

# 1. Einleitung

## 1.1 Kalziumsignale in Endothelzellen

Kalzium ist als Signalsubstanz ubiquitär verbreitet. Die Funktionen und Prozesse die durch Kalziumsignale vermittelt werden sind von den jeweiligen Zelltypen abhängig z.B. Insulinfreisetzung in Langerhansschen Zellen des Pankreas, Auslösung der Aktin-Myosin Interaktion in Muskelzellen oder Freisetzung von Neurotransmittern (Acetylcholin) in Neuronen (neuromuscular junction). In Endothelzellen ist  $[Ca^{2+}]_i$  entscheidend für die Regulierung des Gefäßtonus. Durch eine Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  wird die konstitutive endotheliale Nitroxidsynthetase (eNOS) aktiviert, welche Stickstoffmonoxid (NO) produziert. NO aus EZ ist ein Aktivator der löslichen Guanylatzyklase in benachbarten glatten Muskelzellen, welche durch Erhöhung der  $[cGMP]_i$  (zyklisches Guanosinmonophosphat) zu einer Relaxation und damit zur Vasodilatation führt [54]. Globale Kalziumsignale in EZ können über „gap junctions“, Verbindungen zwischen den Interzellulärräumen benachbarter Zellen (auch unterschiedlichen Typs) vermittelt werden, dadurch können Signale von EZ in die glatte Muskelzellen der Gefäßmedia übergehen und dort eine Kontraktion auslösen, die im Gefäßbett zur Vasokonstriktion führt [3]. Neben diesen Funktionen sind Kalziumsignale in EZ an vielen anderen Vorgängen beteiligt, darunter Mitose, Apoptose und Synthese von Mediatoren und Zytokinen die z.B. Inflammation und Gerinnung beeinflussen.

Eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration  $[Ca^{2+}]_i$  geschieht primär über zwei Wege, dem Einstrom von extrazellulärem Kalzium über verschiedene Kanäle in der Zellmembran oder der Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Kompartimenten. Quantitativ und funktionell wichtige Kalziumspeicher in EZ sind das endoplasmatische Retikulum (ER), eine membranöse Struktur die neben Speicher- auch wichtige Synthesefunktionen erfüllt, und die Mitochondrien. Kalziumkanäle die sich in der Zellmembran befinden, lassen sich in drei Hauptgruppen aufteilen: spannungsabhängige (voltage operated calcium channel, VOCC), Rezeptor-gesteuerte (receptor operated calcium channel, ROCC) und speicherabhängige (store operated calcium channel, SOCC) Kalziumkanäle [1]. VOCC finden sich vornehmlich in erregbaren Zellen wie Neuronen und Muskelzellen. Obwohl widersprüchliche Daten existieren wird davon ausgegangen das EZ nach Passagierung in vitro keine VOCC mehr besitzen [36]. Allgemein akzeptiert ist, dass EZ

unterschiedliche ROCC besitzen die von Liganden wie z.B. Acetylcholin, Histamin, Nucleotiden oder 5-Hydroxytryptamin aktiviert werden können [30]. Nach Bindung des Agonisten an den Rezeptor wird entweder direkt ein Kanal geöffnet und somit der Einstrom von extrazellulärem Kalzium ermöglicht, oder es wird z.B. durch Aktivierung der Phospholipase C (PLC) das Inositoltrisphosphat gebildet, das zu intrazellulären Kalziumspeichern abdiffundiert und dort eine Kalziumfreisetzung initiiert.

Da Kalzium nicht wie andere „second messenger“ metabolisiert werden kann, müssen Zellen durch engmaschige Regulation die intrazelluläre Kalziumkonzentration auf Werte von ca. 40-100 nmol/L halten. Demgegenüber stehen vergleichsweise hohe Konzentrationen extrazellulär (1,8-2,0 mmol/L) aber auch in intrazellulären Kompartimenten wie z.B. dem ER (1-4 mmol/L) oder den Mitochondrien (1 mmol/L). Die Senkung der  $[Ca^{2+}]_i$  erfolgt in EZ hauptsächlich durch Wiederaufnahme in intrazelluläre Speicher oder dem Transport von Kalzium nach extrazellulär. An der Membran der intrazellulären Kompartimente und der Zellmembran existieren  $Ca^{2+}$ -ATPasen und  $Na^+ / Ca^{2+}$  Antiporter, die Kalzium energieabhängig aus dem Intrazellulärraum transportieren und so das Äquilibrium der  $[Ca^{2+}]_i$  aufrechterhalten [2].

Mitochondrien nehmen in der Kalziumsignalgebung eine Sonderrolle ein, da sie über einen Hochgeschwindigkeits-Kalziumuniporter verfügen, der angetrieben über das Membranpotential, in kurzer Zeit grosse Mengen  $Ca^{2+}$  in die Mitochondrien transportieren kann. Durch Änderung ihrer Membrandurchlässigkeit für  $Ca^{2+}$  und über einen  $Na^+ / Ca^{2+}$ -Antiporter können Mitochondrien das gespeicherte  $Ca^{2+}$  freisetzen und sich somit in manchen Zellen an intrazellulären  $Ca^{2+}$  Signalen beteiligen. Durch ihre immense Transport- und Speicherkapazität für  $Ca^{2+}$  können Mitochondrien als  $Ca^{2+}$ -Puffer fungieren und  $Ca^{2+}$ -Signale abschwächen oder durch langsame Freisetzung von  $Ca^{2+}$  intrazelluläre Signale verlängern [3]

Neben der Konzentration des Kalziums sind auch Lokalisierung und Zeitraum der Signale von entscheidender Bedeutung. Kalzium kann ein extrem ortsgebundener Signalstoff sein, der nur an umschriebenen Orten wie der Öffnung einer „Gap Junction“ oder einer bestimmten Domäne der Zellmembran wirkt. Dies ist zum einem der langsamen Diffusionszeit und der daraus resultierenden kurzen Diffusionsstrecke der Kalziumionen zuzuschreiben, zum anderen existieren intrazellulär Kalzium-puffernde Proteine die je nach Sättigungsgrad die Ausbreitung von Kalziumsignalen vermindern [55]. Mittels dieser „elementaren“ Kalzium-

signale wird es der Zelle ermöglicht hoch differenzierte Botschaften mit relativ niedrigem Energieaufwand zu übermitteln. Mit Hilfe der erwähnten elementaren Kalziumsignale können EZ „globale“ Kalziumsignale generieren, welche den gesamten Intrazellulärraum durchqueren und somit auf verschiedenste Strukturen wirken [3.]. Es wurde beobachtet dass sie dabei häufig die Form einer Welle oder Spitze („Spike“) haben. Diese globalen Signale können mittels „gap junctions“ von Zelle zu Zelle weitergegeben werden, um die Aktivität von Geweben oder sogar ganzen Organen zu regulieren. Diese interzelluläre Kommunikation lässt sich auch zwischen unterschiedlichen Zelltypen wie z.B. EZ und glatten Gefäßmuskelzellen beobachten.  $Ca^{2+}$  hat also eine Schlüsselstellung bei der Kontrolle und Regulation vieler endothelialer Funktionen [35], und ist als solches ein guter Parameter für die Überwachung des endothelialen Funktionsstatus.

## 1.2 Pathophysiologische Veränderungen bei SIRS

Die Mehrheit der Todesfälle bei kritisch kranken Patienten einer Intensivstation ist die Folge von Sepsis und ARDS auf dem Boden eines SIRS [6]. Das Vorliegen von SIRS ist definiert wenn 2 der folgenden Kriterien erfüllt sind: 1. Herzfrequenz  $> 90/\text{min.}$ , 2. Körpertemperatur  $>38^\circ$  oder  $< 36^\circ$ , 3. Atemfrequenz  $> 20/\text{min.}$  oder  $\text{PaCO}_2 < 32 \text{ mmHg}$ , 4. Leukozyten  $>12.000$  oder  $<4.000 \text{ Zellen}/\text{mm}^3$  oder  $>10\%$  unreife Formen [7]. Wird zusätzlich zu den klinischen Kriterien des SIRS eine Infektion nachgewiesen spricht man von einer Sepsis [5]. Auf immunologischer Ebene findet durch Leukozyten und Makrophagen eine systemische Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen wie z.B. TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 und IL-1 $\beta$  statt. Weiterhin zirkulieren vermehrt von der Leber produzierte Akute Phase Proteine wie z.B. CRP und Fibrinogen. Durch die proinflammatorischen Mediatoren kommt es zur Aktivierung des Komplement und Monozyten/Makrophagen Systems, welches wiederum über die Bildung von zytolytischen Komplexen bzw. Radikalen, NO [23,24] und histolytischen Enzymen, (Elastasen, Kollagenasen) zu Gewebsschäden im betroffenen Organismus führt. Gravierend kommt hinzu dass viele der Zytokine miteinander vernetzt sind und ihre Produktion in Leukozyten und Makrophagen gegenseitig beeinflussen. So wird z.B. die Produktion von CRP und Fibrinogen in der Leber durch IL-6 induziert, welches wiederum selber durch einige der Zytokine (z.B. IL-1) induziert werden kann [9]. Auch das Gerinnungssystem, beeinflusst von verschiedenen der genannten Sepsismediatoren (IL-6, IL-8,) wird aktiviert [56]. Es kommt zu einer vermehrten Thrombenbildung und einer

gesteigerten Fibrinolyse. Im weiteren Verlauf kann sich eine voll ausgeprägte DIC (disseminated intravascular coagulation)/Verbrauchskoagulopathie entwickeln, die zur Bildung von Mikrothromben und Perfusionstörungen im gesamten Organismus führt [57]. Nach Verbrauch der prokoagulatorischer Faktoren wie z.B. Fibrin und Thrombozyten, entstehen vital bedrohliche, disseminierte Blutungen in verschiedensten Organen. Führen die bei SIRS/Sepsis und DIC miteinander vernetzten Reaktionskaskaden zu Funktionsstörungen in mehr als einem Organ spricht man von einem MODS (multiple organ dysfunction syndrom) welches sich im Verlauf zu einem MOF (multiple organ failure) entwickeln kann. Obwohl SIRS/Sepsis sich aus diversen Ätiologien entwickeln können (z.B. Myokardinfarkt, Verbrennungen, Pneumonie, Operationen) besteht die gemeinsame Endstrecke in der Ausbildung von MODS/MOF, was die systemische, den ganzen Organismus betreffende Natur dieser Vorgänge unterstreicht. Viele der beteiligten Botenstoffe zirkulieren frei im Blut. Somit ist es nicht überraschend, dass Zellen, die mit Blutkomponenten von Patienten mit systemischer Inflammation inkubiert werden, eine veränderte Charakteristik aufweisen [4,52]

### 1.3 Postoperative Inflammation nach HLM

Selbst kleine „Routine-Operationen“ wie z.B. Appendektomien führen zu Traumen und Perfusionstörungen im betroffenen Gewebe. Neben lokalen, werden auch systemische Effekte wie Darmatonie, Postaggressionssyndrom/stoffwechsel, akutes Nierenversagen und eine postoperative Inflammationsreaktion beobachtet. Verlauf und Endpunkt des SIRS werden z.B. vom präoperativen klinischem Zustand und Alter des Patienten, Ätiologie, Dauer des Eingriffs, perioperativen Management aber auch von der Art des durchgeführten Eingriffs mitbestimmt [48,49]. Häufig mit einer ausgeprägten postoperativen Inflammation assoziiert sind maximal invasive Eingriffe wie z.B. OP's nach Whipple, Pneumektomien oder kardiochirurgischen Eingriffe mit Herz-Lungen-Maschine (HLM) [12,58,59]. Besonders intensiv untersucht und kontrovers diskutiert, werden die postoperativen systemischen Auswirkungen von kardiochirurgischen Eingriffen [10,16]. Inflammation bei herzchirurgische Patienten wird von einem komplexem Zusammenspiel humoraler und zellulärer Faktoren induziert und aufrecht erhalten. Dieses spiegelt sich u.a. in der Aktivierung, Produktion bzw. Expression von Komplement, Zytokinen, Neutrophilen, Adhäsionsmolekülen, Thrombin und verschiedenen Entzündungsmediatoren wie TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ - $\beta$ , und CRP wieder [12]. Zusätzlich kommt es zu einer Aktivierung von EZ, welche zur

Interaktion zwischen Gerinnung und Inflammation beiträgt [15]. Es wurde beobachtet das Plasma welches von Patienten nach operativen Eingriffen am Herzen entnommen und mit umbilikalen EZ inkubiert wird eine gesteigerte Apoptose dieser Zellen auslöst. Die gesteigerte Apoptose die für eine erhöhte Kapillarpermeabilität und die sog. Bypassdysfunktion verantwortlich gemacht wird, ist wahrscheinlich auf den Einfluss der HLM zurückzuführen [11]. Obwohl gegenläufige Meinungen über den Anteil der HLM an der Inflammationsreaktion existieren [20,25,26] setzen manche Autoren die pathophysiologischen Vorgänge unter HLM direkt mit den bei SIRS auftretenden Veränderungen gleich [25].

#### 1.4 Inflammation und Vaskuläre/Endotheliale Dysfunktion

Vaskuläre Endothelzellen (EZ) bilden ubiquitär eine Grenze zwischen Blut und Gewebe und sind auf Grund ihrer exponierten Lage, ein wichtiges Element der interzellulären Kommunikation. Diese Zellen sind nicht inert sondern adaptieren ihre Funktion an verschiedene Situationen. So wird z.B. nach Interaktion mit Inflammationsmediatoren (IL-1, TNF- $\alpha$ ) die Fibrinolyse gefördert [13,14,15]. Zusätzlich produzieren EZ selbst Inflammationsmediatoren [8] und werden im Verlauf der systemischen Entzündung geschädigt. In vitro wurde nachgewiesen dass der normalerweise antikoagulatorische Phänotyp der EZ über vermehrt exprimierte Faktoren wie z.B. TF (tissue factor) oder PAI-1 (plasminogen activator inhibitor), in einen prokoagulatorischen umgewandelt [28]. TF wirkt prokoagulatorisch durch Aktivierung des extrinsischen Gerinnungssystem über Faktor VII, wogegen PAI antifibrinolytische Eigenschaften besitzt da die Aktivierung der Fibrinolyse über tPA (tissue plasminogen activator) gehemmt wird. Auch unter physiologischen Umständen werden von EZ Adhäsionsmoleküle gebildet. Die Charakteristik der exprimierten Adhäsionsmoleküle ändert sich allerdings im Rahmen einer Inflammation. Durch Zytokin Stimulation kommt es in chronologischer Reihenfolge zur Expressierung von P-Selectin (15 min.), E-Selectin (6 h), ICAM (intercellular adhesion molecule, 24 h) und VCAM (vascular cellular adhesion molecule) auf der EZ Membran. Die Konzentration dieser Adhäsionsmoleküle die auch im Serum auftreten, kann Aufschluss über die Aktivierung der EZ und den Schweregrad der Inflammation geben [50,51].

Dadurch wird es Leukozyten ermöglicht über EZ zu rollen was von einer starken Adhäsion gefolgt ist. Letztendlich kommt es zur Transmigration in das Gewebe, wo die Leukozyten einen essentiellen Bestandteil der Inflammationskaskade darstellen [29]. Zusätzlich benötigen

die Leukozyten eine Aktivierung über Agonisten wie z.B. PAF (platelet activating factor), Chemokinen und Komplementfaktoren, die u.a. vom aktivierten Endothel gebildet werden. Die eNOS ist ein konstitutiv in EZ vorhandenes Enzym welches  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig, NO produziert. Nach Stimulation mit IL-1 oder TNF- $\alpha$  wird zusätzlich iNOS (inducible Nitroxid Synthetase) von EZ exprimiert, welche  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängig weitaus grössere Mengen an NO produzieren kann. Die Induzierung von iNOS ist wahrscheinlich an dem Blutdruckabfall bei Patienten mit Sepsis beteiligt [27]. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Aktivierung und daraus resultierende veränderten Funktion von EZ eine entscheidende Rolle bei der systemischen Inflammationsreaktion spielt.

## 1.5 Zusammenfassung

Herzchirurgische Eingriffe mit HLM verursachen systemische Inflammationen, die neben den Leukozyten auch das vaskuläre Endothel betreffen. Der Funktionsstatus des Endothels kann z.B. über Messung von zirkulierenden Adhäsionsmolekülen (z.B. Selectine, I-CAM, V-CAM) oder im Tiermodell bestimmt werden. Einen direkteren Angriffspunkt bietet die in-vitro Beobachtung von EZ und deren intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalcharakteristik, da diese eine universelle Rolle hinsichtlich Funktion und Regulation von EZ inne hat. Es ist bekannt, dass  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale, vermittelt durch lösliche Mediatoren im Serum, bei Monozyten und Neutrophilen in Folge der systemischen Inflammation verändert sind [4,21]. Ob die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signaltransduktion in Endothelzellen von Operationen am Herzen mit HLM beeinflusst wird, und ob diese Effekte durch lösliche Stoffe vermittelt werden ist noch nicht bekannt.

Wir stellten deshalb die Hypothese auf, dass zirkulierende Faktoren im Rahmen einer systemischen Inflammation, verursacht durch operative Eingriffe, eine Veränderung der endothelialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalcharakteristik bedingen. Weiterhin gingen wir davon aus, dass die erwarteten Veränderungen vom Grad der Invasivität und damit dem Ausmass der postoperativen Inflammation abhängen. Aus diesem Grund nahmen wir Patienten zum Vergleich, die sich einer endoprothetischen Operation (Hüfte oder Knie) unterziehen mussten. Bei diesen Eingriffen muss nicht mit dem postoperativen Auftreten von SIRS gerechnet werden.

Da gezeigt wurde, dass IL-6 in manchen Zellen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale induzieren kann [17,18] und seine essentielle Rolle an der Pathogenese von Entzündungsprozessen und endothelialer

Dysfunktion im Körper unbestritten ist [19], wurde exemplarisch geprüft ob sich Zusammenhänge zwischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalen und der IL-6 Konzentration herstellen lassen. Weiterhin ist IL-6 ein wertvoller quantitativer Parameter zur Bestimmung des Inflamationsgrades und des postoperativen Verlaufs [43,7].

## Fragestellung

1. a) Ist die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signaltransduktion in kultivierten Endothelzellen durch den Einfluss von Serum von Patienten nach OP mit HLM verändert ?  
b) Ist die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signaltransduktion in kultivierten Endothelzellen durch den Einfluss von Serum von Patienten nach endoprothetischen Operationen verändert ?
2. Auf welche Signalkomponenten kann eine veränderte  $\text{Ca}^{2+}$ -Charakteristik eingegrenzt werden ?
3. Kann ein geändertes  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal auf eine Änderung der Intensität der postoperativen Inflammation hinweisen ?