verantwortlichen Transkriptionsfaktors vermittelt.

Wir konnten zeigen, dass sowohl die gasförmigen Anästhetika Xenon und Distickstoffmonoxid, als auch das volatile Anästhetikum Isofluran und das Opiat Morphin eine Reduktion der NFκB-Aktivität in humanen Nabelschnurendothelzellen zur Folge hatten (Abb. 3.1). Dies war allerdings nicht zwangsläufig mit einer verminderten Expression der untersuchten Genprodukte vergesellschaftet. So blieb die Expression von VCAM-1 durch Morphin (Abb. 3.3, G, 3.6, G) und die von E-Selektin durch alle untersuchten Substanzen (Abb. 3.4, 3.7) unbeeinflusst. Von einer einheitlichen Beeinflussung des transkriptionellen Verhaltens von NFκB durch die verschiedenen Substanzen ist somit nicht auszugehen, vielmehr kann aufgrund der zahlreichen möglichen Rahmenbedingungen und Einflussfaktoren eine differentielle Aktivität bzw. Regulierung der Transkription vermutet werden. Direkt vergleichbare Arbeiten hierzu liegen allerdings nicht vor.

Es stellt sich nun die Frage, welche Rolle die Beeinflussung des transkriptionellen Verhaltens von NFκB im Kontext der Präkonditionierung einnimmt.

Dass NFκB im Myokard durch Ischämie und anschließende Reperfusion aktiviert wird^{154,155} und dass diese Aktivierung zum Prozess der myokardialen Infarzierung¹⁵⁶ und zur

leukozytären Adhärenz mit entsprechender Parenchymschädigung¹⁵⁷ beiträgt, gilt als sicher, so dass eine Reduktion der NFκB-Aktivität als Teil eines kardioprotektiven Wirkprinzips gelten sollte. Diesem Verständnis entsprechend konnten Zhong et al.¹⁵⁸ durch eine Sevofluran-Präkonditionierung an isolierten Rattenherzen in einem Langendorff-Modell eine Reduktion der NFκB-Aktivität mit zudem verminderter Expression von ICAM-1, TNFα und der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (*inducible nitric oxide synthase*, iNOS) zeigen. Die hierbei nachweisbare verminderte Expression der proinflammatorischen Genprodukte als Folge der NFκB-Aktivitätshemmung, wurde als wichtiger Beitrag zur Generierung der Infarktgrößenreduktion im Rahmen des Ischämie-Reperfusionsschadens im Sinne einer frühen Präkonditionierung angesehen.

Anders scheint hingegen die Rolle der NFκB-Aktivität in der späten Phase der Präkonditionierung zu sein. Im Rattenmyokard lässt sich sowohl für die ischämische¹⁵⁹ als auch für die Morphin-⁸³ und Isofluran-induzierte¹⁶⁰ späte Präkonditionierung eine gesteigerte Aktivität des Transkriptionsfaktors nachweisen. Als Grund hierfür sahen Chen et al.¹⁶⁰ eine Hochregulation der iNOS an, deren Stellenwert in der späten Präkonditionierung belegt ist¹⁶¹. Dass vor allem die späte Phase der Präkonditionierung aufgrund der notwendigen zeitlichen Latenz bis zur Änderung der Proteinexpression von einer Änderung der Genexpression abhängt, ist bekannt⁵⁴, so dass die oben genannte Steigerung der NFκB-Aktivität mit folgender Transkription entsprechender Gene in diesem Kontext gut nachvollziehbar ist. Doch scheint es auch Mechanismen zu geben, die durch eine gesteigerte NFκB-Aktivität bzw. Proteinsynthese zur Entstehung der frühen Phase der Präkonditionierung beitragen^{162,163}, wenn auch eine proteinsyntheseunabhängige Wirkweise bislang vermutet wurde⁵³. Inwieweit eine Beeinflussung der endothelialen Adhäsionsmolekülexpression hierbei eine Rolle spielt, bleibt offen und auch unsere Daten klären diese Frage nicht abschließend.

Aus der Literatur²⁸ lässt sich belegen, dass in Endothelzellen (*in vitro*) nach TNFα-Stimulation die Oberflächenexpression von ICAM-1 nach ca. 12h, die von VCAM-1 nach ca. 6h und die von E-Selektin nach ca. 4h ihr Maximum erreicht. Entsprechend früher, nämlich ca. 1 bis 2h nach Stimulation beginnt der transkriptionelle Prozess zur *de-novo* Proteinsynthese der Adhäsionsmoleküle, da eine zytosolische Speicherung dieser Moleküle, wie die von P-Selektin in Weibel-Palade-Körpern, nicht existiert. Da der Stellenwert des leukozytär vermittelten myokardialen Parenchymschadens im Rahmen des Ischämie-Reperfusionsschadens belegt ist, stützen unsere Daten somit die Hinweise darauf, dass bereits in der frühen Phase der Präkonditionierung ein Teil des kardioprotektiven Effektes durch die Hemmung der Transkription proinflammatorischer Genprodukte vermittelt wird. Denn in unserer Arbeit konnte durch alle Pharmaka bereits nach 30 minütiger TNFα-Stimulation eine Reduktion der durch die Stimulation gesteigerten NFκB-Aktivität, und bereits

nach 5h eine Reduktion der Oberflächenexpression der Adhäsionsmoleküle nachgewiesen werden. Einschränkend muss abermals erwähnt werden, dass dies nur für die Reduktion der ICAM-1- und VCAM-1-Expression durch Xenon, Isofluran und Distickstoffmonoxid der Fall war und dass letztlich der Stellenwert dieses Effektes im Gesamtkontext der Präkonditionierung nicht geklärt ist.

Auch in unterschiedlichen Zellarten scheint es unterschiedliche Effekte der präkonditionierenden Substanzen auf die NF κ B-Aktivität zu geben. So bewirkt Morphin in aus menschlichem Blut gewonnenen neutrophilen Granulozyten und Monozyten eine Hemmung der LPS-induzierten nukleären Bindung von NF κ B¹⁶⁴. De Rossi et al.¹⁶⁵ hatten zeigen können, dass lediglich Isofluran (1 bzw. 2 MAC) die LPS-induzierte NF κ B-Aktivität und die TNF α - sowie IL-6-Freisetzung von Monozyten inhibieren kann, wohingegen Xenon (30 bzw. 60%) zu einer Steigerung der NF κ B-Aktivität und der TNF α - sowie IL-6-Freisetzung führte.

Mit der aktuell vorliegenden Literatur sowie unseren Daten lässt sich die Rolle von NF κ B im Kontext der myokardialen Präkonditionierung nicht abschließend klären. Es wird deutlich, dass es sich bei der Regulierung der proinflammatorischen Signalkaskade um einen vielschichtigen Prozess handelt, der durch zahlreiche Faktoren beeinflussbar ist.

4.1.2.6 Adhäsionsmolekülunabhängige Effekte

Trotz dieser teils widersprüchlichen Daten bezüglich des Einflusses der Anästhetika auf das Expressionsverhalten der CAM und dessen Regulierung gibt es weitere Effekte der Substanzen, die deren protektiven Aspekt im Rahmen des Ischämie-Reperfusionsschadens unterstreichen. So konnte experimentell gezeigt werden, dass Halothan und Isofluran HUVEC und glatte Gefäßmuskelzellen vor der TNF α - und Wasserstoffperoxid-induzierten Apoptose schützen können¹⁶⁶, ein Vorgang, der während des Ischämie-Reperfusionsschadens zur Schädigung der Mikrozirkulation beiträgt. Und auch Morphin reduziert *in vitro* die Apoptoserate pulmonal-arterieller Endothelzellen des Schweins nach Anoxie und Reoxygenierung¹⁶⁷ und *in vivo* die des Schweinemyokards¹⁶⁸. Allerdings ist auch hier nicht von absoluten, sondern von kontextbezogenen Effekten auszugehen, da auch eine Apoptoseinduktion experimentell beschrieben wurde¹⁶⁹.

In der vorliegenden Arbeit wurden diese adhäsionsmolekülunabhängigen Effekte im Kontext der Präkonditionierung nicht untersucht. Insgesamt sprechen die hier vorliegenden Daten unter Berücksichtigung der Literatur für einen Effekt der untersuchten Pharmaka, der das Myokard vor den Folgen des Ischämie-Reperfusionsschadens zu schützen scheint.

4.2 Methodenkritik

Ziel dieser Arbeit war es einen möglichen, in dem Kontext der Präkonditionierung bislang wenig untersuchten Effektor der Anästhetika Xenon, Distickstoffmonoxid und Isofluran und des Opiats Morphin, nämlich das Endothel, zu untersuchen. Mit der Ausnahme von Distickstoffmonoxid ist für diese Substanzen *in vivo* eine präkonditionierende Wirkung beschrieben. Hierbei wurde mit der TNF α -induzierten Adhäsionsmolekülexpression lediglich ein Teilaspekt der in der Mikrozirkulation ablaufenden pathophysiologischen Vorgänge betrachtet. Aufgrund der statischen Bedingungen eines *in vitro* Modells bleiben natürlich die Einflussfaktoren eines lebenden Organismus wie der Blutfluss, Scherkräfte, die Viskosität des Blutes, eine variable Hämodynamik und eine humorale Beeinflussung außen vor. Zudem verwendeten wir humane Nabelschnurendothelzellen, so dass eine sichere Aussage bezüglich des Expressionsverhalten in arteriellen Zellen und in der menschlichen Mikrozirkulation nicht möglich ist. Auch die *in vitro* letztlich effektiven Dosierungen der Pharmaka sind auf die Pharmakokinetik *in vivo* nicht übertragbar.

Dennoch konnten neue Wirkaspekte der untersuchten Substanzen aufgezeigt werden, was somit zum grundlegenden Verständnis des vielschichtig regulierbaren Prozesses der Adhäsionsmolekülexpression im Rahmen der pharmakologischen bzw. Anästhetika-induzierten Präkonditionierung beiträgt.

5 Literaturverzeichnis

- [1] Todesursachen in Deutschland 2010, Fachserie 12, Reihe 4, Statistisches Bundesamt, Wiesbaden 2012, erschienen am 23.09.2011, korrigiert am 29.06.2012. Artikelnummer: 2120400107004.
- [2] Mangano DT, Browner WS, Hollenberg M, London MJ, Tubau JF, Tateo IM: Association of perioperative myocardial ischemia with cardiac morbidity and mortality in men undergoing noncardiac surgery. *N Engl J Med* 1990; 323: 1781-1788
- [3] Sprung J, Abdelmalak B, Gottlieb A, Mayhew C, Hammel J, Levy PJ, O'Hara P, Hertzner NR: Analysis of risk factors for myocardial infarction and cardiac mortality after major vascular surgery. *Anesthesiology* 2000; 93:129-140
- [4] Kersten JR, Schmeling TJ, Pagel PS, Gross GJ, Warltier DC: Isoflurane mimics ischemic preconditioning via activation of K(ATP) channels: reduction of myocardial infarct size with an acute memory phase. *Anesthesiology* 1997; 87: 361-370
- [5] Rossen RD, Michael LH, Hawkins HK, Youker K, Dreyer WJ, Baughn RE, Entman ML: Cardiolipin-protein complexes and initiation of complement activation after coronary artery occlusion. *Circ Res* 1994; 75: 546-555
- [6] Carden DL, Granger DN: Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury. *J Pathol* 2000; 190: 255-266
- [7] Collins T, Read MA, Neish AS, Whitley MZ, Thanos D, Maniatis T: Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB J* 1995; 9: 899-909
- [8] Granger DN: Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol* 1988; 255: H11269-H11275
- [9] Yoshida N, Granger DN, Anderson DC, Rothlein R, Lane C, Kvietys PR: Anoxia/reoxygenation-induced neutrophil adherence to cultured endothelial cells. *Am J Physiol* 1992; 262: H1891-H1898
- [10] Smith CW, Marlin SD, Rothlein R, Toman C, Anderson DC: Cooperative interactions of LFA-1 and MAC-1 with intercellular adhesion molecule-1 in facilitating adherence and transendothelial migration of human neutrophils in vitro. *J Clin Invest* 1989; 83: 2008-2017
- [11] Smith CW, Rothlein R, Hughes BJ, Mariscalco MM, Rudloff HE, Schmalstieg FC, Anderson DC: Recognition of an endothelial determinant for CD18-dependent human neutrophil adherence and transendothelial migration. *J Clin Invest* 1988; 82: 1746-1756
- [12] Rui T, Cepinskas G, Feng Q, Ho YS, Kvietys PR: Cardiac myocytes exposed to anoxia-reoxygenation promote neutrophil transendothelial migration. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 281: H440-H447

- [13] Kukiela GL, Hawkins HK, Michael L, Manning AM, Youker K, Lane C, Entman ML, Smith CW, Anderson DC: Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in ischemic and reperfused canine myocardium. *J Clin Invest* 1993; 92: 1504-1516
- [14] Horie Y, Wolf R, Anderson DC, Granger DN: Hepatic leukostasis and hypoxic stress in adhesion molecule deficient mice after gut ischemia-reperfusion. *J Clin Invest* 1997; 99: 781-788
- [15] Salas A, Panes J, Elizalde JL, Granger DN, Pique JM: Reperfusion-induced oxidative stress in diabetes: cellular and enzymatic sources. *J Leuk Biol* 1999; 66: 59-66
- [16] Collard CD, Gelman S: Pathophysiology, clinical manifestation and prevention of ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology* 2001; 94: 1133-1138
- [17] Kupatt C, Habazettl H, Goedecke A, Wolf DA, Zahler S, Boekstegers P, Kelly RA, Becker BF: Tumor necrosis factor contributes to ischemia- and reperfusion-induced endothelial activation in isolated hearts. *Circ Res* 1999; 84: 392-400
- [18] Squadrito F, Altavilla D, Zingarelli B, Ioculano M, Calapai G, Campo GM, Miceli A, Caputi AP: Tumor necrosis factor involvement in myocardial ischaemia-reperfusion injury. *Eur J Pharmacol* 1993; 237: 223-230
- [19] Hehlhans T, Pfeffer K: The intriguing biology of the tumor necrosis factor/tumor necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* 2005; 115: 1-20
- [20] Lum H, Malik AB: Mechanisms of increased endothelial permeability. *Can J Physiol Pharmacol* 1996; 74: 787-800
- [21] Gimbrone MA Jr, Nagel T, Topper JN: Biomechanical activation: An emerging paradigm in endothelial adhesion biology. *J Clin Invest* 1997; 100: S61-S65
- [22] Mackay F, Loetscher HR, Stueber D, Gehr G, Lesslaue W: Tumor necrosis factor α (TNF α)-induced cell adhesion to human endothelial cells is under dominant control of one TNF receptor type, TNF-R55. *J Exp Med* 1993; 177: 1277-1286
- [23] True AL, Rahman A, Malik AB: Activation of NF- κ B induced by H₂O₂ and TNF- α and its effects on ICAM-1 expression in endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000, 279: L302-L311
- [24] Collins T, Read MA, Neish AS, Whitley MZ, Thanos D, Maniatis T: Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF- κ B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB J* 1995; 9: 899-909
- [25] Karin M: How NF- κ B is activated: the role of the I κ B kinase (IKK) complex. *Oncogene* 1999; 18: 6867-6874
- [26] De Martin R, Hoeth M, Hofer-Warbinek R, Schmid JA: The transcription factor NF- κ B and the regulation of vascular cell function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: E83-E88

- [27] Aplin AE, Howe A, Alahari SK, Juliano RL: Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol Rev* 1998; 50: 197-263
- [28] Carlos TM, Harlan JM: Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 1994; 84: 2068-2101
- [29] Dustin ML, Kothlein K, Bhan AK, Dinarello CA, Springer TA: Induction by IL-1 and interferon- γ : tissue distribution, biochemistry and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J Immunol* 1986; 137: 245
- [30] Cybulsky MI, Fries JWU, Williams AJ, Sultan P, Davis VM, Gimbrone MA Jr, Collins T: Alternative splicing of human VCAM-1 in activated vascular endothelium. *Am J Pathol* 1991; 138: 815
- [31] Hession C, Tizard R, Vassallo C, Schiffer SB, Goff D, Moy P, Chi-Rosso G, Luhowskyj S, Lobb R, Osborn L: Cloning of an alternate form of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM1). *J Biol Chem* 1991; 266: 6682-6685
- [32] Luu NT, Rainger GE, Buckley CD, Nash GB: CD31 regulates direction and rate of neutrophil migration over and under endothelial cells. *J Vasc Res* 2003; 40: 467-479
- [33] Bevilacqua MP, Nelson RM: Selectins. *J Clin Invest* 1993; 91: 379-387
- [34] Lasky LA: Selectins: Interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation. *Science* 1992; 258: 964-969
- [35] Shen I, Verrier ED: Expression of E-Selectin on coronary endothelium after myocardial ischemia and reperfusion. *J Card Surg* 1994; 9: 437-441
- [36] Belvilaqua MP, Stengelin S, Gimbrone MA Jr, Seed B: Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science* 1989; 243: 1160-1165
- [37] Steegmaier M, Levinovitz A, Isenmann S, Borges E, Lenter M, Kocher HP, Kleuser B, Vestweber D: The E-selectin-ligand ESL-1 is a variant of a receptor for fibroblast growth factor. *Nature* 1995; 373: 615-620
- [38] Braunwald E, Kloner RA: The stunned myocardium: Prolonged, postischemic ventricular dysfunction. *Circulation* 1982; 66: 1146-1149
- [39] Flameng W, Suy R, Schwarz F: Ultrastructural correlates of left ventricular contraction abnormalities in patients with chronic ischemic heart disease: Determinants of reversible segmental asynergy postrevascularization surgery. *Am Heart J* 1981; 102: 846-857
- [40] Heusch G, Schulz R: Hibernating myocardium: a review. *J Mol Cell Cardiol* 1996; 28: 2359-2372

- [41] Murry CE, Jennings RB, Reimer KA: Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986; 74: 1124-1136
- [42] Marber MS: Ischemic preconditioning in isolated cells. *Circ Res* 2000; 86: 926-931
- [43] Walker DM, Walker JM, Pugsley WB, Pattison CW, Yellon DM: Preconditioning in isolated superfused human muscle. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27: 1349-1357
- [44] Osborne D, Aw T, Cepinskas G, Kvietys P: Development of ischemia/reperfusion tolerance in the rat small intestine. An epithelium-independent event. *J Clin Invest* 1994; 94: 1910-1918
- [45] Heurteaux C, Lauritzen I, Widmann C, Lazdunski M: Essential role of adenosine, adenosine A1 receptors and ATP-sensitive K-channels in cerebral ischemic preconditioning. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 4666-4670
- [46] Peralta C, Closa D, Xaus C, et al.: Hepatic preconditioning in rats is defined by a balance of adenosine and xanthine. *Hepatology* 1998; 28: 768-773
- [47] Przyklenk K, Kloner RA: Ischemic preconditioning: exploring the paradox. *Prog Cardiovasc Dis* 1998; 40: 517-547
- [48] Li G, Chen S, Lu G, et al.: Cardiac ischemic preconditioning improves lung preservation in valve replacement operations. *Ann Thorac Surg* 2001; 71: 631-635
- [49] Torras J, Herrero-Fresneda I, Lloberas N, et al.: Promising effects of ischemic preconditioning in renal transplantation. *Kidney Int* 2002; 61: 2218-2227
- [50] Jerome S, Akimitsu T, Gute D, Korthuis R: Ischemic preconditioning attenuates capillary no-reflow induced by ischemia and reperfusion. *Am J Physiol* 1995; 268: 2063-2067
- [51] Korthuis RJ, Gute DC, Cepinska G, Kvietys PR: Cellular mechanisms of acute versus delayed preconditioning. *Pathophysiology* 1998; 5: 35-48
- [52] Downey J, Cohen M, Ytrehus K, Liu Y: Cellular mechanisms in ischemic preconditioning: the role of adenosine and protein kinase C. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 723: 82-98
- [53] Thornton J, Striplin S, Liu GS, Swafford A, Stanley AW, Van Winkle DM, Downey JM: Inhibition of protein synthesis does not block myocardial protection afforded by preconditioning. *Am J Physiol* 1990; 259: H1822-H1825
- [54] Rizvi A, Tang XL, Qiu YM, Xuan YT, Takano H, Jadoon AK, Bolli R: Increased protein synthesis is necessary for the development of late preconditioning against myocardial stunning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1999; 46: H874-H884
- [55] Bowling N, Walsh RA, Song G, Estridge T, Sandusky GE, Fouts RL, Mintze K, Pickard T, Roden R, Bristow MR, Sabbah HN, Mizrahi JL, Gromo G, King GL, Vlahos CJ: Increased protein kinase C activity and expression of Ca²⁺-sensitive isoforms in the failing human heart. *Circulation* 1999; 99: 384-391

- [56] O'Rourke B: Myocardial K(ATP) channels in preconditioning. *Circ Res* 2000; 87: 845-855
- [57] Jerome SN, Akimitsu T, Gute DC, Korthuis RJ: Ischemic preconditioning attenuates capillary no-reflow induced by prolonged ischemia and reperfusion. *Am J Physiol* 1995; 268: H2063-H2067
- [58] Kitakaze M, Hori M, Morioka M: Infarct size-limiting effect of ischemic preconditioning is blunted by inhibition of 5'-nucleotidase activity and attenuation of adenosine release. *Circulation* 1994; 89: 1237-1246
- [59] Lu D, Maulik N, Moraru I, Kreutzer D, Das D: Molecular adaptation of vascular endothelial cells to oxidative stress. *Am J Physiol* 1993; 264: C715-C722
- [60] Yamashita N, Nishida M, Hoshida S: Induction of manganese superoxide dismutase in rat cardiac myocytes increases tolerance to hypoxia 24 h after preconditioning. *J Clin Invest* 1994; 94: 2193-2199
- [61] Marber M, Yellon D: Myocardial adaptation, stress proteins and the second window of protection. *Ann N Y Acad Sci* 1996; 793: 123-141
- [62] Sakamoto K, Urushidani T, Nagao T: Translocation of HSP27 to sarcomere induced by ischemic preconditioning in isolated rat hearts. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 269: 137-142
- [63] Wang NP, Bufkin BL, Nakamura M, Zhao ZQ, Wilcox JN, Hewan-Lowe KO, Guyton RA, Vinten-Johansen J: Ischemic preconditioning reduces neutrophil accumulation and myocardial apoptosis. *Ann Thorac Surg* 1999; 67: 1689-1695
- [64] Richard V, Kaeffer N, Tron C, Thuillez C: Ischemic preconditioning protects against coronary endothelial dysfunction induced by ischemia and reperfusion. *Circulation* 1994; 89: 1254-1261
- [65] DeFily DV, Chillian WM: Preconditioning protects coronary arteriolar endothelium against ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol* 1993; 265: H700-H706
- [66] Kaeffer N, Richard V, Henry JP, Thuillez C: Preconditioning prevents chronic reperfusion-induced coronary endothelial dysfunction in rats. *Am J Physiol* 1996; 271: H842-H849
- [67] Zhou X, Zhai X, Ashraf M: Preconditioning of bovine endothelial cells: the protective effect is mediated by an adenosine A2 receptor through a protein kinase C signaling pathway. *Circ Res* 1996; 78: 73-91
- [68] Beauchamp P, Richard V, Tamion F, Lallemand F, Lebreton JP, Vaudry H, Daveau M, Thuillez C: Protective effects of preconditioning in cultured rat endothelial cells: effects on neutrophil adhesion and expression of ICAM-1 after anoxia and reoxygenation. *Circulation* 1999; 100: 541-546

- [69] Zahler S, Kupatt C, Becker BF: Endothelial preconditioning by transient oxidative stress reduces inflammatory responses of cultured endothelial cells to TNF- α . *FASEB J* 2000; 14: 555-564
- [70] Weber NC, Preckel B, Schlack W: The effect of anaesthetics on the myocardium: new insights into myocardial protection. *Eur J Anaesthesiol* 2005; 22: 647-657
- [71] Pratt PF Jr, Wang C, Weihrauch D, Bienengraeber MW, Kersten JR, Pagel PS, Warltier DC: Cardioprotection by volatile anesthetics: new applications for old drugs? *Curr Opin Anaesthesiol* 2006; 19: 397-403
- [72] Cason BA, Gamperl AK, Slocum RE, Hickey RF: Anesthetic induced preconditioning: previous administration of isoflurane decreases myocardial infarct size in rabbits. *Anesthesiology* 1997; 87: 1182-1190
- [73] Zaugg M, Lucchinetti E, Spahn DR, Pasch T, Schaub MC: Volatile anesthetics mimic cardiac preconditioning by priming the activation of mitochondrial K-ATP-Channels via multiple signaling pathways. *Anesthesiology* 2002; 97: 4-14
- [74] Bland JH, Lowenstein E: Halothane-induced decrease in experimental myocardial ischemia in the non-failing canine heart. *Anesthesiology* 1976; 45: 287-293
- [75] Novalija E, Fujita S, Kampine JP, Stowe DF: Sevoflurane mimics ischemic preconditioning effects on coronary flow and nitric oxide release in isolated hearts. *Anesthesiology* 1999; 91: 701-712
- [76] Roscoe AK, Christensen JD, Lynch C 3rd: Isoflurane, but not halothane, induces protection of human myocardium via adenosine A1 receptors and adenosine triphosphate-sensitive potassium channels. *Anesthesiology* 2000; 92: 1692-1701
- [77] Toller WG, Kersten JR, Pagel PS, Hettrick DA, Warltier DC: Sevoflurane reduces myocardial infarct size and decreases the time threshold for ischemic preconditioning in dogs. *Anesthesiology* 1999; 91: 1437-1446
- [78] Piruoi V, Chiari P, Lhuillier F, Bastien O, Loufoua J, Raisky O, David JS, Ovize M, Lehot JJ: Pharmacological preconditioning: comparison of desflurane, sevoflurane, isoflurane and halothane in rabbit myocardium. *Br J Anaesth* 2002; 89: 486-491
- [79] Müllenheim J, Ebel D, Bauer M, Otto F, Heinen A, Fräßdorf J, Preckel B, Schlack W: Sevoflurane confers additional cardioprotection after ischemic late preconditioning in rabbits. *Anesthesiology* 2003; 99: 624-631
- [80] Schultz JE, Hsu AK, Gross GJ: Morphine mimics the cardioprotective effect of ischemic preconditioning via a glibenclamid-sensitive mechanism in the rat heart. *Circ Res* 1996; 78: 1100-1104
- [81] Gross GJ: Role of opioids in acute and delayed preconditioning. *J Mol Cell Cardiol* 2003; 35: 709-718

- [82] Fräßdorf J, Huhn R, Niersmann C, Weber NC, Schlack W, Preckel B, Hollmann MW: Morphine induces preconditioning via activation of mitochondrial K_{Ca} channels. *Can J Anesth* 2010; 57: 767-773
- [83] Fräßdorf J, Weber NC, Obal D, Toma O, Müllenheim J, Kojda G, Preckel B, Schlack W: Morphine induces late cardioprotection in rat hearts in vivo: the involvement of opioid receptors and nuclear transcription factor κB . *Anesth Analg* 2005; 101: 934-941
- [84] Da Silva R, Lucchinetti E, Pasch T, Schaub MC, Zaugg M: Ischemic but not pharmacological preconditioning elicits a gene expression profile similar to unprotected myocardium. *Physiol Genomics* 2004; 20: 117-130
- [85] Belhomme D, Peynet J, Louzy M, Launay JM, Kitakaze M, Menasche P: Evidence for preconditioning by isoflurane in coronary artery bypass graft surgery. *Circulation* 1999; 100: II340-II344
- [86] De Hert SG, Ten Broecke PW, Mertens E, Van Sommeren EW, De Blier IG, Stockman BA, Rodrigus IE: Sevoflurane but not propofol preserves myocardial function in coronary surgery patients. *Anesthesiology* 2002; 97: 42-49
- [87] Julier K, Da Silva R, Garcia C: Preconditioning by sevoflurane decreases biochemical markers for myocardial and renal dysfunction in coronary artery bypass graft surgery: a double-blinded, placebo-controlled, multicenter study. *Anesthesiology* 2003; 98: 1315-1327
- [88] Guarracino F, Landoni G, Tritapepe L, Pompei F, Leoni A, Aletti G, Scandroglio M, Maselli D, De Luca M, Marchetti C, Crescenzi C, Zangrillo A: Myocardial damage prevented by volatile anesthetics: a multicenter randomized controlled study. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2006; 20: 477-483
- [89] Tritapepe L, Landoni G, Guarracino F, Pompei F, Crivellari M, Maselli D: Cardiac protection by volatile anaesthetics: a multicenter randomized controlled study in patients undergoing coronary artery bypass grafting with cardiopulmonary bypass. *Eur J Anaesthesiol* 2007; 24: 323-331
- [90] Fräßdorf J, Borowski A, Ebel D, Feindt P, Hermes M, Meemann T, Weber R, Müllenheim J, Weber NC, Preckel B, Schlack W: Impact of preconditioning protocol on anesthetic-induced cardioprotection in patients having coronary artery bypass surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2009; 137: 1436-1442
- [91] Symons JA, Myles PS: Myocardial protection with volatile anaesthetic agents during coronary artery bypass surgery: a meta-analysis. *Br J Anaesth* 2006; 97: 127-136
- [92] De Hert SG, Van der Linden PJ, Cromheecke S: Cardioprotective properties of sevoflurane in patients undergoing coronary surgery with cardiopulmonary bypass are related to the modalities of its administration. *Anesthesiology* 2004; 101: 299-310

- [93] De Hert SG, Van der Linden PJ, Cromheecke S: Choice of primary anesthetic regimen can influence intensive care unit length of stay after coronary surgery with cardiopulmonary bypass. *Anesthesiology* 2004; 101: 9-20
- [94] Landoni G, Biondi-Zoccai GGL, Zangrillo A, Bignami E, D'Avolio S, Marchetti C, Calabro MG, Fochi O, Guarracino F, Tritapepe L, De Hert SG, Torri G: Desflurane and sevoflurane in cardiac surgery: a meta-analysis of randomized clinical trials. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2007; 21: 502-511
- [95] Garcia C, Julier K, Bestmann L, Zollinger A, von Segesser LK, Pasch T, Spahn DR, Zaugg M: Preconditioning with sevoflurane decreases PECAM-1 expression and improves one-year cardiovascular outcome in coronary artery bypass graft surgery. *Br J Anaesth* 2005; 94: 159-165
- [96] Serebruany VL, Gurbel PA: Effect of thrombolytic therapy on platelet expression and plasma concentration of PECAM-1 in patients with acute myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 153-158
- [97] Gumina RJ, el Schultz J, Yao Z, Kenny D, Warltier DC, Newman PJ, Gross GJ: Antibody to PECAM-1 reduces myocardial infarct size in a rat model of ischemia-reperfusion. *Circulation* 1996; 94: 3327-3333
- [98] Gurbel PA, Serebruany VL, Shustov AR, Dalesandro M, Gumbs CI, Grablutz LB, Bahr RD, Ohman EM, Topol EJ: Increased baseline levels of platelet p-selectin and platelet endothelial adhesion molecule-1 in patients with acute myocardial infarction as predictors of unsuccessful thrombolysis. *Coronary Artery Dis* 1998; 9: 452-456
- [99] De Hert SG, Turani F, Mathur S, Stowe DF: Cardioprotection with volatile anesthetics: mechanisms and clinical implications. *Anesth Analg* 2005; 100: 1584-1593
- [100] Weber NC, Schlack W: Inhalational anaesthetics and cardioprotection. *Handb Exp Pharmacol* 2008; 182: 187-207
- [101] Fräßdorf J, De Hert SG, Schlack W: Anaesthesia and myocardial ischaemia/reperfusion injury. *Br J Anaesth* 2009; 103: 89-98
- [102] Sergeev P, da Silva R, Lucchinetti E, Zaugg K, Pasch T, Schaub MC, Zaugg M: Trigger-dependent gene expression profiles in cardiac preconditioning: evidence for distinct genetic programs in ischemic and anesthetic preconditioning. *Anesthesiology* 2004; 100: 474-488
- [103] Weber NC, Toma O, Wolter JI, Obal D, Müllenheim J, Preckel B, Schlack W: The noble gas xenon induces pharmacological preconditioning in the rat heart in vivo via induction of PKC-epsilon and p38 MAPK. *Br J Pharmacol* 2005; 144: 123-132
- [104] Weber NC, Toma O, Wolter JI, Wirthle NM, Schlack W, Preckel B: Mechanisms of xenon- and isoflurane-induced preconditioning: a potential link to the cytoskeleton via the MAPKAPK-2/HSP27 pathway. *Br J Pharmacol* 2005; 146: 445-455

- [105] Cohen MV, Yang XM, Liu GS, Heusch G, Downey JM: Acetylcholine, bradykinin, opioids, and phenylephrine, but not adenosine, trigger preconditioning by generating free radicals and opening mitochondrial K(ATP) channels. *Circ Res* 2001; 89: 273-278
- [106] Murphy E, Steenbergen C: Preconditioning: the mitochondrial connection. *Annu Rev Physiol* 2007; 69: 51-67
- [107] Kowalski C, Zahler S, Becker BF, Flaucher A, Conzen PF, Gerlach E, Peter K: Halothane, isoflurane, and sevoflurane reduce postischemic adhesion of neutrophils in the coronary system. *Anesthesiology* 1997; 86: 188-195
- [108] Möbert J, Zahler S, Becker BF, Conzen PF: Inhibition of neutrophil activation by volatile anesthetics decreases adhesion to cultured human endothelial cells. *Anesthesiology* 1999; 90: 1372-1381
- [109] Heindl B, Reichle FM, Zahler S, Conzen PF, Becker BF: Sevoflurane and isoflurane protect the reperfused guinea pig heart by reducing postischemic adhesion of polymorphonuclear neutrophils. *Anesthesiology* 1999; 91: 521-530
- [110] De Rossi LW, Horn NA, Stevanovic A, Buhre W, Hutschenreuter G, Rossaint R: Xenon modulates neutrophil adhesion molecule expression in vitro. *Eur J Anaesthesiol* 2004; 21: 139-143
- [111] Biao Z, Zhanggang X, Hao J, Changhong M, Jing C: The in vitro effect of desflurane preconditioning on endothelial adhesion molecules and mRNA expression. *Anesth Analg* 2005; 100: 1007-1013
- [112] Hisano T, Namba T, Hashiguchi-Ikeda M, Ito T, Hirota K, Fukuda K: Inhibition of E-selectin-mediated leukocyte adhesion by volatile anesthetics in a static condition. *J Anesth* 2005; 19: 1-6
- [113] Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR: Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. *Journ of Clin Invest* 1973; 52: 2745-2756
- [114] Kerr LD: Electrophoretic mobility shift assay. *Methods Enzymol* 1995; 254: 619-632
- [115] Schreiber E, Matthias P, Müller MM, Schaffner W: Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Research* 1989; 17: 6419
- [116] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275
- [117] Mullis KB, Faloona FA: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987; 155: 335-350
- [118] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 3. Auflage, 2000, ISBN: 0879695773

- [119] Kiemer AK, Weber NC, Vollmar AM: Induction of I κ B: atrial natriuretic peptide as a regulator of the NF- κ B pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 295: 1068-1076
- [120] Bonner WA, Hulett HR, Sweet RG, Herzenberg LA: Fluorescence-activated cell sorting. *Rev Sci Instrum* 1972; 43: 404-409
- [121] Herzenberg LA, Sweet RG, Herzenberg LA: Fluorescence-activated cell sorting. *Sci Am* 1976; 234: 108-117
- [122] Weber NC, Kandler J, Schlack W, Grüber Y, Frässdorf J, Preckel B: Intermittent pharmacological pretreatment by xenon, isoflurane, nitrous oxide and the opioid morphine prevents tumor necrosis factor α -induced adhesion molecule expression in human umbilical vein endothelial cells. *Anesthesiology* 2008; 108: 1-9
- [123] Weber NC, Toma O, Awan S, Frässdorf J, Preckel B, Schlack W: Effects of nitrous oxide on the rat heart in vivo: another inhalational anesthetic that preconditions the heart? *Anesthesiology* 2005; 103: 1174-1182
- [124] Ma XL, Tsao PS, Lefer AM: Antibody to CD18 exerts endothelial and cardiac protective effects in myocardial ischemia and reperfusion. *J Clin Invest* 1991; 88: 1237-1243
- [125] Ma XL, Lefer DJ, Lefer AM, Rothlein R: Coronary endothelial and cardiac protective effects of a monoclonal antibody to intercellular adhesion molecule-1 in myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation* 1992; 86: 937-946
- [126] Lefer DJ, Shandelya SM, Serrano Jr CV, Becker LC, Kuppusamy P, Zweier JL: Cardioprotective actions of a monoclonal antibody against CD-18 in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Circulation* 1993; 88: 1779-1787
- [127] Yamazaki T, Seko Y, Tamatani T, Miyasaka M, Yagita H, Okumura K, Nagai R, Yazaki Y: Expression of intercellular adhesion molecule-1 in rat heart with ischemia/reperfusion and limitation of infarct size by treatment with antibodies against cell adhesion molecules. *Am J Pathol* 1993; 143: 410-418
- [128] Hartman JC, Anderson DC, Wiltse AL, Lane CL, Rosenbloom CL, Manning AM, Humphrey WR, Wall TM, Shebuski RJ: Protection of ischemic/reperfused canine myocardium by CL18/6, a monoclonal antibody to adhesion molecule ICAM-1. *Cardiovasc Res* 1995; 30: 47-54
- [129] Aversano T, Zhou W, Nedelman M, Nakada M, Weisman H: A chimeric IgG4 monoclonal antibody directed against CD18 reduces infarct size in a primate model of myocardial ischemia and reperfusion. *J Am Coll Cardiol* 1995; 25: 781-788
- [130] Arai M, Lefer DJ, So T, DiPaula A, Aversano T, Becker LC: An anti-CD18 antibody limits infarct size and preserves left ventricular function in dogs with ischemia and 48 hour reperfusion. *J Am Coll Cardiol* 1996; 27: 1278-1285

- [131] Lefer DJ, Flynn DM, Anderson DC, Buda AJ: Combined inhibition of p-selectin and ICAM-1 reduces myocardial injury following ischemia and reperfusion. *Am J Physiol* 1996; 271: H2421-H2429
- [132] Zhao ZQ, Lefer DJ, Sato H, Hart KK, Jeffords PR, Vinten-Johansen J: Monoclonal antibody to ICAM-1 preserves postischemic blood flow and reduces infarct size after ischemia-reperfusion in rabbit. *J Leukoc Biol* 1997; 62: 292-300
- [133] Palazzo AJ, Jones SP, Girod WG, Anderson DC, Granger DN, Lefer DJ: Myocardial ischemia-reperfusion injury in CD18- and ICAM-1-deficient mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1998; 275: H2300-H2307
- [134] Preckel B, Müllenheim J, Moloschavij A, Thämer V, Schlack W: Xenon administration during early reperfusion reduces infarct size after regional ischemia in the rabbit heart in vivo. *Anesth Analg* 2000; 91: 1327-1332
- [135] Bedi A, McBride WT, Armstrong MA, Murray JM, Fee JP: Xenon has no effect on cytokine balance and adhesion molecule expression within an isolated cardiopulmonary bypass system. *Br J Anaesth* 2002; 89: 546-550
- [136] De Rossi LW, Horn NA, Buhre W, Gass F, Hutschenreuter G, Rossaint R: The effect of isoflurane on neutrophil selectin and beta(2)-integrin activation in vitro. *Anesth Analg* 2002; 95: 583-587
- [137] Fröhlich D, Rothe G, Wittmann S, Schmitz G, Schmid P, Taeger K, Hobbhahn J: Nitrous oxide impairs the neutrophil oxidative response. *Anesthesiology* 1998; 88: 1281-1290
- [138] Weber NC, Toma O, Wolter JI, Obal D, Müllenheim J, Preckel B, Schlack W: The noble gas xenon induces pharmacological preconditioning in the rat heart in vivo via induction of PKC-epsilon and p38 MAPK. *Br J Pharmacol* 2005; 144: 123-132
- [139] Lucchinetti E, Ambrosio S, Aguirre J, Herrmann P, Harter L, Keel M, Meier T, Zaugg M: Sevoflurane inhalation at sedative concentrations provides endothelial protection against ischemia-reperfusion injury in humans. *Anesthesiology* 2007; 106: 262-268
- [140] Riess ML, Kevin LG, Camara AKS, Heisner JS, Stowe DF: Dual exposure to sevoflurane improves anesthetic preconditioning in intact hearts. *Anesthesiology* 2004; 100: 569-574
- [141] Wang TL, Chang H, Hung CR, Tseng YZ: Attenuation of neutrophil and endothelial activation by intravenous morphine in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1997; 80: 1532-1535
- [142] Min TJ, Kim J, Kim JH, Noh KH, Kim TW, Kim WY, Lee YS, Park YC: Morphine postconditioning attenuates ICAM-1 expression on endothelial cells. *J Korean Med Sci* 2010; 26: 290-296

- [143] Chen Z, Li T, Zhang B: Morphine postconditioning protects against reperfusion injury in the isolated rat hearts. *J Surg Res* 2008; 145: 287-294
- [144] Wang TL, Chang H, Hung CR, Tseng YZ: Morphine preconditioning attenuates neutrophil activation in rat models of myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 1998; 40: 557-563
- [145] Gross ER, Hsu AK, Gross GJ: Opioid-induced cardioprotection occurs via glycogen synthase kinase beta inhibition during reperfusion in intact rat hearts. *Circ Res* 2004; 94: 960-966
- [146] Peart JN, Gross GJ: Cardioprotective effects of acute and chronic opioid treatment are mediated via different signaling pathways. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 291: H1746-H1753
- [147] Lu Y, Dong C, Yu J, Li L: Role of central and peripheral opioid receptors in the cardioprotection of intravenous morphine preconditioning. *Ir J Med Sci* 2011; 180: 881-885
- [148] Kim JM, Jang YH, Kim J: Morphine and remifentanyl-induced cardioprotection: its experimental and clinical outcomes. *Korean J Anesthesiol* 2011; 61: 358-366
- [149] Min TJ, Park SH, Ji YH, Lee YS, Kim TW, Kim JH, Kim WY, Park YC: Morphine attenuates endothelial cell adhesion molecules induced by the supernatant of LPS-stimulated colon cancer cells. *J Korean Med Sci* 2011; 26: 747-752
- [150] Briaud SA, Ding ZM, Michael LH, Entman NL, Daniel S, Ballantyne CM: Leukocyte trafficking and myocardial reperfusion injury in ICAM-1/P-selectin-knockout mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280: H60-H67
- [151] Bullard DC, Qin L, Lorenzo I, Quinlin WM, Doyle NA, Bosse R, Vestweber D, Doerschuk CM, Beaudet AL: P-selectin/ICAM-1 double mutant mice: acute emigration of neutrophils into the peritoneum is completely absent but is normal into pulmonary alveoli. *J Clin Invest* 1995; 95: 1782-1788
- [152] Hickey MJ, Kanwar S, McCafferty DM, Granger DN, Eppihimer MJ, Kubes P: Varying roles of E-selectin and P-selectin in different microvascular beds in response to antigen. *J Immunol* 1999; 162: 1137-1143
- [153] Morisaki H, Suematsu M, Wakabayashi Y, Morooka S, Fukushima K, Ishimura Y, Takeda J: Leukocyte-endothelium interaction in the rat mesenteric microcirculation during halothane or sevoflurane anesthesia. *Anesthesiology* 1997; 87: 591-598
- [154] Shimizu N, Yoshiyama M, Omura T, Hanatani A, Kim S, Takeuchi K, Iwao H, Yoshikawa J: Activation of mitogen-activated protein kinases and activator protein-1 in myocardial infarction in rats. *Cardiovasc Res* 1998; 38: 116-124
- [155] Li C, Browder W, Kao RL: Early activation of transcription factor NF- κ B during ischemia in perfused rat heart. *Am J Physiol* 1999; 276: H543-H552

- [156] Morishita R, Sugimoto T, Aoki M, Kida I, Tomita N, Moriguchi A, Maeda K, Sawa Y, Kaneda Y, Higaki J, Ogihara T: In vivo transfection of cis element “decoy” against nuclear factor-kB binding site prevents myocardial infarction. *Nat Med* 1997; 3: 894-899
- [157] Sawa Y, Morishita R, Suzuki K, Kagisaki K, Kaneda Y, Maeda K, Kadoba K, Matsuda H: A novel strategy for myocardial protection using in vivo transfection of cis element “Decoy” against NFkB binding site. *Circulation* 1997; 96: II-280-4; discussion II-285
- [158] Zhong C, Zhou Y, Liu H: Nuclear Factor kB and anesthetic preconditioning during myocardial ischemia-reperfusion. *Anesthesiology* 2004; 100: 540-546
- [159] Xuan YT, Tang XL, Banerjee S, Takano H, Li RC, Han H, Qiu Y, Li JJ, Bolli R: Nuclear factor-kappa B plays an essential role in the late phase of ischemic preconditioning in conscious rabbits. *Circ Res* 1999; 84: 1095-1109
- [160] Chen CH, Chuang JH, Liu K, Chan JYH: Nitric oxide triggers delayed anesthetic preconditioning-induced cardiac protection via activation of NFkB and upregulation of inducible nitric oxide synthase. *Shock* 2008; 30: 241-249
- [161] Wakeno-Takahashi M, Otani H, Nakao S, Imamura H, Shingu K: Isoflurane induces second window of preconditioning through upregulation of inducible nitric oxide synthase in rat heart. *Am J Physiol* 2005; 289: H2585-H2591
- [162] Maulik N, Sato M, Price BD, Das DK: An essential role of NFkB in tyrosine kinase signaling of p38 MAP kinase regulation of myocardial adaptation to ischaemia. *FEBS Lett* 1998; 429: 365-369
- [163] Morgan EN, Boyle EM, Yun W, Griscavage-Ennis JM, Farr AL, Canty TG Jr, Pohlman TH, Verrier ED: An essential role for NFkB in the cardioadaptive response to ischemia. *Ann Thorac Surg* 1999; 68: 377-382
- [164] Welters ID, Menzebach A, Goumon Y, Cadet P, Menges T, Hughes TK, Hempelmann G, Stefano GB: Morphine inhibits NF-kB nuclear binding in human neutrophils and monocytes by a nitric oxide-dependent mechanism. *Anesthesiology* 2000; 92: 1677-1684
- [165] De Rossi LW, Brueckmann M, Rex S, Barderschneider M, Buhre W, Rossaint R: Xenon and isoflurane differentially modulate lipopolysaccharide-induced activation of the nuclear transcription factor kB and production of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in monocytes. *Anesth Analg* 2004; 98: 1007-1012
- [166] De Klaver MJ, Manning L, Palmer LA, Rich GF: Isoflurane pretreatment inhibits cytokine-induced cell death in cultured rat smooth muscle cells and human endothelial cells. *Anesthesiology* 2002; 97: 24-32
- [167] Ding Wen-gang, Zhou Hua-cheng, Cui Xiao-guang, LI Wen-zhi, Guo Yue-ping, Zhang Bing, Liu Wie: Anti-apoptotic effect of morphine-induced delayed preconditioning on

pulmonary artery endothelial cells with anoxia/reoxygenation injury. Chinese Medical Journal 2008; 121: 1313-1318

- [168] Okubo S, Tanabe Y, Takeda K, Kitayama M, Kanemitsu S, Kukreja RC, Takekoshi N: Ischemic preconditioning and morphine attenuate myocardial apoptosis and infarction after ischemia-reperfusion in rabbits: role of delta-opioid receptor. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2004; 287: H1786-H1791
- [169] Hsiao PN, Chang MC, Cheng WF, Chen CA, Lin HW, Hsieh CY, Sun WZ: Morphine induces apoptosis of human endothelial cells through nitric oxide and reactive oxygen species pathways. Toxicology 2009; 256: 83-91

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Preckel und Herrn Prof. Dr. med. Schlack für die freundliche Überlassung des Themas und für die hervorragende Betreuung während der Erstellung der Arbeit.

Ganz besonders danke ich Frau Dr. rer. nat. Nina C. Hauck für die exzellente und freundliche Betreuung während der gesamten Zeit, in der diese Arbeit entstanden ist, beginnend bei den Experimenten bis zur Erstellung der Dissertationsschrift.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei Frau Yvonne Grüber bedanken, die mir im täglichen Laborbetrieb immer eine große Hilfe war.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

13. November 2012, Jennis Kandler

Unterschrift