

3. Ergebnisse

3.1 Aufnahme des FURA2-AM durch die EZ und Ruhekalzium

Durch die Ladungsbedingungen stellten sich die EZ homogen im Fluoreszenzlicht dar. Unter Ruhebedingungen zeigten die EZ einen bestimmten Fluoreszenzratiowert (bei $[Ca^{2+}] = 1,8\text{mmol/L}$ $64,8 \pm 0,2$; $n=10$) (bei $[Ca^{2+}] = 0\text{ mmol/L}$ $43,1 \pm 0,1$; $n=10$). Dieser Wert unter Ruhebedingungen unterlag gewissen Schwankungen (bei $[Ca^{2+}] = 1,8\text{mmol/L}$ $2,8 \pm 0,2$) (bei $[Ca^{2+}] = 0\text{ mmol/L}$ $0,8 \pm 0,1$). Alle folgenden Angaben zu Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ beziehen sich auf die Änderung dieses Wertes und sind mit Hilfe des T.I.L.L.- Messsystems ermittelt worden. Die Ruhekalziumkonzentration der mit Serum präinkubierten HAEC, war bei der extrazellulären Kalziumkonzentrationen von 0 mmol/L signifikant gesenkt ($p < 0,001$)

3.2 Patienten

Von den 30 Patienten die einen CABG erhielten mussten 4 ausgeschlossen werden, da die notwendige Menge an Serum nicht ausreichend war ($n=2$) oder während der Aufbereitung des Serums verloren ging. Die übrigen 26 Patienten wiesen, verglichen mit den Patienten die eine Gelenkendoprothese erhielten, (Hüft TEP 12; Knie TEP 3) keine Unterschiede in der Verteilung von Alter und Geschlecht auf. Patienten aus der CS Gruppe hatten längere Operationszeiten und das Auftreten von SIRS definiert nach den ACCP/SCCM Kriterien war häufiger in dieser Population (Tabelle 1,2 und 3).

Tabelle 1 Allgemeine Patientencharakteristik

	Gelenkendoprothese	CABG	p
Geschlecht (w/m)	6/9	5/21	n.s.
Alter (y)	68 ± 3	66 ± 8	n.s.
BMI (kg/m ²)	28 ± 3	27 ± 3	n.s.
Operationszeit (min)	86 ± 12	192 ± 27	**
preoperatives IL-6 (pg/ml)	10 ± 3	4 ± 2	n.s.
postoperatives IL-6 (pg/ml)	74 ± 41	429 ± 282	***
SIRS postoperative vorhanden	0/15 (0%)	12/26 (46%)	**

Tabelle 2 Präoperativ vorhandene chronische Erkrankungen

	Gelenkendoprothese	CABG	p
Hyperlipoproteinämie	1 (7%)	12 (46%)	*
Koronare Herzkrankheit	4 (27%)	26 (100%)	**
Arterieller Hypertonus	8 (53%)	6 (23%)	n.s.
Niereninsuffizienz	2 (13%)	0 (0%)	n.s.
Myokardialer Infarkt	1 (7%)	8 (31%)	n.s.
Diabetes mellitus	1 (7%)	5 (19%)	n.s.
COPD	0 (0%)	3 (12%)	n.s.
TIA/PRIND/Apoplex	0 (0%)	1 (3%)	n.s.

Tabelle 3 Chronische medikamentöse Therapie

	Gelenkendoprothese	CABG	p
ACE Hemmer/ AT2 rezeptor antagonisten	4 (27%)	12 (46%)	n.s.
Betablocker	2 (13%)	11 (42%)	n.s.
Statine	2 (13%)	5 (19%)	n.s.
Nitrate	3 (20%)	10 (38%)	n.s.
NSAID	5 (33%)	11 (42%)	n.s.
Ca ²⁺ Antagonisten	4 (27%)	3 (12%)	n.s.
Diuretika	3 (20%)	4 (15%)	n.s.

Geschlecht, Alter und Medikamente wurden mittels Chi-Quadrat-Test verglichen. Alle anderen Werte wurden mit dem einfachen t-test verglichen. * p<0.05 ; ** p<0.01 ; *** p<0.001

3.3 Bestimmung des optimalen Agonisten

Viele Transmitterstoffe lösen in EZ intrazelluläre Ca²⁺-Signale aus. Häufig wird dieser Prozess über G-Proteine vermittelt aber auch eine direkte Öffnung von Kationenkanälen, die sich in der Zellmembran befinden, ist möglich. Wir wählten vier Substanzen aus von denen bekannt ist das sie in EZ Ca²⁺ Signale induzieren. Die Versuche wurden jeweils in Ca²⁺-haltigem und Ca²⁺-freien Puffer durchgeführt. Dabei wurden Acetylcholin, Adenosintrisphosphat, Bradykinin und 5- Hydroxytryptamin in den Konzentrationen 1µM, 10µM, 100µM und 1mM beim Start der Messung zugefügt und die resultierenden Ca²⁺-Signale für 50 Sekunden gemessen. Wie aus dem Diagramm ersichtlich ist zeigte ATP 100µM die zuverlässigste Charakteristik. siehe Abb. 1

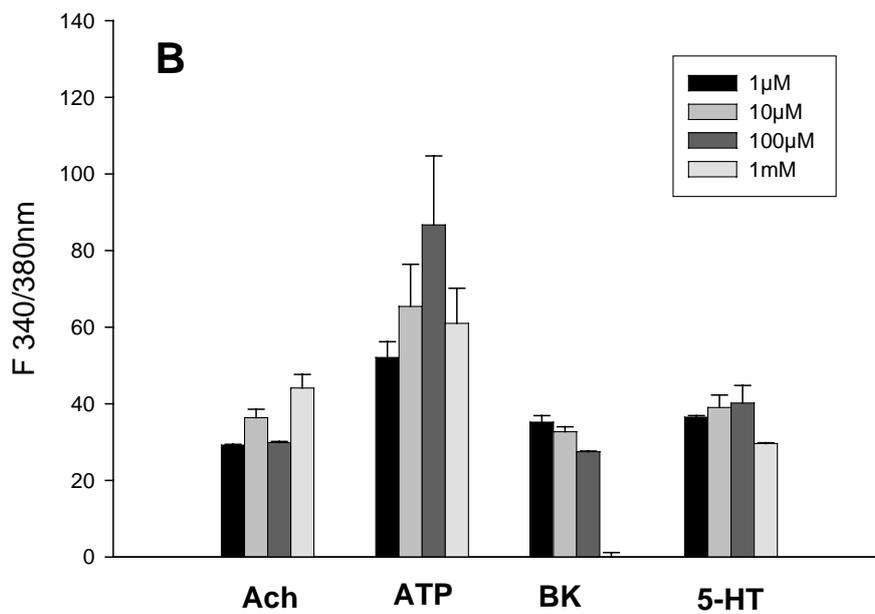
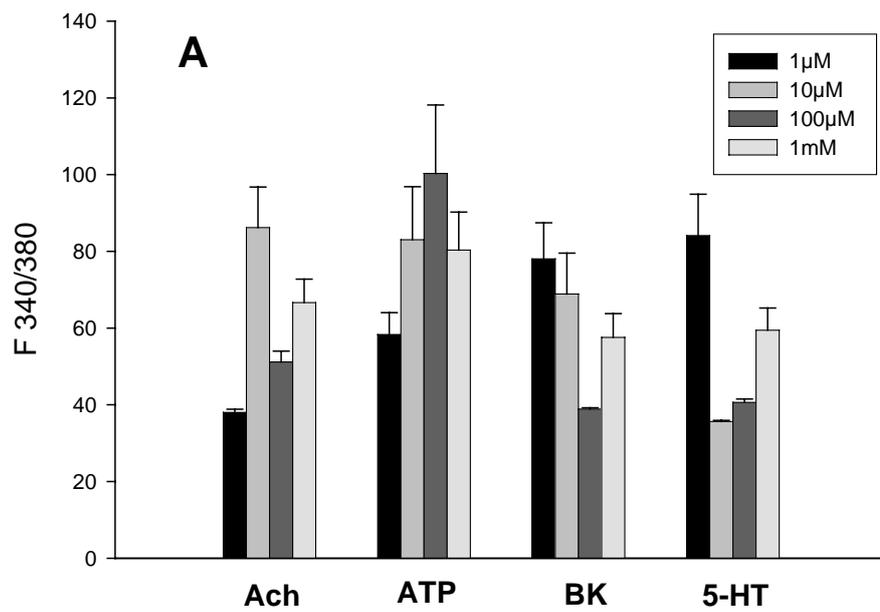
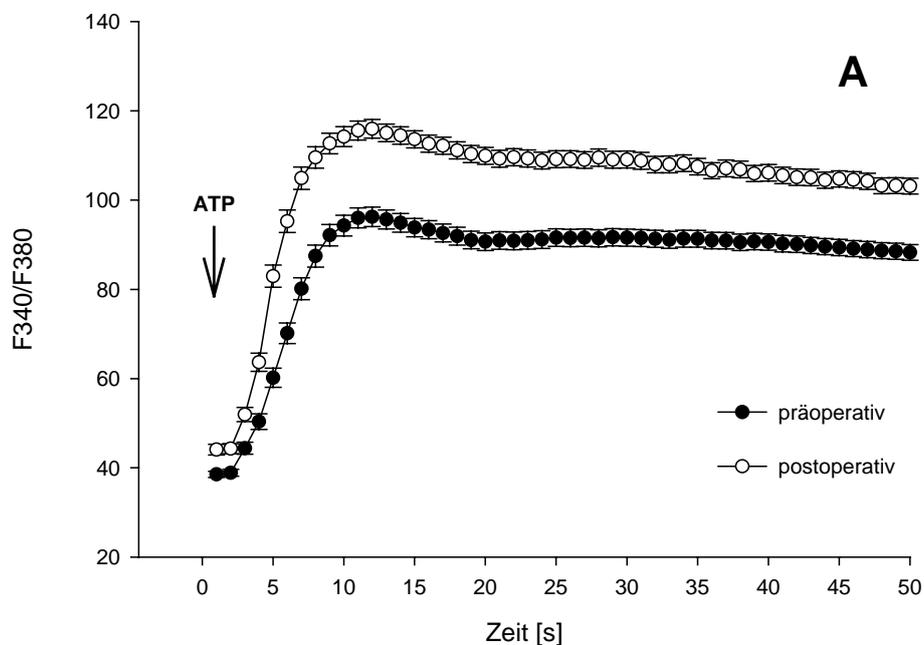


Abb.1 Gezeigt sind die Mittelwerte der maximalen $[Ca^{2+}]_i$ nach Stimulanz mit den beschriebenen Substanzen in verschiedenen Konzentrationen (n=30). Versuche wurden in kalziumhaltigen (1,8mM/L) **A**) und kalziumfreien Puffer **B**) durchgeführt.

3.4 ATP induzierte $[Ca^{2+}]_i$ Anstiege

Nach Zugabe von ATP $100\mu\text{mol/L}$ erhöhte sich die $[Ca^{2+}]_i$ in den HAEC, die mit präoperativen Serum von Patienten die sich einer herzchirurgischen OP unterzogen, inkubiert wurden, durchschnittlich um 58 ± 2 FU. Dem initial steilen Anstieg folgte nach 10 Sekunden ein leichter Abfall der $[Ca^{2+}]_i$, die sich für den Rest der Beobachtungsperiode auf einer konstanten Höhe einpendelte (AUC: 4308 ± 89 ; Max: 96 ± 2 FU). Zellen, die mit postoperativen CS Serum inkubiert wurden, zeigten nach ATP Stimulation einen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ um 72 ± 2 FU, wobei die $[Ca^{2+}]_i$ zum Beginn der Messung nicht verändert war (AUC: 5162 ± 88 FU; Max: 116 ± 2) siehe Abb.2.

Zellen die mit präoperativem Serum, von Patienten, die sich einer orthopädischen OP unterzogen, inkubiert wurden, zeigten einen ATP induzierten $[Ca^{2+}]_i$ Anstieg (51 ± 2 FU) ähnlich dem der präoperativen CS Gruppe (AUC: 4564 ± 87 ; Max: 99 ± 2 FU). Dies konnte nicht signifikant (54 ± 2 FU) durch eine Inkubation mit postoperativem OS Serum gesteigert werden (AUC: 4635 ± 93 ; peak: 100 ± 2 FU). Siehe Abb. 2



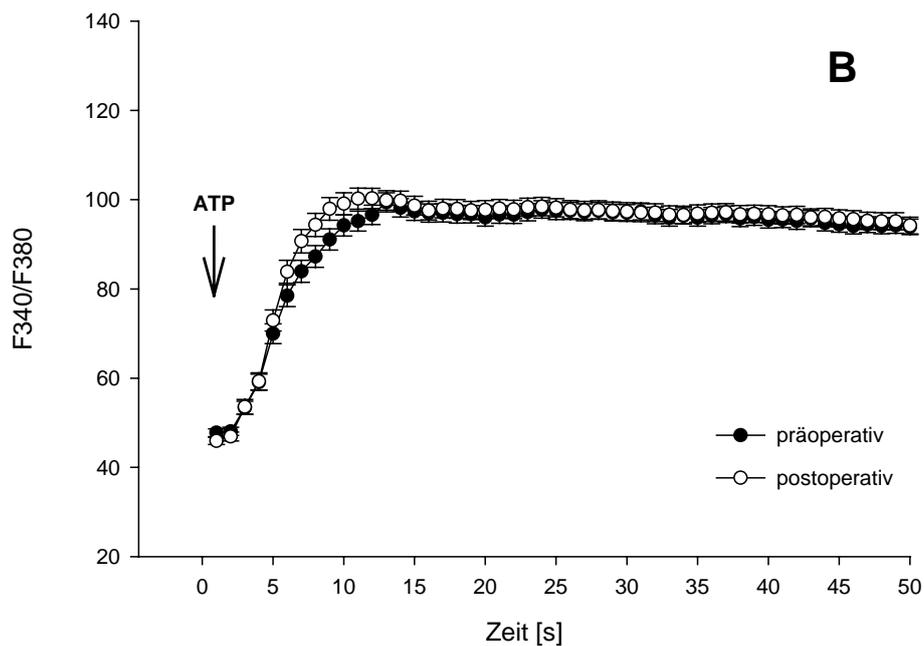
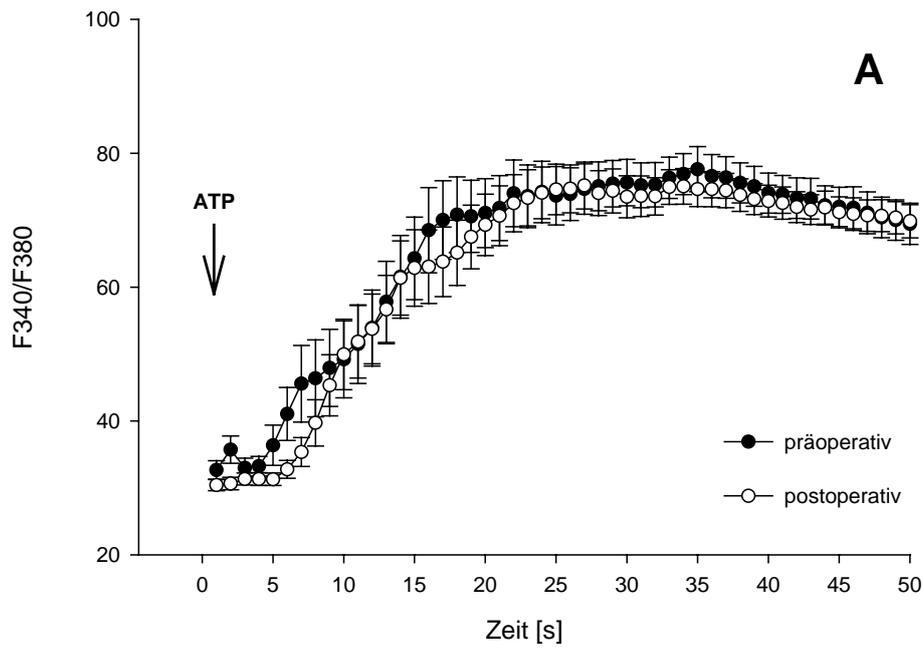


Abb.2 Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ in HAEC nach Stimulation mit ATP $100\mu\text{mol/L}$. Die Zellen wurden vorher mit Serum aus der CS Gruppe **A**) bzw. der OS Gruppe **B**) inkubiert. Die Versuche fanden in kalziumhaltigen Puffer statt ($1,8\text{mmol/L}$)

3.5 Einfluss der extrazellulären Ca^{2+} Konzentration

Um den Anteil des extrazellulären Ca^{2+} Einstroms an den beschriebenen intrazellulären Ca^{2+} Signalen näher zu eruieren wurden die Versuche in einem Ca^{2+} freien Puffer wiederholt. Zu diesem Zweck wurde die Pufferlösung mit $1,8\text{ mmol/l}$ EGTA versetzt einem Chelator der mit zweiwertigen Kationen schwer lösliche Komplexe bildet und so die effektive $[Ca^{2+}]$ auf 0 mmol/l senkt. Die Entfernung der Ca^{2+} Ionen senkte in allen Messungen unabhängig von Entnahmezeit der Serumprobe und Art des Eingriffs die ATP induzierten Ca^{2+} Signale erheblich. Inkubation von HAEC mit präoperativen CS Serum senkte den gemessenen Ca^{2+} Anstieg auf $45 \pm 2\text{ FU}$ (AUC: 3258 ± 150 ; Max: $78 \pm 2\text{ FU}$). Die Messungen nach Inkubation mit postoperativen CS Serum wich mit $45 \pm 2\text{ FU}$ und AUC: 3162 ± 129 ; peak: $75 \pm 2\text{ FU}$ kaum von diesem Ergebniss ab siehe Abb. 3. Einen nur geringfügig erhöhten Anstieg auf $50 \pm 2\text{ FU}$ (AUC: 3411 ± 90 ; peak: $81 \pm 2\text{ FU}$) erbrachte die Inkubation mit präoperativem OS Serum wobei die intrazellulären Ca^{2+} Signale nach Inkubation mit

postoperativen OS Serum ähnlich ausfiel 50 ± 2 FU (AUC: 3333 ± 113 ; peak: 79 ± 2 FU) siehe Abb. 2. Da unter Abwesenheit von extrazellulären Ca^{2+} die erhöhten Ca^{2+} Signale in Zellen der postoperativen CS Gruppe nicht mehr vorhanden waren lässt sich schlussfolgern das extrazelluläres Ca^{2+} an dem vermehrten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ Anstieg in dieser Gruppe beteiligt ist.



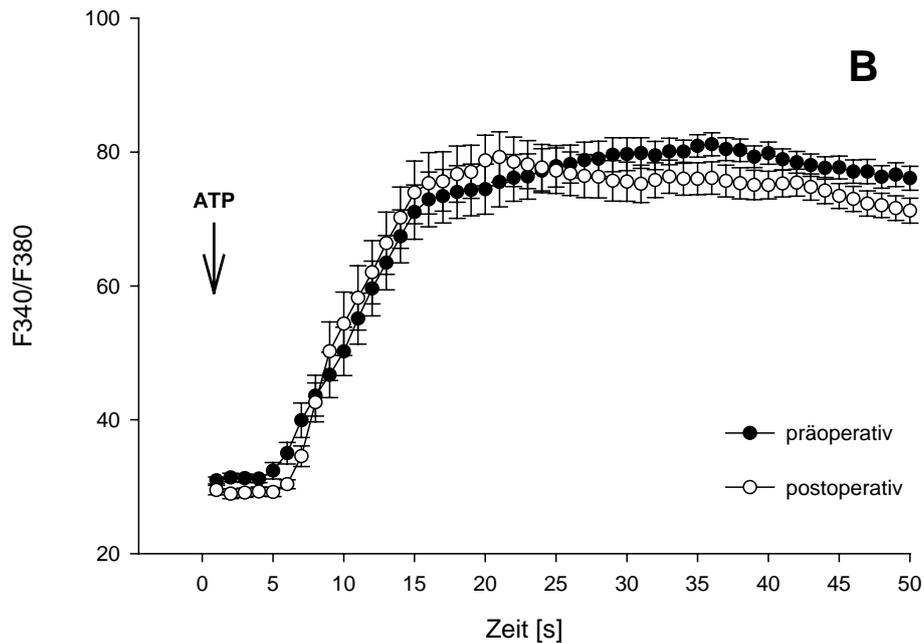


Abb. 3 Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ in HAEC nach Stimulation mit ATP $100\mu\text{mol/L}$. Die Zellen wurden vorher mit Serum aus der CS Gruppe A) bzw. der OS Gruppe B) inkubiert. Die Versuche fanden in kalziumfreiem Puffer statt.

3.6 Spannungsabhängige Ca^{2+} Kanäle

Das Dihydropyridin Nifedipin ist ein Antagonist an spannungsgesteuerten Ca^{2+} Kanälen vom L-Typ [22]. Nach 10 minütiger Inkubation der HAEC mit Nifedipin $1\mu\text{mol/L}$ zeigten die EZ der postoperativen CS Gruppe weiterhin von allen Gruppen den intensivsten ATP induzierten Anstieg in $[Ca^{2+}]_i$ mit 73 ± 2 FU (AUC: 4605 ± 198 ; peak: 108 ± 2 FU; $P < 0,01$). Die EZ der präoperativen CS Gruppe wiesen ein gering abgeschwächtes Ca^{2+} Signal nach Stimulation auf (45 ± 1 FU; AUC: 3600 ± 285 ; peak: 84 ± 4 ; $p < 0,01$), ebenso wie die EZ der präoperativen (45 ± 1 FU ; AUC: 3464 ± 157 ; peak: 79 ± 1 FU) und der postoperativen OS Gruppe (51 ± 2 FU ; AUC: 3757 ± 213 ; peak: 86 ± 2) die sich alle nicht signifikant unterschieden. Siehe Abb.

4

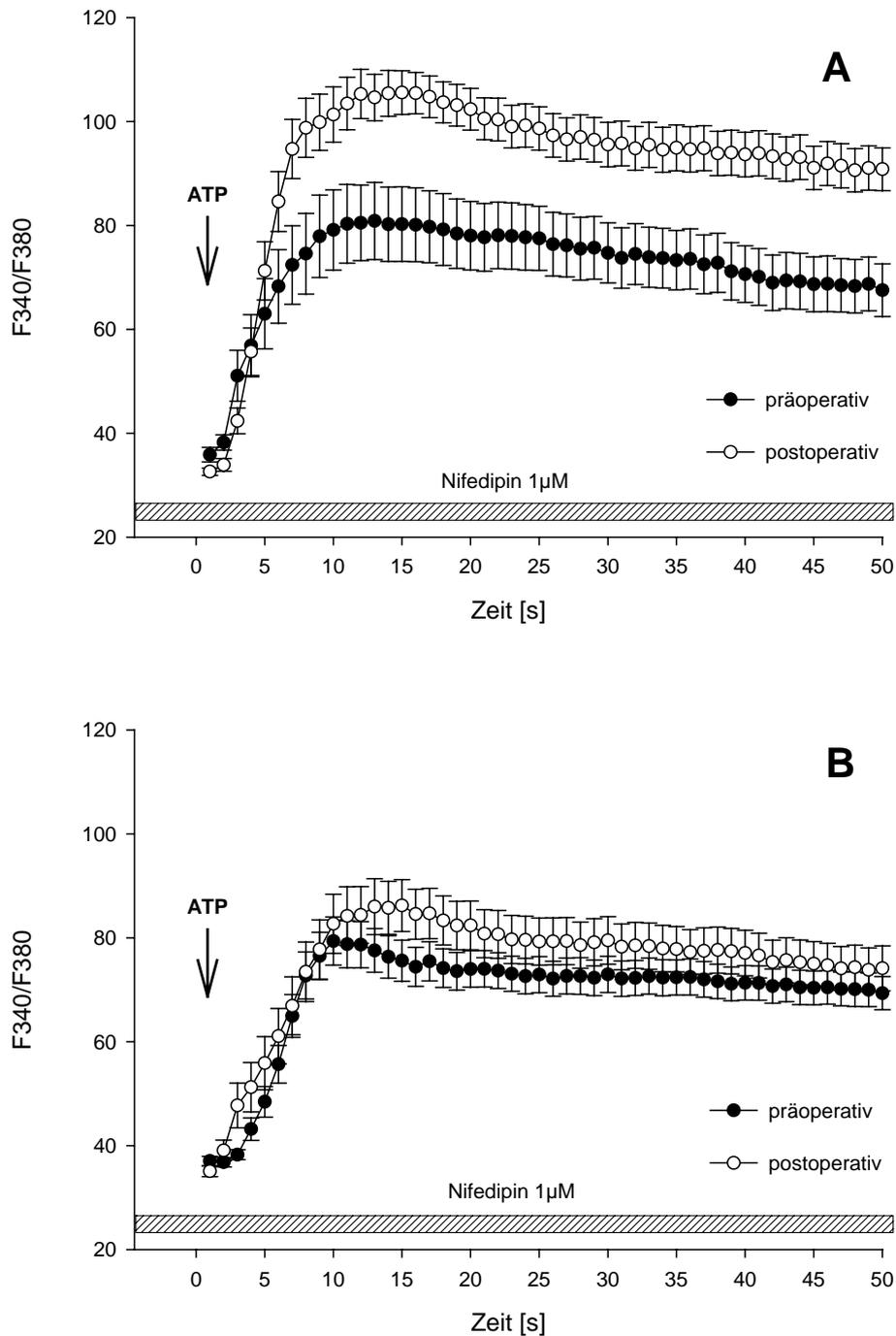
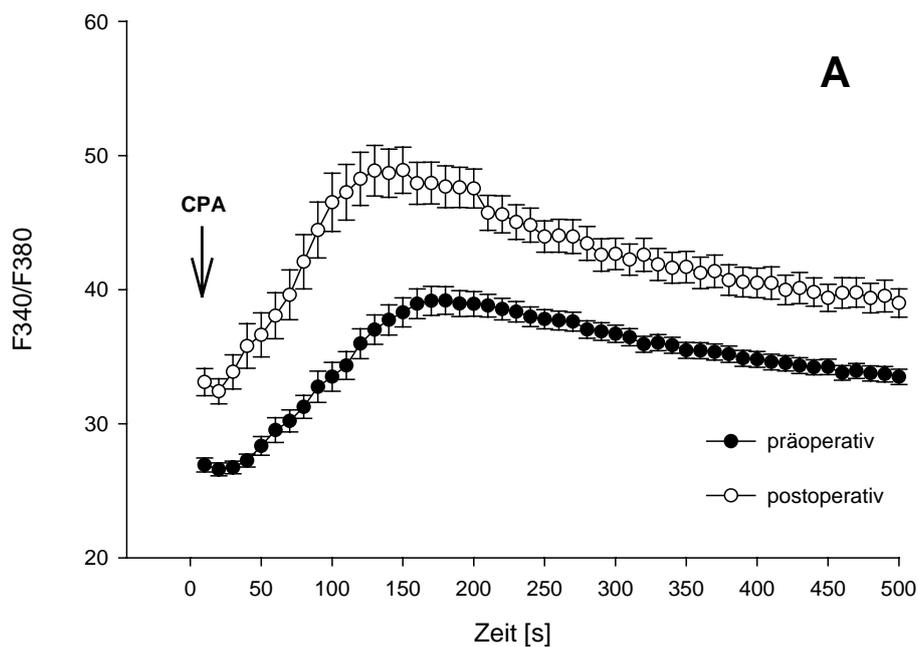


Abb.4

Nach der Inkubation mit Seren der CS **A**) bzw. OS Gruppe **B**) wurden die Zellen für 10 Minuten mit Nifedipin 1 μ mol/L behandelt. Dargestellt sind die Änderungen der $[Ca^{2+}]_i$ nach Stimulation mit ATP 100 μ mol/L. Die Versuche fanden in kalziumhaltigen Puffer (1,8mmol/L) statt.

3.7 Rolle der intrazellulären Ca²⁺ Freisetzung

Cyclopiazonsäure (CPA) ist ein reversibler Inhibitor der Ca²⁺-ATPase einer membranständigen Kationpumpe, welche essentiell zur Aufrechterhaltung der Ca²⁺-Homöostase ist [41]. CPA kann genutzt werden um intrazelluläre Ca²⁺ Speicher zu entleeren, der Anstieg der Fluoreszenz sollte hierbei in einem Ca²⁺ freien Puffer mit dem Ca²⁺ Gehalt der intrazellulären Speicher korrelieren. HAEC die mit postoperativen Serum der herzchirurgischen Patienten inkubiert wurden zeigten einen kleinen (16 ± 0.6 FU; peak: 49 ± 0.6 FU; AUC: 2116 ± 60 ; $P < 0.01$) aber signifikant größeren Anstieg als die EZ der präoperativen CS Gruppe (12 ± 0.5 FU; peak: 39 ± 0.5 FU; AUC: 1745 ± 31). Prä- und postoperatives Serum, welches von orthopädischen Patienten stammte, verursachte keine Differenzen bei der CPA induzierte Ca²⁺ Freisetzung. Siehe Abb. 5



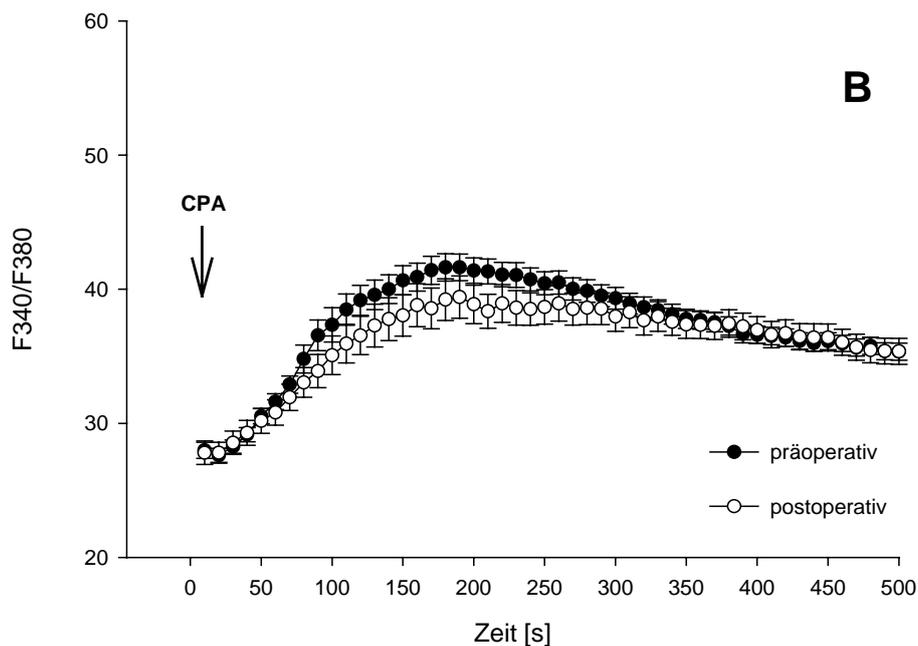


Abb.5 Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern. Dargestellt ist die Änderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nach Zugabe von CPA $10\mu\text{mol/L}$ nach vorheriger Inkubation mit Seren der CS **A**) bzw. OS Gruppe **B**). Die Versuche wurden in kalziumfreien Puffer durchgeführt.

3.8 Ca^{2+} -Einstrom nach Entleerung intrazellulärer Speicher

Um den Einfluss von SOCC besser beurteilen zu können führten wir Manganverdrängungsversuche durch. Die Zellen wurden für 15 Minuten mit CPA $10\mu\text{mol/L}$ in einem Ca^{2+} -freien Puffer behandelt. Danach wurde der Ca^{2+} -freie Puffer gegen eine Mn^{2+} -haltigen Puffer ausgetauscht und die Messung gestartet. Es kam durch den Einstrom der Mn^{2+} -Ionen zu einen Abfall der intrazellulären Fluoreszenz. Der Abfall der FURA2 Fluoreszenz war am steilsten bei HAEC die mit postoperativen CS Serum inkubiert wurden, was darauf schliessen lässt, das in dieser Gruppe der Ca^{2+} -Influx nach Entleerung der intrazellulären Speicher, deutlich beschleunigt ist. Die Inkubation von EZ mit perioperativen Seren von orthopädischen Patienten oder präoperativem Serum herzchirurgischer Patienten erbrachte keine signifikanten Unterschiede beim Abfall der FURA2 Fluoreszenz, was auf einen ähnlich schnellen Ca^{2+} -Influx innerhalb dieser Zellen schliessen lässt. Siehe Abb.6

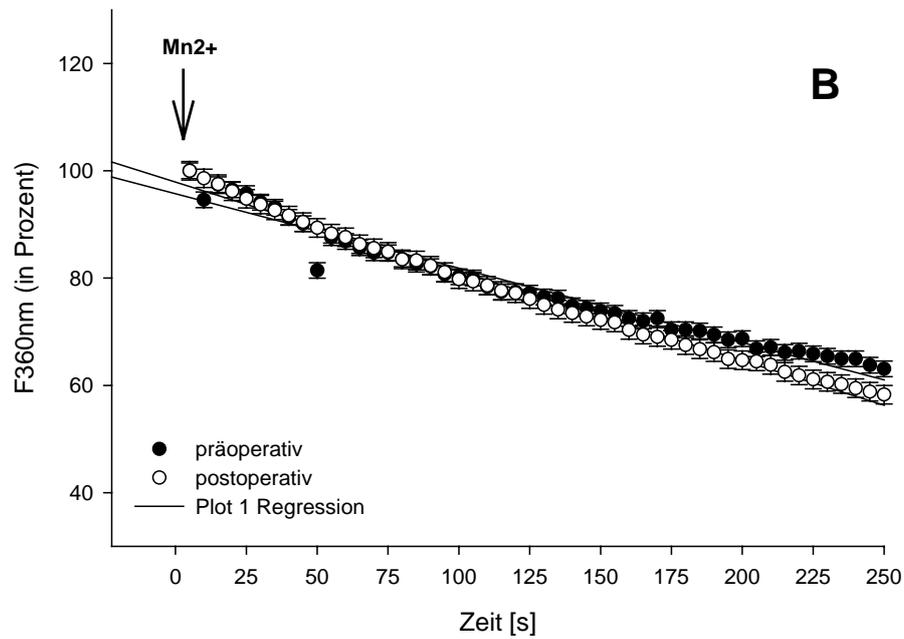
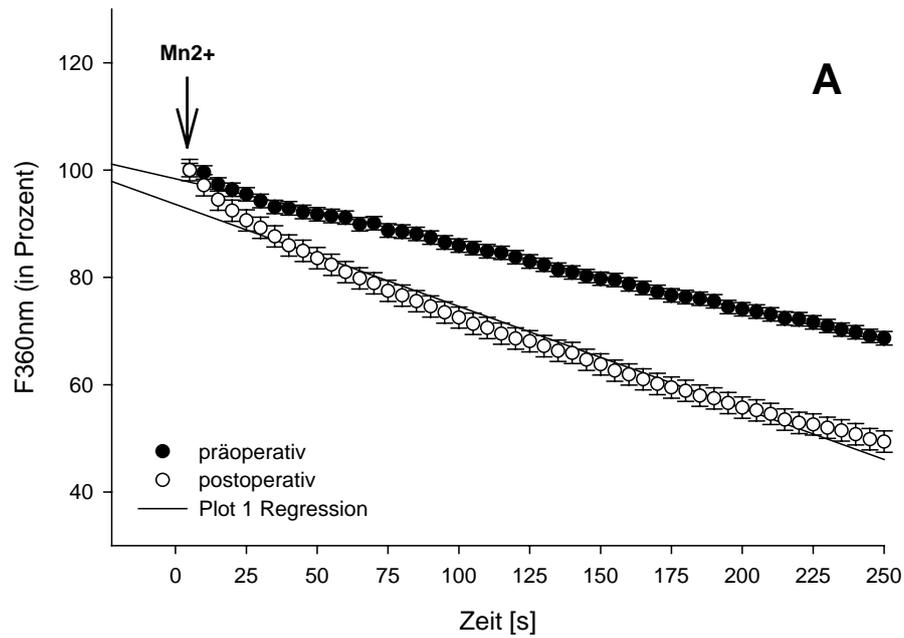


Abb.6 HAEC wurden nach Inkubation mit Seren der CS Gruppe **A**) bzw. OS Gruppe **B**) für 15 Minuten mit CPA stimuliert (Werte nicht gezeigt). Der kalziumfreie Puffer wurde danach gegen eine Manganhaltige (1,8mmol/L) Lösung ausgetauscht. Gezeigt ist der Abfall der intrazellulären FURA2 Fluoreszenz in Prozent.

3.9 Postoperative IL-6 Werte und Ca^{2+} Signale

In der herzchirurgischen Gruppe stiegen die präoperativen IL-6 Werte von 4 ± 0.6 pg/ml auf 429 ± 59 pg/ml ($p < 0.001$) in der postoperativen Phase an. In der orthopädischen Gruppe liess sich lediglich ein Anstieg von 10 ± 4 pg/ml präoperativ auf 74 ± 11 pg/ml ($p < 0.001$) postoperativ verzeichnen. Beim Vergleich zeigte sich eine starke Korrelation zwischen IL-6 Werten und ATP induzierten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ Signalen in der herzchirurgischen Gruppe. Siehe Abb.8

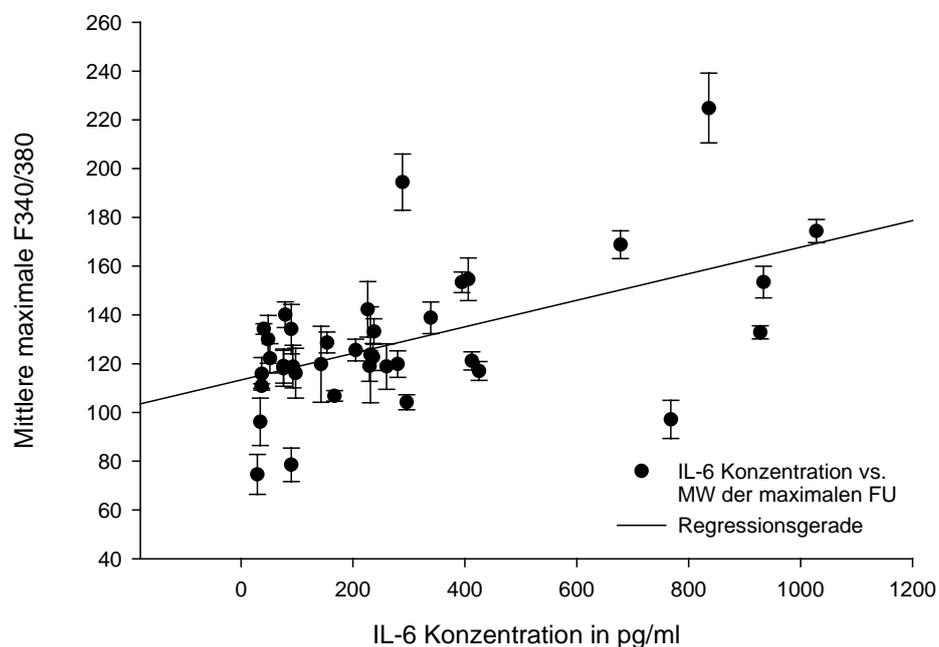


Abb.7 Abgebildet ist die Korrelation zwischen postoperativen IL-6 Konzentrationen und den gemessenen, Patienten spezifischen ATP induzierten Veränderungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Gezeigt ist die Korrelation für die CS Gruppe.