

4. Diskussion

In vielen Arbeiten wurde der endothelialen Dysfunktion eine entscheidende Rolle bei postoperativen Komplikationen nach CABG mit HLM zugeschrieben. In dieser Arbeit wurde bewiesen, dass postoperatives Serum von diesen Patienten in-vitro eine intensivere Ca^{2+} Signalkaskade in humanen EZ hervorruft. Diese Beobachtung liess sich nicht mit präoperativem Serum der selben Patienten reproduzieren. Zusätzlich wurde festgestellt, dass Serum von Patienten die sich weniger invasiven Eingriffen wie Gelenkendoprothesen unterzogen, keine der genannten Veränderungen in der Ca^{2+} Signalgebung hervorrief. Durch pharmakologische Aufschlüsselung der Ca^{2+} -Signale stellten wir fest, dass mit hoher Wahrscheinlichkeit der kapazitative Ca^{2+} -Influx die stärkeren Ca^{2+} -Signale verursacht.

4.1 ATP als Botenstoff

Nukleotide spielen eine wichtige Rolle in der Nukleinsäuresynthese und im intrazellulärem Energiemetabolismus. Zusätzlich erfüllen sie eine wichtige Funktion als extrazelluläre Signalmoleküle [32,33]. In vielen Zellen wie EZ, Thrombozyten und Neuronen wird ATP als Signaltransmitter verwendet. Intrazellulär gespeichertes ATP gelangt hauptsächlich auf drei Wegen in das extrazelluläre Kompartiment: durch Zellyse, transmembranären Transport, und Exozytose. Nach Zellschaden oder Lyse werden Nukleotide freigesetzt und spielen z.B. bei der Reaktion auf Gefässschäden eine wichtige Rolle. Hierbei kommt es zur Beeinflussung der Hämostase, Modulation des Gefässstonus, Rekrutierung von Neutrophilen und zur gesteigerten Leukadhesion zum Gefässendothel. Die oben genannten Vorgänge werden durch Aktivierung von EZ, der Interaktion von NO und Prostaglandin I₂ an verschiedenen Rezeptoren der Gefässmedia inhibiert. Am Herzen modulieren Nukleotide die Aktivität der L-Typ Ca^{2+} -Kanäle und beeinflussen somit die Kontraktilität des Myokards. Es wurde in verschiedenen Arbeiten beschrieben, dass Agonisten am Adenosinrezeptor einen protektiven Effekt auf das Myokard während Ischämie/ Reperfusionseignissen haben. Dabei wurde beobachtet das exogenes Adenosin das Infarktgebiet verkleinert und die Erholung Ventrikelpumpfunktion verbessert [34].

Unterschiedliche Nukleotide wie z.B. GTP, UTP, AMP oder ATP können purinerge Rezeptoren aktivieren. Purinerge Rezeptoren kommen in nahezu allen Zelltypen vor und

lassen sich in zwei Klassen unterteilen. Rezeptoren die nach Aktivierung Ionenkanäle in der Zellmembran öffnen gehören zur P2X Klasse, wohingegen die P2Y Rezeptoren 7 transmembranäre G-Proteine aktivieren.

Man kann davon ausgehen das die hier beschriebenen Ca^{2+} -Signale von P2Y Rezeptoren ausgelöst wurden [31]. Die von ATP ausgelösten Ca^{2+} -Signale in humanen Gefässendothel bestehen aus einer initialen „Spitze“, die durch eine Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern bedingt ist, gefolgt von einem Plateau das durch Influx von extrazellulärem Ca^{2+} entsteht.

Die Wahl ATP zum induzieren von Ca^{2+} -Signalen zu nutzen wurde getroffen da sich hiermit verlässliche und reproduzierbare Ca^{2+} -Signale auslösen liessen. Es war nicht beabsichtigt differenzierte G-Protein vermittelte Signalkaskaden näher zu eruieren.

4.2 Rezeptorvermittelter Ca^{2+} Einstrom

Rezeptorvermittelter Ca^{2+} Einstrom in EZ kann durch Kationenkanäle in der Zellmembran, IP_3 vermittelter Ca^{2+} Freisetzung aus intrazellulären Speichern und aus Mitochondrien erfolgen. Ausserdem wird durch Entleerung intrazellulärer Speicher der sog. kapazitative Ca^{2+} Influx über membranständige Kanäle ausgelöst. Der Grossteil des intrazellulär gespeicherten Ca^{2+} in EZ befindet sich im endoplasmatischen Retikulum.

4.3 Extrazelluläres Ca^{2+}

Werden Ca^{2+} bindende Stoffe wie EGTA oder EDTA in das extrazelluläre Medium gegeben so kann man den Ca^{2+} Einstrom von extrazellulär unterbinden. Unter dieser Bedingung stammen intrazelluläre Ca^{2+} Signale aus den intrazellulären Kompartimenten. Damit ergibt sich eine elegante und häufig verwendete, Methode um den Ursprung von Ca^{2+} -Signalen zu eruieren [53].

Ohne den Ca^{2+} Einstrom aus dem extrazellulären Milieu war keine signifikante Differenz in der Intensität des Ca^{2+} Signals nach Stimulierung mit ATP in allen 4 Gruppen (präop und postop) feststellbar. Daraus lässt sich schlussfolgern das die höheren Ca^{2+} Signale die sich in der postoperativen CS Gruppe beobachten liessen, sich nicht in Abwesenheit eines Ca^{2+}

Einstroms von extrazellulär reproduzieren lassen. Dass die Differenzen in der postoperativen CS Gruppe alleine durch vermehrte Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Kompartimenten bedingt ist, erscheint damit weniger wahrscheinlich.

4.4 Spannungsabhängige Ca^{2+} Kanäle

Die Existenz von VOCC in EZ wurde lange Zeit kontrovers diskutiert ist mittlerweile aber akzeptiert [3,37]. Die meisten charakterisierten VOCC in EZ lassen nur einen geringen Ca^{2+} Influx in das Zytoplasma zu. Eine Depolarisierung der Plasmamembran mit hohen extrazellulären K^+ Konzentrationen verhindert einen Rezeptor stimulierten Ca^{2+} Einstrom in EZ. In Zellen mit einem hohen Anteil an VOCC wie z.B. Herzmuskelzellen, führt diese Form der Depolarisierung zu einer Öffnung der VOCC. In dieser Hinsicht ist es unwahrscheinlich das VOCC in EZ einen grossen Einfluss auf die Nettowerte der intrazellulären Ca^{2+} Homöostase haben [36]. Um die Rolle von VOCC in unseren Messungen näher zu eruieren wiederholten wir die Experimente nach Blockade der VOCC mit $1\mu\text{g}$ Nifedipin. Nifedipin gehört zur Gruppe der Dihydropyridine und ist ein zuverlässiger Hemmer von langsamen Kalziumkanälen (L-Typ).

Das ATP induzierte Ca^{2+} -Signal in der CS Gruppe war unter VOCC Blockade durch Nifedipin weiterhin signifikant höher als in der OS Gruppe. Das könnte auf eine Abwesenheit von VOCC in den von uns getesteten HAEC hinweisen oder bedeuten dass VOCC vorhanden sind aber keinen Anteil an den von uns gemessenen Ca^{2+} Signalen haben oder das ATP einen Ca^{2+} Influx aktiviert der unabhängig von VOCC ist.

ATP induzierten Ca^{2+} -Signale in venösen Endothelzellen (HUVECS) zeigten in anderen Studien/Experimenten ebenfalls keine Abschwächung der Ca^{2+} Signale durch Nifedipin [38].

4.5 Intrazelluläre Ca^{2+} -Speicher und kapazitiver Ca^{2+} Einstrom

CPA wird seit langem experimentell als „Werkzeug“ zur Charakterisierung von Ca^{2+} Signalen in Zellen genutzt [41]. Es inhibiert spezifisch die Ca^{2+} -ATPase des SER/ER und führt dadurch zu einer Ca^{2+} Freisetzung da die Ca^{2+} -Homöostase ohne diese „Ionenpumpe“ nicht aufrecht gehalten werden kann. In einem normalen extrazellulären Milieu werden durch Entleerung des SER/ER die SOCC aktiviert und es kommt zum kapazitiven Ca^{2+} Influx. Wird CPA jedoch in einem Ca^{2+} freien extrazellulären Milieu appliziert kann man die im SER/ER gespeicherte Ca^{2+} Menge bestimmen da es zu einer annähernd vollständigen Entleerung des SER/ER kommt. Deshalb nutzten wir zur Evaluierung des Inhalts der intrazellulären Ca^{2+} Speicher diesen reversiblen Inhibitor der Ca^{2+} -ATPase.

Nach mehreren Tests zeigte sich das die Zellen der postoperativen CS Gruppe im zeitlichen Verlauf signifikant mehr Ca^{2+} aus ihren ER freisetzen als die HAEC der restlichen Gruppen. Die absolute Differenz im Fluoreszenzanstieg zwischen den Gruppen erscheint nicht sehr gross, doch prozentual ergeben sich Unterschiede von 33% für die maximal erreichte $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Da der Aktivierungsgrad der SOCC u.a. von der $[\text{Ca}^{2+}]$ im ER/SER abhängig ist kann man annehmen das die höhere $[\text{Ca}^{2+}]$ im ER der postoperativen CS Gruppe für eine stärkere Aktivierung der SOCC verantwortlich ist.

Mn^{2+} Verdrängungsversuche werden Zeit zur Quantifizierung des Ca^{2+} Einstroms in das Zytoplasma genutzt [31,40.]. Dabei werden die intrazellulären Ca^{2+} Speicher z.B. mit CPA geleert. Das ausströmende Ca^{2+} wird danach von verschiedenen Ca^{2+} Transportsystemen (Ca^{2+} -ATPase, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Exchanger) in den extrazellulären Raum transportiert. Das austretende Ca^{2+} cheliiert daraufhin mit dem in der Pufferlösung enthaltenen EGTA, als Ladungsausgleich strömt Mn^{2+} in die Zelle. Bei diesen Vorgängen nimmt die FURA-2 Ausgangsfluoreszenz innerhalb der Zelle mit einer bestimmten Geschwindigkeit ab die mit der Quantität des einströmenden Mn^{2+} korreliert. Aus der Quantität des einströmenden Mn^{2+} lassen sich wiederum Rückschlüsse auf das Menge des einströmenden Ca^{2+} nach Entleerung der intrazellulären Speicher ziehen.

Bei den durchgeführten Mn^{2+} Verdrängungsversuchen wurde deutlich das in Zellen der postoperativen CS Gruppe die Fluoreszenz deutlich schneller abfiel als in den anderen Gruppen. Da die Beteiligung von SOCC (siehe oben) oder ROCC am Ca^{2+} Influx

unwahrscheinlich ist, kann das als Hinweis auf vermehrten kapazitiven Ca^{2+} Einstrom in dieser Gruppe gewertet werden.

4.6 Inflammatorische Zytokine

Während herzchirurgischen Eingriffen werden im gesamten Körper vermehrt Zytokine ausgeschüttet, zu denen u.a. IL-6 gehört. IL-6 fördert die Adhäsion und Migration von Leukozyten und Monozyten, durch die Endothelbarriere, in das Gewebe und dessen subsequente Schädigung [20, 42]. Es ist ein wichtiger Baustein der Inflammationskaskade kann aber auch direkt schädliche Effekte ausüben [45]. Als gesichert gilt, dass die Konzentration von IL-6 zur Verlaufsbeobachtung und Einschätzung der Intensität von systemischen Entzündungen genutzt werden kann [7,44].

Um einen quantitativ messbaren Parameter für die Intensität der systemischen Inflammation zu haben wurden die postoperativen IL-6 Konzentrationen im Serum der jeweiligen Gruppen bestimmt. In beiden Gruppen zeigte sich ein postoperativer Anstieg der IL-6 Konzentration, der in der CS Gruppe jedoch wesentlich ausgeprägter verlief. Diskutiert wird noch die Rolle der HLM in diesem Kontext obwohl einige Arbeiten darauf hinweisen das auch mit neueren HLM Verfahren oder bei CABG ohne HLM (also OPCABG) eine starke systemische Inflammation auftreten kann [43,44]. IL-6 hat neben seiner Funktion als Botenstoff auch einige direkte Effekte so ist erwiesen das es negativ inotrop auf das Myokard wirkt [45] und als unabhängiger Prädiktor für atriale Fibrillation nach CABG, herangezogen werden kann [43]. Bei der linearen Regressionsanalyse fand sich eine starke Korrelation zwischen postoperativen IL-6 Werten und der mittleren Ca^{2+} Konzentration nach Stimulation in der CS Gruppe. Diese enge Verknüpfung liess sich nicht in der orthopädischen Gruppe nachweisen. Die Korrelation darf jedoch nicht ohne weitere Beweise als kausal angesehen werden. Vielmehr handelt es sich hierbei um eine zufällige Entdeckung, die nicht wirklich verwundert, wenn man bedenkt, das beide Werte sich in der postoperativen CS Gruppe in die selbe Richtung bewegt haben.

4.7 Einschränkungen der Bewertung der Daten

Herzchirurgische Eingriffe verursachen eine Stressreaktion die durch das Immunsystem vermittelt wird. Ob diese Reaktion durch den Eingriff selbst oder durch Einsatz der HLM bedingt ist wurde noch nicht hinreichend geklärt. Da in dieser Arbeit keine herzchirurgische Patientengruppe integriert wurde die im sog. Off-pump Verfahren also ohne Verwendung einer extrakorporalen Zirkulation operiert wurde, lässt sich nicht beweisen ob die beobachtete Inflammationsreaktion durch den Eingriff selbst oder die HLM verursacht war.

Patienten aus der CS Gruppe hatten mehr Komorbidität und chronische Medikation als in der OS Gruppe was potentiell die Messungen beeinflusst haben könnte. Jedoch wurden in den Messungen mit präoperativen Seren kaum Unterschiede zwischen den Ca^{2+} Signalen der beiden Gruppen gefunden was diese Variablen als signifikant beeinflussende Faktoren eher unwahrscheinlich macht.

Bei ex-vivo Experimenten mit Zellen muss beachtet werden, das sich diese in-vivo potentiell anders verhalten, da sie in-vivo weniger Zeit zur Anpassung haben.

Gerinnungsfaktoren aus dem Plasma können an EZ binden und ihre Funktion somit beeinflussen. Da wir Serum in unseren Versuchen nutzten, kann diesem Faktor nicht Rechnung getragen werden.

IL-6 ist als Zytokin in eine Vielzahl von Inflammationskaskaden eingebunden und hat an verschieden Organen unterschiedliche, meist proinflammatorische Effekte. In Osteoblasten-artigen Zellen wurde gezeigt das durch Ca^{2+} Signale die Sekretion von IL-6 stimuliert werden kann [19]. Ebenso ist erwiesen das in menschlichen Fibroblasten Signale die durch lösliche IL-6 Rezeptoren vermittelt werden eine Änderung der intrazellulären Ca^{2+} Signale und Chemokin-expression hervorruft [17]. Unter diesem Gesichtspunkt sind drei Hypothesen zulässig 1) die gemessenen Ca^{2+} -Signale sind Ursache der erhöhten IL-6 Konzentration 2) IL-6 ist Ursache der veränderten Ca^{2+} -Signale 3) veränderte Ca^{2+} -Signale und erhöhte IL-6 Konzentration sind Phänomene die zwar im selben Kontext auftreten aber unabhängig voneinander sind. Mittels Verwendung spezifischer Antikörper gegen IL-6 hätte man untersuchen können ob die Ca^{2+} -Signale nach funktioneller Unterdrückung des IL-6 Signals weiterhin die selbe Charakteristik aufweisen.

Die Ca^{2+} -Signale in den respektiven Gruppen zeigen hohe Standardabweichungen auf und führen so zu teilweise überlappenden Signalen, welche ein Hinweis auf Konkordanz zwischen den Gruppen ausgelegt werden kann. Das Ausmass der Standardabweichung reflektiert die starke interindividuelle Schwankungsbreite bei Messungen an einzelnen Zellen in Kultur, die bei diesen Untersuchungen den Regelfall darstellt [40]. Um trotzdem ein repräsentatives Ergebnis zu erhalten wurde eine grosse Anzahl von Zellen vermessen. Obwohl die Differenzen der verglichenen Gruppen unter 30% liegen kann man hier von relevanten Veränderungen der Ca^{2+} Signalcharakteristik ausgehen, wie in anderen Arbeiten aufgezeigt wurde [39].

Patienten aus der CS Gruppe hatten eine höhere Inzidenz von Komorbidität und erhielten häufiger eine chronische Medikation, im Rahmen der Behandlung ihrer Gefässerkrankung. Theoretisch könnte angenommen werden das dies einen Einfluss auf die gezeigten Ergebnisse hat. Das ist jedoch eher unwahrscheinlich, da die gemessenen Ca^{2+} -Signale der präoperativen Gruppen nicht davon beeinflusst zu sein scheinen.

Auffällig war, dass Kreislaufinstabilitäten in der CS Gruppe häufiger waren, was durch den vermehrten intraoperativen Einsatz von Vasopressoren deutlich wurde. Ob eine endotheliale Dysfunktion hierfür verantwortlich gemacht werden kann oder ob der Gebrauch von vasoaktiven Substanzen das postoperative Ca^{2+} -Signal in Endothelzellen verändert, kann nur spekuliert werden.

Wie zu erwarten war, hatten die Patienten aus der CS Gruppe eine im Durchschnitt längere Operationszeit und zeigten häufiger Symptome die auf das Vorliegen von SIRS hinwiesen (siehe Tabelle 1).

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden das postoperative Serum Mediatoren enthält, die endotheliale Funktion von Blutgefäßen ex-vivo verändern. Die Veränderungen könnten durch einen einzelnen Faktor verursacht sein, wahrscheinlicher ist jedoch das, das Zusammenspiel von pro- und antiinflammatorischer Mediatoren die Ursache ist.

Die postoperativ veränderten Ca^{2+} -Signale sind charakterisiert durch einen vermehrten Ca^{2+} Einstrom aus dem extrazellulärem Raum. Dieser wird wahrscheinlich von der vorhergehenden G-Protein vermittelten, Entleerung IP_3 -sensitiver intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher aktiviert. Das weist stark auf eine entscheidende Rolle des kapazitiven Ca^{2+} Einstroms bei der Genese dieser Ca^{2+} Signale hin. Eine Beteiligung von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen ist eher unwahrscheinlich.

Ob eine pharmakologische Beeinflussung der aufgezeigten Ca^{2+} -Signalcharakteristik einen klinischen Vorteil bei der Behandlung von postoperativen Inflammationszuständen hat muss noch untersucht werden.