

Aus der Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin der  
Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Endotheliale Kalziumsignaltransduktion bei Patienten nach Herz-  
Lungenmaschine

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin  
Berlin

von

Herrn Crispin Schneider

geb. 16.03.1980 in Halle

Gutachter: 1. Herr Prof. Dr. H.D. Stober  
2. Herr Priv.-Doz. Dr. med. M. Dandel  
3. Herr Priv.-Doz. Dr. med. R. Wagner

Datum der Promotion: 11.01.2007

# Inhaltsverzeichnis

## **1. Einleitung**

1.1	Kalziumsignale in Endothelzellen	1
1.2	Pathophysiologische Veränderungen bei SIRS	3
1.3	Postoperative Inflammation nach HLM	4
1.4	Inflammation und Vaskuläre/Endotheliale Dysfunktion	5
1.5	Zusammenfassung	6

## **2. Material und Methoden**

2.1	Patienten	9
2.1.1	Serumproben	10
2.2	Endothelzellen	10
2.2.1	Art der verwendeten Endothelzellen	10
2.2.2	Zellkultur	10
2.2.2.1	Materialien	10
2.2.2.2	Kultivierung und Passagierung	10
2.2.2.3	Kryokonservierung	11
2.3	Kalziummessung	11
2.3.1	Beladung der EZ mit FURA2-AM	11
2.3.2	Versuchsaufbau der Einzelzellmessungen	12
2.3.2.1	Prinzip der Kalziummessung mit FURA2-AM	12
2.3.2.2	Meßsysteme	13
2.4	Kommerziell verwendete Pharmaka und Substanzen	13
2.5	Interleukin-6 Bestimmung	13
2.6	Statistische Analyse	14

### **3. Ergebnisse**

3.1	Aufnahme des FURA2-AM durch die EZ und Ruhekalzium	15
3.2	Patienten	15
3.3	Bestimmung des optimalen Agonisten	17
3.4	ATP induzierte $[Ca^{2+}]_i$ Anstiege	19
3.5	Einfluss der extrazellulären $Ca^{2+}$ Konzentration	20
3.6	Spannungsabhängige $Ca^{2+}$ Kanäle	22
3.7	Rolle der intrazellulären $Ca^{2+}$ Freisetzung	24
3.8	$Ca^{2+}$ Einstrom nach Entleerung intrazellulärer Speicher	25
3.9	Postoperative IL-6 Werte und $Ca^{2+}$ Signale	27

### **4. Diskussion**

4.1	ATP als Botenstoff	28
4.2	Rezeptorvermittelter $Ca^{2+}$ Einstrom	29
4.3	Extrazelluläres $Ca^{2+}$	29
4.4	Spannungsabhängige $Ca^{2+}$ Kanäle	30
4.5	Intrazelluläre $Ca^{2+}$ Speicher und kapazitiver $Ca^{2+}$ Einstrom	31
4.6	Inflammatorische Zytokine	32
4.7	Einschränkungen der Bewertung der Dissertation	33

### **5. Zusammenfassung**

### **6. Referenzen**

## Verzeichniss verwendeter Abkürzungen

ACE	Angiotensin converting enzyme
AMP	Adenosinmonophosphat
AT	Angiotensin
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Area under Curve
BMI	Body mass index
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	intrazelluläre Kalziumkonzentration
CABG	Coronary artery bypass graft
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease
CPA	Cyclopiazonsäure
CS	Herzchirurgie
delta	Änderung der Fluoreszenzratio 340/380 nm
EGTA	Ethylengglykol-bis(β-amino-ethylester)-N,N,N,N-Tetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
EZ	Endothelzelle
HAEC	humane aortale Endothelzelle
HLM	Herz-Lungen-Maschine
IL	Interleukin
IP3	Inositoltriphosphat
NO	Stickstoffmonoxid
NSAID	Non-steroidal antiinflammatory drugs
OS	orthopädische Chirurgie
OPCABG	Off-pump CABG / CABG ohne HLM
PIP2	Phosphatidylinositol-Bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PRIND	Prolonged reversible ischemic neurological deficit
ROCC	Rezeptor-gesteuerter Kalziumkanal
SERCA	Ca <sup>2+</sup> - ATPase des sarko- oder endoplasmatischen Retikulums
SIRS	Systemic inflammatory response syndrome
SOCC	Speicher-gesteuerter Kalziumkanal

TEP	Totale Endoprothese
TIA	Transient ischemic attack
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
UTP	Uraciltriphosphat
VOCC	Spannungs-gesteuerter Kalziumkanal

## Erklärung

„Ich, Crispin Schneider, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: [Endotheliale Kalziumsignaltransduktion bei Patienten nach Herz- Lungenmaschine] selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt:

Meinem Doktorvater und Betreuer Herrn PD Dr. Thomas Volk, Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin unter Leitung von Frau Prof. Dr. Claudia Spiess, für die Themenfindung und das Zustandekommen der vorliegenden Untersuchungsergebnisse. Seine wissenschaftlichen Anregungen und wohlwollenden kritischen Hinweise und seine ständige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft bei allen Problemen machten die Promotionsschrift in der heute vorliegenden Form erst möglich.

Frau Egerer für die Hilfe bei der Kultivierung der Endothelzellen und die Zusammenarbeit bei den IL-6 Untersuchungen.

Herrn Dr. Karsten Mäding für die Einarbeitung in die Technik der Fluoreszenzmikroskopie.

Datum der letzten Disputation: 11.01.2007



## Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

## Abstract

Endothelial Ca<sup>2+</sup> signal transduction is altered by postoperative serum from patients undergoing coronary surgery with cardiopulmonary bypass.

Schneider C. , Volk T.

Department of Anesthesiology and Intensive Care Medicine, Charitè-Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany.

Endothelial dysfunction after surgery may be caused by alterations in the intracellular signaling properties of endothelial cells. Functional alterations are believed to be systemic and dependent on the amount of invasiveness. This led us to assume that there would be a mediator in the blood. Therefore, we investigated the influence of perioperative serum obtained from patients undergoing highly invasive surgical interventions (cardiac surgery [CS] with cardiopulmonary bypass) and less invasiveness (total joint arthroplasty [TJA]) on endothelial single cell Ca<sup>2+</sup> responses. Aortic endothelial cells were incubated with preoperative and postoperative serum samples from 26 patients undergoing CS and from 15 patients undergoing TJA. Adenosine triphosphate (100 microM)-induced alterations in FURA-2 fluorescence was used to measure intracellular Ca<sup>2+</sup> in single cells. In CS samples the induced [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> signals were enhanced by postoperative serum (peak levels: 96 +/- 41 FU versus 116 +/- 45 FU; P < 0.05). These postoperative enhancements were absent in TJA patients serum. Preincubation of CS samples with nifedipine to block voltage gated Ca<sup>2+</sup> channels did not alter this effect, but the absence of extracellular Ca<sup>2+</sup> abolished the increased response from postoperative CS serum exposure. Ca<sup>2+</sup> entry probed with Mn<sup>2+</sup> quenching was increased in endothelial cells exposed with postoperative CS serum and Ca<sup>2+</sup> entry correlated with postoperative circulating interleukin-6 levels (P < 0.007). Endothelial functional alterations after CS with cardiopulmonary bypass are attributable, in part, to systemic factors present in serum that lead to specific endothelial enhanced Ca<sup>2+</sup>-signaling. This enhancement can be separated in vitro as an increased Ca<sup>2+</sup> entry not present in serum from patients recovering from TJA.

PMID: 16717299 [PubMed - indexed for MEDLINE]