

Aus der Klinik und Poliklinik für Anaesthesiologie
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. N. Roewer

**Die Wirkung von Allgemeinanästhetika auf die
Prostacyclinproduktion in primären humanen
Nabelschnurendothelzellen (HUVEC)**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von

Marcus O. Thudium
aus Düsseldorf

Würzburg, August 2007

Referent: Priv.-Doz. Dr. P. Tas

Koreferent: Prof. Dr. H. Stopper

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Februar 2008

Der Promovend ist Arzt

Inhaltsverzeichnis

I. EINLEITUNG	1
1. GEFÄßANATOMIE	2
2. REGULATION DES GEFÄßTONUS	2
3. RELAXIERENDE FAKTOREN	4
3.1 Prostacyclin	4
3.2 NO	7
3.3 „Endothelium Derived Hyperpolarizing Factor“	8
3.4 Zusammenfassung – Relaxierende Faktoren	9
4. KONTRAHIERENDE FAKTOREN	11
4.1 Endothelin (ET)-1	11
4.2 Prostaglandin H ₂ und Thromboxan A ₂	12
4.3 Superoxid Anionen	12
4.4 Zusammenfassung – Kontrahierende Faktoren	13
5. ZUSAMMENSPIEL VON PGI ₂ UND NO-SIGNALWEGEN	14
6. DER EINFLUSS VON ANÄSTHETIKA	15
7. EINGESETZTE ANÄSTHETIKA	19
7.1 Halothan	19
7.2 Isofluran	19
7.3 Propofol	20
8. ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT	21
8.1 Charakterisierung der Histamin-induzierten Prostacyclinbildung	21
8.2 Einfluss von Allgemeinanästhetika auf die Prostacyclinbildung	21
8.3 „Cross-talk“ zwischen PGI ₂ und NO-Signalwegen	22
II. MATERIAL UND METHODEN	23
1. MATERIAL	23
1.1 Verwendete Puffer und Medien	23
1.2 Zellkultur	24
1.3 Prostacyclin-Versuche	25
1.4 Prostacyclin-Bestimmung	25
1.5 Proteinbestimmung	25
1.6 Bestimmung der intrazellulären Ca ²⁺ -Konzentration	26
2. METHODEN	27
2.1 Anlegen der Zellkulturen	27
2.2 Verwendung volatiler Anästhetika	29
2.3 Prostacyclin-Versuche	30
2.4 Bestimmung des zytoplasmatischen Ca ²⁺	32
2.5. Statistik	34
III. ERGEBNISSE	35
1. CHARAKTERISIERUNG DER HISTAMIN-INDUZIERTEN PROSTACYCLINBILDUNG	35
1.1 Dosisabhängigkeit der Prostacyclinbildung	35
1.2 Zeitabhängigkeit der Prostacyclinbildung	37
1.3 Kalziumabhängigkeit der Prostacyclinbildung	38
1.4 Einfluss von PMA auf die Prostacyclinbildung	41
2. DER EINFLUSS VON ALLGEMEINANÄSTHETIKA AUF DIE PROSTACYCLINBILDUNG	42
2.1 Einfluss von Halothan auf die Prostacyclinbildung	42
2.2 Einfluss von Isofluran auf die Prostacyclinbildung	43
2.3 Einfluss von Propofol auf die Prostacyclinbildung	44
3. „CROSS-TALK“ ZWISCHEN PROSTACYCLIN UND NO-SIGNALWEGEN	45
3.1 Einfluss von L-NAME und SNP auf die Prostacyclinbildung	45

IV. DISKUSSION	47
1. CHARAKTERISIERUNG DER HISTAMIN-INDUZIERTEN PROSTACYCLIN-BILDUNG.....	47
1.1 Warum HUVECs?.....	47
1.2 Dosis- und Zeitabhängigkeit der Prostacyclinbildung.....	47
1.3 Kalzium-Abhängigkeit der Prostacyclinbildung.....	48
1.4 Einfluss von PMA auf die Prostacyclinbildung.....	49
2. DER EINFLUSS VON ALLGEMEINANÄSTHETIKA AUF DIE HISTAMIN-INDUZIERTE PROSTACYCLINBILDUNG.....	49
2.1 Einfluss von Halothan auf die Prostacyclinbildung.....	49
2.2 Einfluss von Isofluran auf die Prostacyclinbildung.....	50
2.3 Einfluss von Propofol auf die Prostacyclinbildung.....	50
3. „CROSS-TALK“ ZWISCHEN PROSTACYCLIN UND NO-SIGNALWEGEN.....	51
3.1 Einfluss von L-NAME und SNP auf die Prostacyclinbildung.....	51
3.2 Mögliche Wirkungsweisen der Anästhetika.....	52
V. ZUSAMMENFASSUNG	55
LITERATURVERZEICHNIS	57
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	72
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	73

I. Einleitung

Viele in der Klinik verwendete Anästhetika verursachen im Laufe der Narkose eine Vasodilatation. Hierdurch wird beim Patienten eine Hypotension erzeugt, die jedem Anästhesisten bekannt ist. Dieser berüchtigte Effekt wurde auch in klinischen Studien beobachtet [1,2]. Der Blutdruckabfall kann in bestimmten Fällen auch erwünscht sein. Bei Operationen an Gefäßen oder in gefäßreichen Geweben wird eine kontrollierte Hypotension während der Narkose angestrebt. Unter anderem bei Eingriffen im Bereich der Neurochirurgie [3,4], der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie [5] und der Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde [6] kommen derartige Methoden häufig zur Anwendung.

Die Vasodilatation bei der Narkose kann jedoch auch gefährliche Auswirkungen haben, besonders bei älteren, multimorbiden Patienten, bei denen der Blutdruck nicht unter bestimmte Werte absinken sollte, um die Perfusion von Organen nicht zu gefährden. Ausgiebige Studien wurden unternommen, um verschiedene Anästhetika bezüglich ihrer Wirkung auf den Kreislauf zu vergleichen. Die blutdrucksenkenden Effekte scheinen bei unterschiedlichen Anästhetika durchaus vergleichbar zu sein [1,2,7,8]. Sie treten nicht nur bei erwachsenen Patienten, sondern auch bei Kindern auf [9].

Unter physiologischen Bedingungen spielt das periphere Gefäßsystem mit seinen ausgefeilten Regulationsmechanismen die Rolle eines Verteilungssystems, welches die Perfusion der Gewebe und Organsysteme des Körpers sicherstellt. Von zentraler Bedeutung ist hierbei die Funktion des Endothels und der darunter liegenden glatten Muskulatur. Obwohl bekannt ist, dass Anästhetika in die Funktion des Endothels und der glatten Muskulatur eingreifen, ist der Mechanismus der Anästhetika-induzierten Vasodilatation noch weitgehend ungeklärt [10].

1. Gefäßanatomie

Einschließlich der Kapillaren haben alle Blutgefäße drei anatomische Wandschichten:

- die äußere Tunica adventitia,
- die Tunica media und
- die innere Tunica intima.

Die relative Dicke der Wandschichten unterscheidet sich abhängig von Lage und jeweiliger Funktion des Gefäßes.

Die Adventitia ist sehr unterschiedlich in ihrem Aufbau und enthält die Blutversorgung und Innervation der Gefäßwand. Die Media besteht hauptsächlich aus glatten Muskelzellen, in größeren Gefäßen jedoch auch zum Teil aus Kollagenfasern und elastischen Fasern.

Die Intima jedes Gefäßes enthält eine einzelne Schicht von Endothelzellen, die parallel zum Blutfluss ausgerichtet sind sowie in den meisten arteriellen Gefäßen eine dünne Basallamina [11].

2. Regulation des Gefäßtonus

Nach Stekiel *et al.* [10] tragen neurale, humorale, intrinsische, transmurale und endotheliale Mechanismen zur aktiven Regulation des Gefäßtonus bei. In dieser Arbeit werden ausschließlich die endothelialen Mechanismen betrachtet.

Das Endothel ist ein hochspezialisiertes, metabolisch aktives Organ, das die Gefäßinnenwände auskleidet. Es spielt eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der Gefäßhomöostase, da es eine Reihe von Substanzen synthetisiert. Diese Mediatoren regulieren den Tonus und das Wachstum der darunter liegenden glatten Muskulatur. Außerdem regeln sie die Aktivität der zirkulierenden Leukozyten und Thrombozyten und die Gefäßdurchlässigkeit [12]. Sowohl die Endothelzellen der arteriellen als auch der venösen Gefäße haben eine ähnliche Kapazität, vasoaktive Substanzen freizusetzen [13].

Nach einem Modell von Daugherty *et al.* [14] wird der vaskuläre Tonus durch ein komplexes Zusammenspiel an relaxierenden und kontrahierenden Faktoren reguliert. Zu der relaxierenden Seite zählen Stickstoffmonoxid (NO) und Prostacyclin, jedoch auch der umstrittene *endothelium derived hyperpolarizing factor* (EDHF). Zu den kontraktiven Mechanismen zählen Thromboxan A₂, Endothelin (ET)-1 sowie Prostaglandin H₂.

In einer exakten Balance wird durch das Zusammenspiel dieser Faktoren der notwendige Gefäßtonus aufrechterhalten. Die Komplexität dieses Zusammenspiels zeigt sich erst, wenn dieses versagt. So wird eine Imbalance dieser Substanzen im Körper für Krankheiten verantwortlich gemacht. Ein Mangel auf der Seite der relaxierenden Faktoren geht zum Beispiel einher mit der Entstehung von Vasospasmen, Hypertonie, Atherosklerose und Herzinfarkt [15,16,17,18].

Die einzelnen Faktoren sollen nun noch einmal im Detail besprochen werden.

3. Relaxierende Faktoren

3.1 Prostacyclin

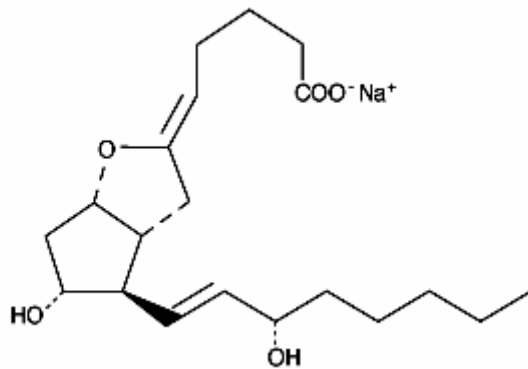


Abbildung 1 Chemische Struktur von Prostacyclin

Prostacyclin, auch genannt Prostaglandin I₂ (PGI₂) oder früher Prostaglanin X (PGX), wurde erstmals 1976 im Rahmen der Entdeckung der instabilen Eicosanoide in Blutgefäßen identifiziert. Einer dieser Mediatoren, die vom Gewebe in Gefäßen synthetisiert wurden, wurde als stark antikoagulatorisch wirksam und als starker Vasodilatator charakterisiert [19]. Der Mediator wird aus Arachidonsäure produziert und verhält sich genau entgegengesetzt zu seinem Gegenspieler Thromboxan A₂, der vasokonstriktorisches und thrombozytenaggregationsfördernde Eigenschaften besitzt. Später bekam dieser Mediator die Bezeichnung PGI₂ [20]. Wie viele andere Substanzen aus der Familie der Eicosanoide wird PGI₂ vom Cyclooxygenase (COX)-System produziert. Arachidonsäure wird zuerst von der Phospholipase A₂ aus den Phospholipidpools entfernt und dann durch die COX zu Prostaglandin H₂ (PGH₂) umgewandelt. PGH₂ dient als Basis für sämtliche Arachidonsäure-Derivate, wie in Abbildung 2 zu sehen ist. Es hat jedoch auch an sich eine vasokonstriktorisches Wirkung. Interessant ist auch, dass zwei direkte Abkömmlinge von PGH₂ komplett unterschiedliche Wirkungen haben, nämlich Prostacyclin und Thromboxan A₂. PGH₂ wird durch die PGI₂-Synthase (PGIS) weiter zu PGI₂ konvertiert [21]. Die Produktion von Prostacyclin vor Ort wird von

COX-1 oder COX-2 in Verbindung mit PGIS durchgeführt [22]. Obwohl PGI_2 in bestimmten Systemen primär ein Produkt der COX-2 ist, variiert die Situation je nach Zelltyp [23]. PGI_2 ist sehr labil und unterliegt einer spontanen Transformation zu 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ innerhalb von Minuten unter Bedingungen *in vivo* [24].

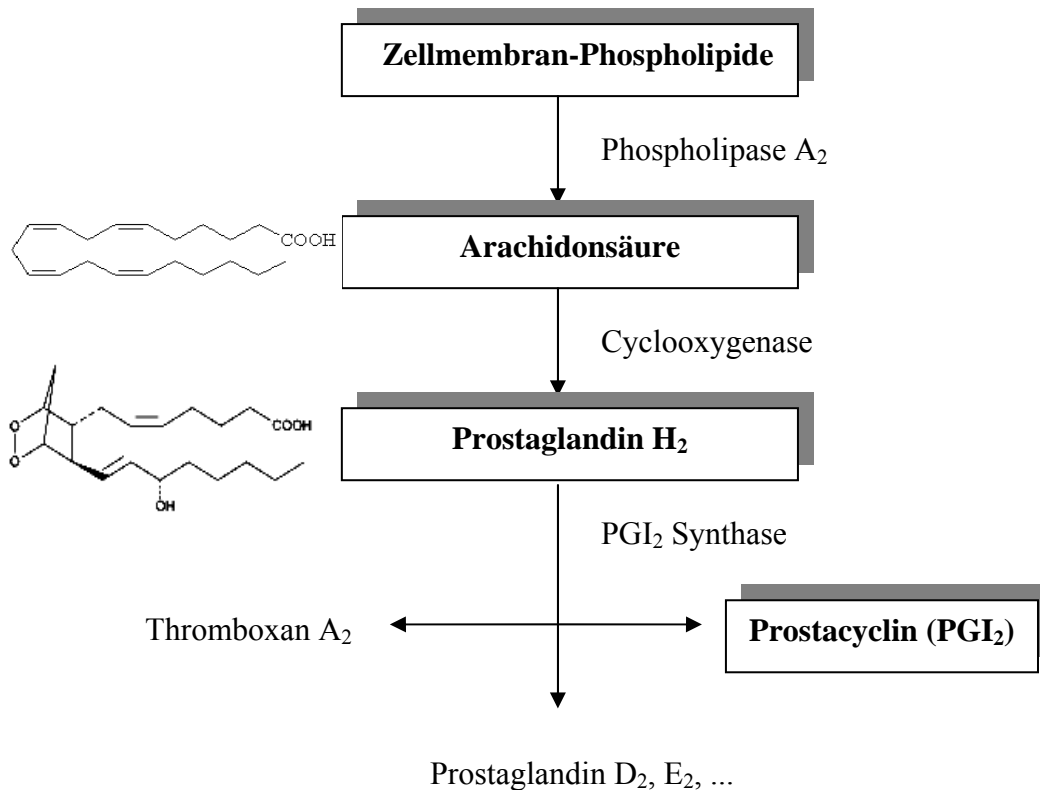


Abbildung 2 Stoffwechselfad der Arachidonsäure-Derivate

Neben NO gehört Prostacyclin zu den wichtigsten vasodilatierenden Substanzen. Für die Prostacyclinsynthese ist die Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern entscheidend, wie bereits durch Versuche mit Ethylenglykoltetraacetat (EGTA) festgestellt werden konnte [25,26]. Es existiert jedoch auch die Meinung, sowohl intrazelluläres als auch extrazelluläres Kalzium sei notwendig für die PGI_2 -Freisetzung [27]. Soweit bis jetzt bekannt, ist der Signalweg folgender [26]:

- Ein Agonist (z.B. Histamin) stimuliert die Phospholipase C.

- Diese hydrolysiert Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphat und setzt Inositol 1,4,5-Trisphosphat (IP₃) sowie 1,2-Diacylglycerol (DAG) frei.
- IP₃ bindet spezifisch an das endoplasmatische Retikulum und verursacht dort eine schnelle Freisetzung von Kalzium.
- Dieses kann entweder an Calmodulin binden und kalziumabhängige Enzyme aktivieren, oder
- die erhöhte Kalzium-Konzentration aktiviert die Phospholipase A₂, was zu einer erhöhten Freisetzung von Arachidonsäure führt, die wiederum unter Einwirkung von Cyclooxygenase in einer vermehrten Synthese von Prostacyclin resultiert (Stoffwechselfad siehe Abbildung 2).
- DAG, das andere Produkt aus Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphat aktiviert die Proteinkinase C (PKC)(siehe unten).

Es existieren eine Reihe von Agonisten, die eine Freisetzung von Prostacyclin bewirken. Dazu gehören Histamin, Bradykinin, ATP, ADP und Acetylcholin. Diese Agonisten führen parallel auch zu einer Ausschüttung von NO [28]. Jedoch auch Scherkräfte können zu einer Ausschüttung von Prostacyclin führen. Scherkräfte werden verursacht durch einen erhöhten Blutstrom im Gefäß [28,29]. Dies bedeutet, dass bei einer erhöhten Flussgeschwindigkeit in einem Gefäß Prostacyclin freigesetzt wird, was zu einer Vasodilatation führt, was wiederum durch den erhöhten Gefäßdurchmesser die Strömung vermindern soll. Pulsierend auftretende Scherkräfte erhöhen die Freisetzung von Prostacyclin noch weiter [29,30].

Die Rolle der PKC bei der Produktion von Prostacyclin ist zur Zeit noch unklar. Es wird jedoch spekuliert, dass mehrere Faktoren, wie die PKC und Kalzium, die Phospholipase A₂ aktivieren und die Summe der Gesamtaktivierung sich in der Produktion von Prostacyclin niederschlägt [31]. Ebenfalls existieren Hinweise darauf, dass die PGI₂-Freisetzung direkt von der PKC abhängig ist [32]. Es ist jedoch aufgrund der Heterogenität der PKC-Familie schwierig, dies allgemein festzustellen [33,34]. Auf jeden Fall gibt es hinreichend Evidenz, dass die Aktivierung der PKC einhergeht mit verstärkter Phospholipidhydrolyse und erhöhter Eicosanoidsynthese in verschiedenen Zellen [33,35,36], während bei

Hemmung der PKC durch selektive Inhibitoren die Freisetzung von Arachidonsäure gehemmt wird [37,38]. Dies weist darauf hin, dass die PKC für die Produktion von Eicosanoiden essentiell ist [33,37].

Es gibt Hinweise, dass Prostacyclin auf Rezeptoren sowohl auf der Zelloberfläche als auch im Zellkern wirkt [39]. Der „klassische“ Signalweg geht über einen G-Protein gekoppelten Rezeptor an der Zelloberfläche [40]. Die Aktivierung dieses Rezeptors durch einen Agonisten führt zu einer erhöhten Produktion von cAMP über die Stimulation der Adenylatcyclase. Dies kann wiederum zur Aktivierung der Proteinkinase A führen oder zur Kalzium-Mobilisierung über Aktivierung der Phospholipase C [41].

Darüber hinaus wird zunehmend die Wirkung von Prostacyclin auf Rezeptoren im Zellkern untersucht. Es ist bekannt, dass Prostacyclin-Agonisten, z.B. Iloprost über so genannte PPARs (*peroxisomal proliferator-activated receptors*) eine Aktivierung der Transkription induzieren können [39].

3.2 NO

Die Rolle von NO als zellulärer *second messenger* lag lange Zeit im Dunkeln. 1980 beschrieben Furchgott und Zawadzki, dass für die Acetylcholin (ACh)-induzierte Vasodilatation ein intaktes Endothel notwendig ist [42]. Die hierfür verantwortliche vasoaktive Substanz wurde später als *endotheliuml derived relaxing factor* oder EDRF bezeichnet [43]. Diese Substanz unterschied sich von Prostacyclin, da der Effekt auch bei Zellen auftrat, die mit Indomethacin behandelt wurden. Wie auch bei Prostacyclin kann diese endothelabhängige Vasodilatation von verschiedenen Agonisten wie Thrombin, ACh, A23187 und anderen ausgelöst werden [44]. Jedoch auch andere Stimuli haben *in vitro* diesen Effekt, wie Hypoxie, erhöhte Flussrate und elektrische Stimulation [45]. EDRF präsentierte sich nicht nur als potenter Vasodilatator, sondern auch als Hemmer der Thrombozytenaggregation und der Adhäsion der Thrombozyten an das Gefäßendothel [46,47,48,49]. Über die Natur des EDRF wurde viel spekuliert. 1986 nahmen sowohl Furchgott als auch Ignarro *et al.* an, EDRF sei NO oder ein nahe verwandtes Molekül [50,51]. Dies bestätigte sich in späteren

Versuchen [52,53]. Obwohl seit langer Zeit schon Nitrate als Vasodilatoren im klinischen Einsatz waren, ist ihre Funktion erst mit der Entdeckung von NO verstanden worden.

NO ist höchst instabil und kann nur bei direkter Übertragung von Zelle zu Zelle seine Funktion erfüllen. Zellmembranen überwindet NO leicht [43].

Im Gegensatz zur Synthese von Prostacyclin ist für die NO Synthese der Kalzium Einstrom in die Zelle ausschlaggebend. Dieser wirkt aktivierend auf die NO-Synthase (NOS), die NO aus L-Arginin freisetzt. NO diffundiert daraufhin vom Endothel in benachbarte glatte Muskelzellen. Dort aktiviert es die Guanylatcyclase, die aus GTP cGMP produziert. Der Anstieg von cGMP in der Zelle wirkt aktivierend auf die Proteinkinase G, welche an der glatten Gefäßmuskulatur eine Relaxation bewirkt. [54].

Es wurden bis jetzt drei Isoformen der NOS beschrieben, von denen eine induzierbar ist und zwei konstitutiv [55]. Die beiden konstitutiven Isoformen, die endotheliale Form (eNOS) und die im Gehirn vorkommende Form (bNOS) sind beide kalziumabhängig. Die endotheliale Form ist membrangebunden, was eine mögliche Ursache für deren Aktivierung unter Einfluss von mechanischem Stress darstellen könnte. Dies dient wahrscheinlich der Regulation des Gefäßdurchmessers abhängig vom Blutfluss [56].

Die induzierbare Isoform iNOS wurde in Makrophagen beschrieben und kann nur unter dem Einfluss von Cytokinen oder Endotoxinen in glatten Muskelzellen oder in Endothelzellen induziert werden. Sie ist unabhängig von Kalzium und produziert im Verhältnis zu den anderen beiden Formen große Mengen an NO. Sie spielt eine Rolle bei der Immunabwehr [14].

3.3 „Endothelium Derived Hyperpolarizing Factor“

Lange Zeit war umstritten, ob neben NO und Prostacyclin noch ein weiterer Faktor zur endothelabhängigen Vasodilatation beiträgt. Dies ist der höchst umstrittene *endothelium derived hyperpolarizing factor* (EDHF).

Um die Existenz des EDHF nachzuweisen, war es notwendig, sowohl NO als auch Prostacyclin Signalwege zu blockieren. Nachweise wurden erbracht, dass

das Endothel unter diesen Bedingungen ein Molekül produziert, das in die benachbarten glatten Muskelzellen der Tunica media diffundiert und dort durch Hyperpolarisierung eine Relaxation bewirkt. Die Freisetzung von EDHF ist mehr an den Einstrom von Kalzium aus dem Extrazellulärraum als an die Freisetzung aus internen Speichern gekoppelt [25].

Die Hyperpolarisierung wird durch die Aktivierung von K_{Ca} -Kanälen erreicht. Auch eine Hemmung des Kalzium-Einstroms in die glatten Muskelzellen wurde beobachtet. Mehrere Kandidaten kommen als EDHF in Frage. Obwohl die chemische Natur des EDHF noch nicht abschließend geklärt ist, existiert doch eine breite Übereinstimmung, dass es sich dabei um einen Metaboliten der Arachidonsäure oder um ein nahe verwandtes Molekül handelt, das über Cytochrom P450 synthetisiert wird [57]. Anandamid und 11,12-*epoxyeicosatrienoic acid* (EET) werden als Kandidaten gehandelt. Ebenfalls in Frage käme ein endogenes Cannabinoid oder einfach ein Anstieg des extrazellulären Kaliums. Es gibt auch Hinweise auf die Existenz von mehreren EDHF sowie auch darauf, dass der Effekt durch elektrische Kopplung im myoendothelialen Spalt zustande kommt und sich somit die Notwendigkeit der Annahme eines EDHF erübrigt [58].

3.4 Zusammenfassung – Relaxierende Faktoren

Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass bei der endothelvermittelten Relaxation der Gefäße die Faktoren Prostacyclin, NO sowie der umstrittene EDHF beteiligt sind. Die beiden potentesten Faktoren sind Prostacyclin und NO, die trotz ihrer völlig unterschiedlichen Herkunft vergleichbare Funktionen erfüllen. In vereinfachter Form sind die Signalwege beider Faktoren in Abbildung 3 dargestellt. Es wird klar, wie beide Signalwege durch identische Agonisten induziert werden können, wie zum Beispiel Acetylcholin, Histamin, Bradykinin. Auch andere Einflüsse können zur Freisetzung dieser vasoaktiven Substanzen führen. Dies sind physikalische Einflüsse, die *in vivo* auf das Endothel einwirken, wie Deformation oder Scherkräfte [28,29,30,45]. Ebenfalls

auffällig ist hier, dass Endothelin-1, der zu den kontrahierenden Faktoren zählt (siehe Kapitel 4), zur Freisetzung von NO und Prostacyclin beiträgt, was der Regulation des Gefäßtonus dient.

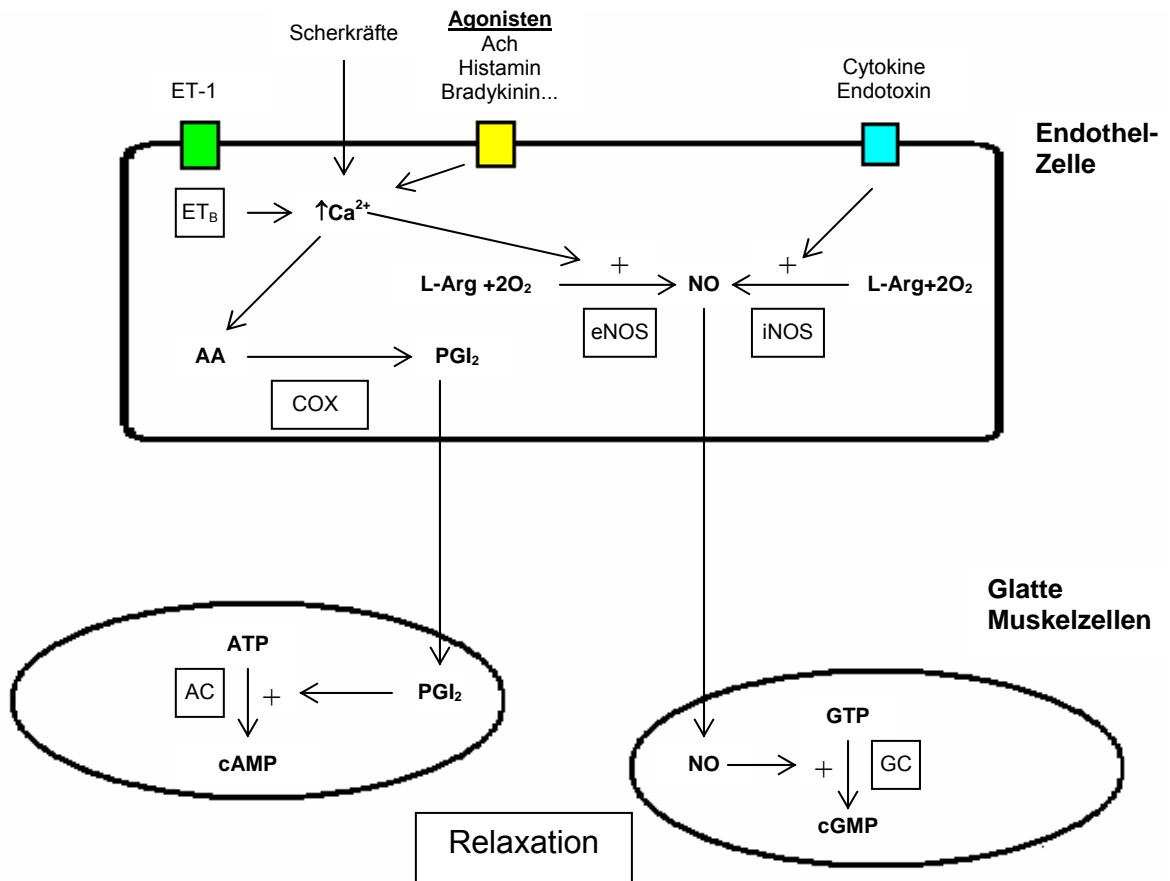


Abbildung 3 Überblick über die relaxierenden Faktoren Prostacyclin und NO
 AA=Arachidonsäure, AC=Adenylatcyclase, Ach=Acetylcholin, ATP=Adenosintri-phosphat, cAMP=zyklisches AMP, cGMP=zyklisches GMP, eNOS= endotheliale Nitric Oxide Synthase, COX=Cyclooxygenase, ET-1=Endothelin-1, ET_B= Endothelin B Rezeptor, GC=Guanylatcyclase, GTP=Guanosintri-phosphat, iNOS=induzierbare NOS, L-Arg=L-Arginin, nach Daugherty *et al.* [13]

4. Kontrahierende Faktoren

Als kontrahierende Faktoren des Endothels sind Prostaglandin H₂, Thromboxan A₂, Superoxid Anionen, sowie Endothelin (ET)-1 zu nennen.

Prostaglandin H₂, Thromboxan A₂ und Superoxid Anionen sind Metabolite der Arachidonsäure. Superoxid Anionen hemmen die NOS, inaktivieren NO und hemmen die Prostacyclinsynthese [14,59,30].

4.1 Endothelin (ET)-1

Der Bedeutendste unter den kontraktiven Faktoren ist ET-1. Es ist der stärkste bekannte Vasokonstriktor und induziert die Proliferation der Gefäßmuskulatur [14]. ET-1 ist eine von 4 nahe verwandten ET Isoformen, ET 1-4. Verschiedene Stimuli können zur Freisetzung von ET-1 führen. Hierzu gehören Endotoxin, Adrenalin (Epinephrin), Angiotensin II, Vasopressin, Insulin, Thrombin, *transforming growth factor-b* und Interleukin-1-b [61]. Jedoch können, ähnlich wie bei den kontrahierenden Faktoren, auch andere Stimuli die Freisetzung von ET-1 auslösen. Dies sind Hypoxie, Scherkräfte und pulsatile Stress [61] sowie Dehnungskräfte [62]. Bei übermäßiger Wandspannung führt dies zur Kontraktion des Gefäßes.

ET-1 bindet an mindestens 2 Rezeptor-Subtypen, A und B. Es sind membrangebundene Rezeptoren, die an G-Proteine gekoppelt sind. Der Subtyp ET_A ist in der glatten Gefäßmuskulatur exprimiert und ist hauptsächlich selektiv für ET-1. Er ist verantwortlich für die Vasokonstriktion. Der Subtyp ET_B ist in Endothelzellen exprimiert. Er ist verantwortlich für die autokrine Freisetzung von NO und Prostacyclin zur Regulation der Vasokonstriktion [14,61]. Es gibt auch Hinweise darauf, dass die kontrahierende Funktion von ET-1 zumindest zu einem Teil über Prostaglandin H₂ und Thromboxan A₂ vermittelt wird [63,64].

4.2 Prostaglandin H₂ und Thromboxan A₂

Prostaglandin H₂ und Thromboxan A₂ sind von Interesse, da Prostaglandin H₂ als Vorläuferform der Eicosanoide selbst eine vasoaktive Funktion besitzt und mit seinem Metaboliten Thromboxan A₂ die genau gegensätzliche Funktion des anderen Metaboliten PGI₂ (und auch von NO) erfüllt. Die beiden Faktoren wirken zusammen auf den Prostaglandin H₂/Thromboxan A₂ Rezeptor [65]. Ihre Wirkung ist vasokonstriktorisch und thrombozytenaggregationshemmend [66]. Prostaglandin H₂ soll die NO-Synthese hemmen [67] und moduliert, wie bereits erwähnt, die vasokonstriktorische Wirkung von ET-1 [63,64]. Außerdem gibt es Hinweise, dass NO umgekehrt die Produktion von TxA₂ und PGH₂ hemmt [68]. TxA₂ hat eine kurze Halbwertszeit und wird schnell aus dem Kreislauf eliminiert. Aufgrund seiner zentralen Rolle in der Pathophysiologie unter anderem bei der Entstehung von Herzinfarkten, aber auch bei Modulation von Zytotoxizität und der Entstehung von Schwangerschaftskomplikationen, spielt Thromboxan eine wichtige Rolle in der Pharmakologie [69,70,71].

4.3 Superoxid Anionen

Es hat sich herausgestellt, dass ein weiterer Faktor bei der Vasokonstriktion eine Rolle spielt: die Superoxid-Anionen (O₂⁻). Sie inaktivieren NO, indem sie es destabilisieren [72]. Des Weiteren zeigte sich, dass sie auch die NO-Synthese hemmen, indem sie inhibierend auf die NOS wirken [73]. Auch die Prostacyclinsynthese wird durch Superoxid-Anionen gehemmt. [72]. Der Arachidonsäure-Metabolismus hat sich als Quelle für Superoxid-Anionen erwiesen. Außerdem könnten sie unter pathologischen Bedingungen für eine Imbalance zwischen kontrahierenden und relaxierenden Faktoren verantwortlich sein [74].

4.4 Zusammenfassung – Kontrahierende Faktoren

Abbildung 4 gibt einen Überblick über die kontrahierenden Faktoren. Genau wie bei den relaxierenden Faktoren ist ein enormer Grad an Vernetzung feststellbar. Nicht nur die einzelnen Faktoren sind miteinander gekoppelt und führen synergistisch ihre Funktion aus, sondern es existieren auch Quervernetzungen zu den Systemen der relaxierenden Faktoren. Nur so kann das Gefäßendothel den Tonus der glatten Muskulatur regulieren.

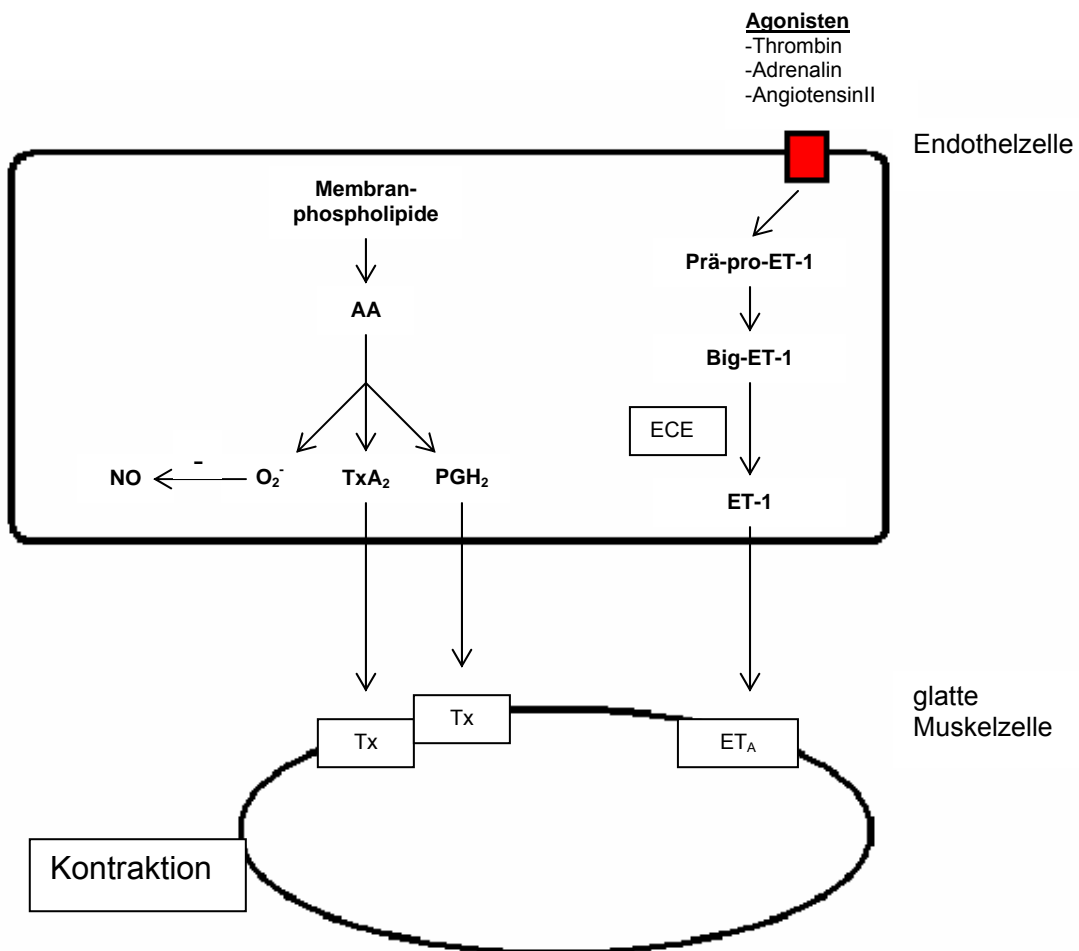


Abbildung 4 Überblick über die kontrahierenden Faktoren

AA=Arachidonsäure, ECE=Endothelin Converting Enzyme, ET-1=Endothelin-1, ET_A =Endothelin A Rezeptor, PGH_2 =Prostaglandin H_2 , Tx=Thromboxan/Prostaglandin Rezeptor, TxA_2 =Thromboxan A_2 , nach Daugherty *et al.*[13]

5. Zusammenspiel von PGI₂ und NO-Signalwegen

Wie bereits beschrieben, spielen sowohl NO als auch PGI₂ eine entscheidende Rolle bei der Regulation des Gefäßtonus, indem sie auf die glatte Muskulatur relaxierend wirken.

Über den so genannten *cross-talk*, also die Interaktion zwischen NO und Prostacyclin ist vor allem im Bereich der Endothelzellen noch relativ wenig bekannt. Da beide Signalwege durchaus vergleichbare Funktionen erfüllen, ist es denkbar, dass kompensatorische Mechanismen existieren, die jeweils beim Ausfall oder der Hemmung eines der Systeme das andere stimulieren.

Die Existenz eines gewissen Zusammenspiels zwischen den beiden Faktoren ist bereits seit längerem bekannt [46,75,76,77], jedoch noch nicht abschließend geklärt. Das derzeitig vorherrschende Konzept besagt, dass NO stimulierend auf die Prostacyclinbildung wirkt [78]. Dies kann durch eine direkte Stimulation der Cyclooxygenase durch NO verursacht werden, aber auch ein indirekter Effekt auf die Prostacyclinbildung über cGMP ist möglich [78]. Im Widerspruch dazu wurde auch eine dosisabhängige Hemmung durch NO schon beobachtet [76].

Jedoch nicht nur NO scheint die Prostacyclinsynthese zu stimulieren, auch umgekehrt ist dies der Fall. Bei Shimokawa *et al.* ist beschrieben, dass Prostacyclin sowohl die NO-Synthese stimuliert als auch den Effekt von NO potenziert [79].

Dies bedeutet, dass:

1. Prostacyclin und NO sich gegenseitig verstärken sowie
2. beide Systeme miteinander „kommunizieren“.

Laut Gambone *et al.* scheint diese synergistische Aktion von einem K⁺_{ATP}-Kanal abhängig zu sein. Außerdem soll die Art der Synergie vom jeweiligen agonistischen Agens abhängen [80].

In einer Arbeit von Vassalle *et al.* wurde dieses Zusammenspiel in *human microvascular endothelial cells-1* (HMEC-1) und *human umbilical vein endothelial cells* (HUVEC) untersucht, indem jeweils der NO-Signalweg mit N^G-Nitro-L-Arginin-Methylester (L-NAME) oder der PGI₂ Signalweg mit

Indomethacin gehemmt wurde. Die Ergebnisse besagen, dass eine Inhibition des COX-abhängigen Signalweges durch eine Erhöhung der NO-Synthese kompensiert wird, jedoch umgekehrt bei einer Hemmung des NO-Signalweges keine kompensatorische Erhöhung von PGI₂ feststellbar ist [81].

Diese Ansicht wird von einer früheren Arbeit von Bolz und Pohl gestützt. Darin wird festgestellt, dass eine Hemmung von PGI₂ durch Indomethacin zu einer erhöhten, Agonisten-Induzierten Ca²⁺-Konzentrationen und damit zu einer erhöhten NO-Synthese führt, während es bei Erniedrigung von NO keinerlei Kompensation gibt. Dies wird in einem Modell erklärt, bei dem PGI₂ seine eigene Freisetzung über einen cAMP-abhängigen negativen Rückkopplungsmechanismus kontrolliert. Gleichzeitig führt das zu einer Stimulation der Ca²⁺-abhängigen NO-Produktion [82]. Vor dem Hintergrund der Regulation des Gefäßtonus würde ein derartiger Mechanismus durchaus Sinn ergeben.

Ein anderes Bild vermitteln Osanai *et al.*, die unter Stimulation durch Scherkräfte einen Anstieg der Prostacyclinproduktion auf das Doppelte erzielten, während die NO Synthase gehemmt wurde. Die Hemmung der Guanylatcyclase brachte das gleiche Ergebnis [83]. Möglicherweise existiert also auch hier eine negative Rückkopplung, die die PGI₂-Ausschüttung reguliert. Dies würde wiederum mit den Ergebnissen von Doni *et al.* übereinstimmen, bei denen NO die PGI₂-Synthese dosisabhängig hemmt [76]. Man sieht anhand der angeführten Studien die Komplexität der Systeme und die zum Teil widersprüchlichen Ergebnisse. Mit Sicherheit lässt sich nur sagen, dass PGI₂ und NO-Signalwege nicht unabhängig voneinander sind.

6. Der Einfluss von Anästhetika

Aus langjähriger klinischer Erfahrung ist bekannt, dass Anästhetika, insbesondere die Gruppe der volatilen Anästhetika, als starke Vasodilatoren wirken. Da das Konzept der Beeinflussung des Gefäßtonus durch das Endothel noch relativ neu ist, ist noch recht wenig über den Einfluss der Anästhetika auf

zelluläre Mechanismen bekannt. Trotz einer großen Anzahl an Untersuchungen sind definitive Aussagen zur Wirkung von Anästhetika auf die NO-vermittelte Gefäßrelaxation problematisch. Es wurden verstärkende sowie hemmende, aber auch fehlende Interaktionen mit der agonisten-induzierten NO/EDRF modulierten Relaxation arterieller Gefäßsegmente beschrieben [84].

Ein Modell von Nakamura *et al.* stellt die möglichen Ansatzpunkte der volatilen Anästhetika Halothan, Sevofluran und Isofluran im Bezug auf NO dar. In ihren Experimenten an Ratten-Aorten fanden Nakamura *et al.* unter anderem eine Hemmung der Acetylcholin-inzuzierten Relaxation unter dem Einfluss von 2% Halothan, 2% Isofluran und 4% Sevofluran [85]. Abbildung 5 zeigt die verschiedenen möglichen Orte, an denen die volatilen Anästhetika eine hemmende Wirkung ausüben könnten.

Bei Isofluran könnte dies sein:

- der Agonisten-Rezeptor
- das Rezeptorgekoppelte G-Protein
- der Kalzium-Einstrom aus dem Extrazellulärraum
- der Kalzium-Einstrom aus internen Speichern
- die Aktivierung der NOS

Halothan könnte in diesem Modell die Guanylatcyclase hemmen, ebenso wie Sevofluran, das zusätzlich noch die Übertragung von NO in die glatte Muskelzelle hemmen könnte.

Relativ wenige Arbeiten gibt es bis jetzt auf dem Gebiet des Einflusses von Anästhetika auf die Cyclooxygenase-Signalwege, wie im vorliegenden Fall auf Prostacyclin.

Heindl *et al.* fanden heraus, dass Sevofluran bei der zweifachen minimalen alveolären Konzentration (MAC) die durch Histamin oder A 23187 stimulierte Prostacyclin-Produktion in HUVEC-Zellen um etwa die Hälfte reduzierte. Bei Isofluran zeigte sich kein Effekt. Die basale Prostacyclin-Produktion blieb durch die Anästhetika unbeeinflusst [92].

Loeb *et al.* beschreiben eine Hemmung der durch Bradykinin, ATP und Mellitin induzierten Prostacyclinproduktion durch Halothan. Isofluran zeigte keinen Effekt [31].

Noch weniger ist über die Interaktion NO-PGI₂ unter Anästhetikaeinfluß bekannt. Gambone *et al.* beschreiben eine Hemmung der synergistischen Aktion, die abhängig von K⁺_{ATP} Kanälen ist, durch Isofluran [80,93].

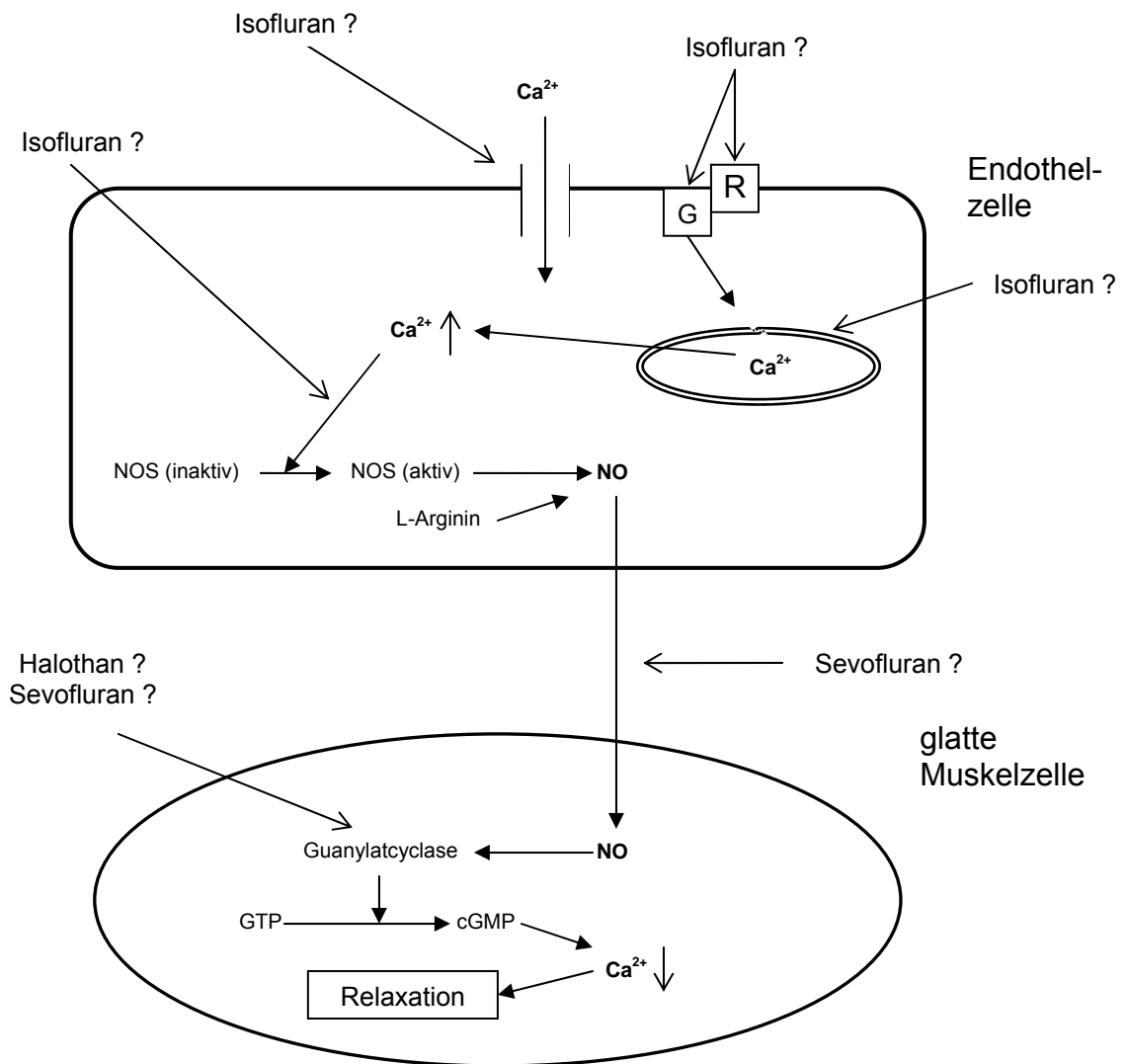


Abbildung 5 Mögliche Wirkorte volatiler Anästhetika im NO-Signalweg
R=Rezeptor, G=G-Protein, NOS=NO-Synthase, nach Nakamura *et al.* [85]

Die Datenlage über die Wirkung von Anästhetika auf molekularer Ebene ist uneindeutig. Wie schon gezeigt, ist nicht klar, an welchen Stellen die

Anästhetika interagieren. Dies wäre jedoch entscheidend, um die Wirkungsweise zu verstehen. Einige Arbeiten beschäftigen sich mit der Wirkung von Halothan auf Rezeptor- und G-Protein-Ebene in unterschiedlichen Zellspezies [86,87,88,89,90,91]. Daten über die Wirkung auf HUVECs gibt es jedoch nicht. Auch bei den eben genannten Arbeiten scheinen die Ergebnisse widersprüchlich. Dies liegt möglicherweise an der unendlich scheinenden Vielfalt der G-Protein-Familie [87]. Es existieren jedoch einige Hinweise auf eine Interaktion von Halothan mit G-Proteinen [86,87,88,89,90,91]. Hierbei werden hemmende und stimulierende Effekte beschrieben. Auch die Interaktion mit dem Agonisten-Rezeptor ist nicht ausgeschlossen [86]. Außerdem werden Interaktionen mit der Proteinkinase C beschrieben [91]. Die Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf HUVECs ist zwar fraglich, dennoch sollte man die Möglichkeit der Wirkung von Anästhetika auf Agonisten-Rezeptoren sowie heterotrimere G-Proteine in Betracht ziehen.

7. Eingesetzte Anästhetika

7.1 Halothan

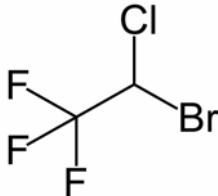


Abbildung 6 Chemische Struktur von Halothan

Halothan (2-Bromo-2-chloro-1,1,1-trifluoroethan) ist ein Inhalationsanästhetikum zur Allgemeinanästhesie. Es ist instabil unter Lichteinstrahlung. Daher wird es in dunklen Flaschen aufbewahrt, wobei 0,01% Thymol als Stabilisator zugefügt ist. Die MAC von Halothan beträgt 0,75%. Halothan wurde erstmals 1951 synthetisiert und 1956 in Manchester erstmals klinisch eingesetzt. Für lange Zeit war es das meistgenutzte Anästhetikum, wurde jedoch später aufgrund seiner Nebenwirkungen von den neueren Produkten wie Isofluran und später Sevofluran und Desfluran vom Markt verdrängt [94,95].

In Ländern der Dritten Welt befindet sich Halothan noch intensiv im Einsatz.

7.2 Isofluran

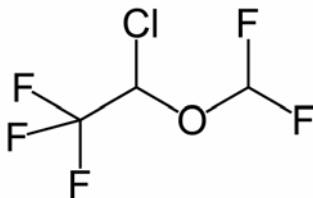


Abbildung 7 Chemische Struktur von Isofluran

Isofluran, 2-chloro-2-(difluoromethoxy)-1,1,1-trifluoro-ethan, ist ein weiteres Inhalationsanästhetikum. Die MAC von Isofluran beträgt 1,15% und liegt daher

höher als bei Halothan. Der Blut/Gas Partitionskoeffizient liegt bei 1,4 [94,95,96].

Auch Isofluran wird zunehmend vom Markt verdrängt, z.B. von den neueren Inhalationsanästhetika, aber auch vom intravenösen Hypnotikum Propofol.

7.3 Propofol

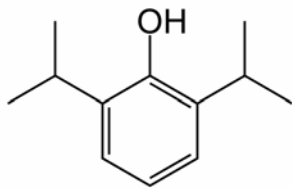


Abbildung 8 Chemische Struktur von Propofol

Propofol, 2,6-bis(1-methylethyl)phenol, ist ein kurzwirksames intravenöses Hypnotikum [97]. Nach früheren komplikationsträchtigen Anwendungen wurde es 1986 erneut unter dem Namen Diprivan® auf den Markt gebracht. Bei der klinischen Anwendung befindet sich Propofol in einer Emulsion in Intralipid.

Propofol wird verwendet zur

- Anästhesieeinleitung bei Erwachsenen und Kindern über 4 Wochen,
- Aufrechterhaltung der Anästhesie bei Erwachsenen und Kindern über 2 Monaten und
- Sedierung bei beatmeten Patienten auf der Intensivstation [98].

8. Zielsetzung dieser Arbeit

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit lässt sich in drei grundlegende Bereiche trennen:

1. Charakterisierung der Histamin-induzierten Prostacyclinbildung
2. Einfluss von Allgemeinanästhetika auf die Prostacyclinbildung
3. *Cross-talk* zwischen PGI₂ und NO-Signalwegen

8.1 Charakterisierung der Histamin-induzierten Prostacyclinbildung

Hierbei war es das Ziel, mehr über den Effekt von Histamin auf die Prostacyclinbildung in HUVECs zu erfahren. Die Dosisabhängigkeit und die Zeitabhängigkeit der Prostacyclinbildung wurden untersucht und somit bildete dies eine Basis für sämtliche folgenden Experimente. Des Weiteren wurde die Abhängigkeit der Prostacyclinbildung vom Kalzium-Einstrom aus dem extrazellulären Medium werden. Außerdem wurde die Rolle Proteinkinase C bei der Prostacyclinproduktion untersucht, indem sie mit Hilfe von Phorbolestern gehemmt wurde.

8.2 Einfluss von Allgemeinanästhetika auf die Prostacyclinbildung

In diesem Abschnitt war es Zielsetzung, herauszufinden, wie die Prostacyclinbildung in HUVECs durch die Anästhetika Halothan, Isofluran und Propofol beeinflusst wird. Hierbei wurde bei Halothan und Isofluran die Prostacyclinbildung unter Einfluss von Histamin gemessen, während bei Propofol die basale Prostacyclinbildung bestimmt wurde.

8.3 „Cross-talk“ zwischen PGI₂ und NO-Signalwegen

Über die Interaktion zwischen PGI₂ und NO-Signalwegen ist wenig bekannt. Deshalb wurde hier der NO Signalweg gehemmt, zum Beispiel mit L-NAME, und die Prostacyclinbildung unter Stimulation beobachtet. Ziel war es, zu untersuchen, wie sich die Prostacyclinbildung unter Hemmung des NO-Signalwegs ändert, um auf mögliche Interaktionen zwischen beiden Signalwegen zu schließen.

II. Material und Methoden

1. Material

1.1 Verwendete Puffer und Medien

M199 Medium

Zugesetzt wurden.

- 20% FCS
- 1% Penicillin/Streptomycin
- 1% RDGF (*retina derived growth factor*) – isoliert aus Rinderaugen

Puffer C (pro 200ml)

Zusammensetzung:

- 25 mM Hepes pH 7,0
- 150 mM NaCl
- 5mM KCl
- 2 mM CaCl₂
- 0,4 mM MgCl₂
- 25 mM D-Glukose

wurde gemischt aus:

- 1g D-Glukose
- 5 ml 1 M Hepes
- 1 ml 1M KCl
- 4 ml 100 mM CaCl₂
- 30 ml 1 M NaCl
- 2 ml 40 mM MgCl₂
- Lösung mit Aqua bidestillata auf 200 ml aufgefüllt

Ca²⁺-freies Medium

- Hergestellt wie Puffer C, jedoch ohne Zusatz von CaCl₂

1.2 Zellkultur

Chemikalien

Gelatine	Boehringer Ingelheim, Heidelberg
Kollagenase A	Roche, Mannheim
M 199 Medium	Invitrogen, Karlsruhe
PBS	Biochrom AG, Berlin
FCS	Linaris, Wertheim Bettingen
Penicillin/Streptomycin	Sigma, Taufkirchen
RDGF	eigene Herstellung aus Rinderaugen
Trypsin-EDTA-Lösung	Sigma cell culture, Deisenhofen
Von-Willebrand-Faktor Antikörper	Dako, Hamburg, Deutschland

Sonstige Materialien

Nabelschnüre	Universität Würzburg Frauenklinik, Abteilung Geburtshilfe
Rotrandfilter	Schleicher Schöll, Dassel
T 25 Flaschen	Greiner, Frickenhausen
Zentrifuge Rotixa /KS	Hettig, Tuttlingen

1.3 Prostacyclin-Versuche

Chemikalien

4 α PD (4 α -Phorbol-12,13-Didecanoat)	Sigma, Taufkirchen
EGTA	Sigma, Taufkirchen
Halothan	Sigma, Taufkirchen
Histamin	Sigma, Taufkirchen
Indomethacin	Sigma, Taufkirchen
Isofluran	Abbott, Wiesbaden
Propofol	Sigma, Taufkirchen
PMA (4 α Phorbol 12-Myristat 13-Acetat)	Sigma, Taufkirchen

Sonstige Materialien

Eppendorf Caps	Eppendorf, Hamburg
Vapor	Dräger, Lübeck

1.4 Prostacyclin-Bestimmung

Prostacyclin-Immunoassay	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
ELISA-Reader + Magellan Software	Tecan, Crailsheim

1.5 Proteinbestimmung

Proteinbestimmungs-Kit	Pierce, Rockford, IL, USA
------------------------	---------------------------

1.6 Bestimmung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration

Chemikalien

Fluo-3 Acetoxymethylester (AM) Molecular Probes, Eugene, OR, USA

Sonstige Materialien

Glasdeckplatten	Bioprotechs, Butler, USA
Perfusionskammer FCS2	Bioprotechs, Butler, USA
Heizsystem für FCS2 Kammer	Bioprotechs, Butler, USA
15 mW Krypton/Argon Laser	Biorad, Hemel Hempstead Herts., GB
Confocal Laser scanning microscope	Biorad, Hemel Hempstead Herts., GB
Lasersharp acquisition software	Biorad, Hemel Hempstead Herts., GB
Spritzenpumpen	Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA
4-Wege-Ventil	Harvard Apparatus
GC-Spritzen, 50 und 100 ml, Gasdicht	Zefa Laborservice, Harthausen

Sonstige, bisher nicht aufgeführten Chemikalien wurden von Merck/VWR International, Darmstadt erhalten.

Sonstige, nicht aufgeführte Materialien und Geräte entstammen dem Bestand der Universität Würzburg.

2. Methoden

Die HUVEC Zellkulturen wurden grundsätzlich für zwei unterschiedliche Versuchsarten verwendet:

1. Prostacyclin-Versuche: In diesen Versuchen wurde der Einfluss von volatilen Anästhetika auf die Prostacyclinbildung untersucht.

2. Ca²⁺-Signalgebung: Hier wurde der Einfluss von Anästhetika auf den Ca²⁺-Einstrom und die Ca²⁺-Freisetzung aus internen Speichern untersucht.

Anschließend an die Prostacyclin-Versuche wurde mittels ELISA der Prostacyclingehalt der Proben bestimmt. Das zelluläre Material wurde einer Proteinbestimmung zugeführt, um den Proteingehalt der Proben feststellen zu können.

2.1 Anlegen der Zellkulturen

Die HUVEC Zellen wurden nach einem einheitlichen Protokoll gewonnen und präpariert. Für die Isolation dieser Zellen wurden Nabelschnüre aus der geburtshilflichen Abteilung der Frauenklinik der Universität Würzburg erhalten. Diese wurden wie folgt präpariert:

Die Nabelschnüre wurden mit 30 ml PBS durchgespült, um grobe Verunreinigungen wie z.B. Blutgerinnsel zu entfernen. Es wurden 15 ml Kollagenase A durch einen Rotrandfilter eingespritzt. Darauf wurden die Nabelschnüre für 12 min bei 37°C inkubiert. Diese Behandlung bewirkt die Ablösung des Endothels von der Innenwand der Nabelschnurvene. Nach der Inkubation wurden die Nabelschnüre ausgestrichen, um eine optimale Lösung der Endothelzellen sicherzustellen. Der Inhalt der Nabelschnurvene wurde in ein Greiner-Röhrchen überführt, wobei noch einmal mit 30 ml PBS steril nachgespült wurde, um möglichst alle Endothelzellen aus der Vene herauszuspülen. Der Überstand wurde bei 1500 U/min 5-6 min zentrifugiert. Der Flüssigkeitsüberstand im Greiner-Röhrchen wurde abgesaugt und verworfen. Das übrig gebliebene Pellet wurde mit 5 ml M199 Medium

aufgenommen, resuspendiert, in eine gelatinebeschichtete T25 Flasche eingefüllt und anschließend über Nacht bei 37°C inkubiert.

Nach dieser Inkubation wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen und erneut frisches M-199 Medium hinzugefügt. Dieser Prozess wurde täglich wiederholt, bis die Zellen in den Flaschen unter dem Mikroskop sichtbar konfluent waren.

Für die Weiterverarbeitung wurde das Medium abgesaugt und die Zellen erneut mit PBS gewaschen. 1 ml Trypsin wurde hinzugefügt und 2 min lang inkubiert, um eine Ablösung der Zellen zu erzielen. Nach Kontrolle unter dem Mikroskop wurden die Flaschen abgeklopft, um eine vollständige Lösung der Zellen zu erreichen. Die Zellen wurden danach in 5 ml M 199 Medium aufgenommen und in Greiner-Röhrchen überführt. Diese wurden dann für 5 min bei 100 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abgesaugt und verworfen.

Nun wurden die Zellen – je nach Versuchsart – unterschiedlich weiterverarbeitet:

- Für die Prostacyclin-Versuche wurden die Zellen nach dem Zentrifugieren mit 20 ml M199 Medium aufgenommen und auf mit 0,5% Gelatine beschichtete 3 cm Petri-Schalen übertragen (jeweils 2 ml Suspension pro Schale).
- Für die Messung der zytoplasmatischen Kalzium-Konzentration mit Hilfe des konfokalen Mikroskops CLSM wurden die Zellen in 5 ml M199 Medium aufgenommen und auf 9 mit 0,5% Gelatine beschichtete Glasplättchen von jeweils 4 cm Durchmesser verteilt. Durch Verwendung von geschliffenen Glasringen war es möglich, die HUVEC Zellen nur in der Mitte der Glasplättchen aufzubringen, um Zellmaterial einzusparen.

Bei unter dem Mikroskop sichtbarer Konfluenz der Zellen konnten diese für die jeweiligen Versuche verwendet werden.

2.2 Verwendung volatiler Anästhetika

In dieser Arbeit wurde unter anderem die Wirkung der volatilen Anästhetika Halothan und Isofluran untersucht. Im alltäglichen Einsatz werden für die Anwendung dieser Stoffe spezielle Verdampfer (Vaporen) verwendet. Diese kamen auch für die vorliegenden Versuche zum Einsatz.

Um die Wirkung der volatilen Anästhetika auf die Zellen untersuchen zu können, war es notwendig, die Pufferlösung mit Anästhetika zu äquilibrieren. Hierzu wurde eine spezielle Vorrichtung verwendet (siehe Abbildung 9).

Hierbei wurde in einem Glaskolben Puffer C mit der jeweiligen Testkonzentration an Anästhetikum für 20 Minuten bei 36°C begast. Danach wurde diese Anästhetikum-äquilibrierte Pufferlösung für die jeweiligen Versuche weiterverwendet.

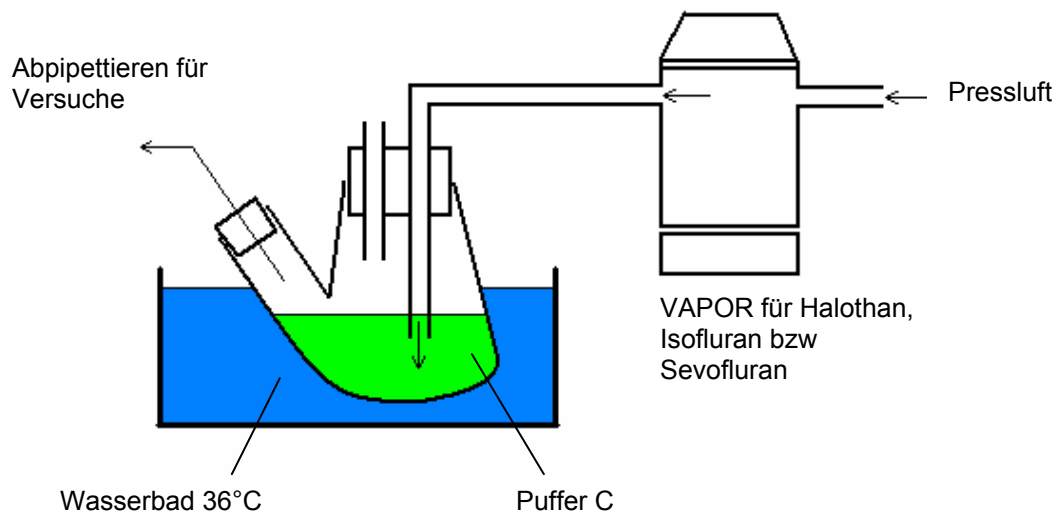


Abbildung 9 **Bereitung eines Anästhetikum-äquilibrierten Puffers**

Volatile Anästhetika werden in einen Glaskolben mit Puffer C geleitet. Durch begasen des Puffer C mit den volatilen Anästhetika entsteht eine äquilibrierte Lösung, die für Versuche abpipettiert werden kann.

2.3 Prostacyclin-Versuche

Die Durchführung der Prostacyclin-Versuche wurde bei allen Experimenten grundsätzlich nach dem gleichen Schema abgewickelt. Unterschiede waren nur in der Zugabe verschiedener Substanzen – abhängig von der jeweiligen Zielsetzung – zu finden.

2.3.1 Versuchsprotokoll

Die Inkubation der Zellen erfolgte nach einem einheitlichen Protokoll. Dies gestaltete sich wie folgt:

- Zweimaliges Waschen der Platten mit den Zellen mit je 2 ml Puffer C .
- Prä-Inkubation bei 36°C für je 30 Minuten
- Absaugen des Puffer C und Zugabe der jeweiligen Substanzen bzw. Anästhetika je nach Versuch (siehe unten)
- 5 Minuten Inkubation bei 36°C
- Abpipettieren des Flüssigkeitsüberstandes auf den Platten in Eppendorf-Caps
- Auf Eis stellen der Proben und Zugabe von 10 µl Indomethacin (1mg/ml)
- Zentrifugieren der Proben für 5 Minuten bei 5000 U/min
- Abpipettieren des Flüssigkeitsüberstandes jeder Probe in Eppendorf-Caps
- Lagerung der Proben bis zur *Prostacyclinbestimmung* (siehe 3.2) bei -85°C
- Zugabe von jeweils 1 ml 0,1 M NaOH auf die Platten, um eine Ablösung der Zellen zu erreichen
- Abreiben der Zellen von den Platten mit Schabern
- Abpipettieren der Flüssigkeit in Eppendorf-Caps und Lagerung bei 4°C bis zur *Proteinbestimmung* (siehe 3.3)

2.3.2 Prostacyclinbestimmung

Die Bestimmung des Prostacyclingehalts der Proben wurde mittels eines *enzyme-linked immunoassay* (ELISA) durchgeführt.

Der Immunoassay misst die Konzentration von PGI_2 , indem die Konzentration von 6-keto-PGF_{1 α} und 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1 α} bestimmt wird. 6-keto-PGF_{1 α} entsteht bei der nicht-enzymatischen Hydratation von PGI_2 . 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1 α} ist die nächste Abbaustufe, die in Urin vorkommt und deshalb bei den hier durchgeführten Versuchen nicht relevant ist.

Der hier verwendete Prostacyclin Immunoassay basiert auf dem Prinzip der kompetitiven Bindung, indem 6-keto-PGF_{1 α} mit einer bestimmten Menge von mit alkalischer Phosphatase markiertem 6-keto-PGF_{1 α} um Bindungsstellen auf einem polyklonalen Schafs-Antikörper konkurriert. Während der Inkubation bindet der polyklonale Antikörper an Esels-anti-Schafs-Antikörper, die auf den Microplates des Assays aufgebracht sind. Nach dem Waschen, um überschüssiges Konjugat und ungebundene Probe zu entfernen, wird eine Substratlösung hinzugefügt, um die Aktivität an gebundenem Enzym zu bestimmen. Direkt nach Farbentwicklung wird die Absorption bei 405 nm gemessen. Die Farbintensität ist umgekehrt proportional zur Konzentration von 6-keto-PGF_{1 α} , welches repräsentativ für die Konzentration von PGI_2 in der Probe ist.

Die Absorption wurde mittels eines ELISA-Readers bei 405 nm gemessen. Die Ermittlung der jeweiligen PGI_2 Konzentration entsprechend der Eichkurve erfolgte durch das zugehörige Programm (Magellan). Die Werte wurden in eine Microsoft Excel[®]-Tabelle übertragen.

2.3.3 Proteinbestimmung

Der verwendete Proteinbestimmungs-Assay basiert auf der Kombination der Biuret Reaktion mit der kolorimetrischen Bestimmung des Kupfer-Kations mit

Hilfe von bicinchonischer Säure (BCA). Die lilafarbene Farbreaktion wird durch die Chelatbildung von zwei BCA Molekülen mit einem Kupferion erzeugt. Dieser wasserlösliche Komplex erzeugt eine starke Extinktion bei 562 nm, die beinahe linear mit der Proteinkonzentration korreliert.

Die Proteinbestimmung der einzelnen Proben wurde gemäß Anleitung durchgeführt. Die Extinktion wurde in einem Photometer bei einer Wellenlänge von 562 nm bestimmt.

Die Bestimmung des Proteingehalts konnte im Verlauf der Versuche fallengelassen werden, da keine relevanten Unterschiede im Proteingehalt der Zellen auftraten, wodurch eine Korrektur nicht notwendig war.

2.4 Bestimmung des zytoplasmatischen Ca^{2+}

Das konfokale *laser scanning* Mikroskop (CLSM) bietet die Möglichkeit, die zytoplasmatische Ca^{2+} -Konzentration mit Hilfe des Ca^{2+} -Indikators Fluo-3 in Echtzeit zu beobachten. Die HUVECs wurden hierfür in einer speziellen Versuchsanordnung unter anderem mit den Anästhetika Halothan und Isofluran umspült.

2.4.1 Versuchsanordnung

Für die Messung der zytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration wurden die HUVECs auf mit Gelatine bedeckte Glasplättchen aufgebracht und für die Experimente verwendet, wenn die Zellen konfluent waren (siehe 1. Zellkulturen). Die Zellen wurden mit dem Ca^{2+} -Indikator fluo-3-AM (5 μM Endkonzentration) für 20 min bei 37°C im Dunkeln in Puffer C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Glasplättchen in eine gasdichte, temperaturkontrollierte Perfusionskammer eingelegt und mit Puffer C bei einem Fluss von 1 ml/min perfundiert. Versuchsanordnung und Zugabe von Agonisten oder Anästhetika siehe unten. Änderungen in der Fluoreszenz wurden mittels eines konfokalen Mikroskops (CLSM, MRC 1024) untersucht.

Zur Anregung des Indikators diente die 488 Laser Linie eines Krypton/Argon Lasers (15mW). Die Ca^{2+} Signale wurden mit der *lasersharp acquisition software* aufgezeichnet.

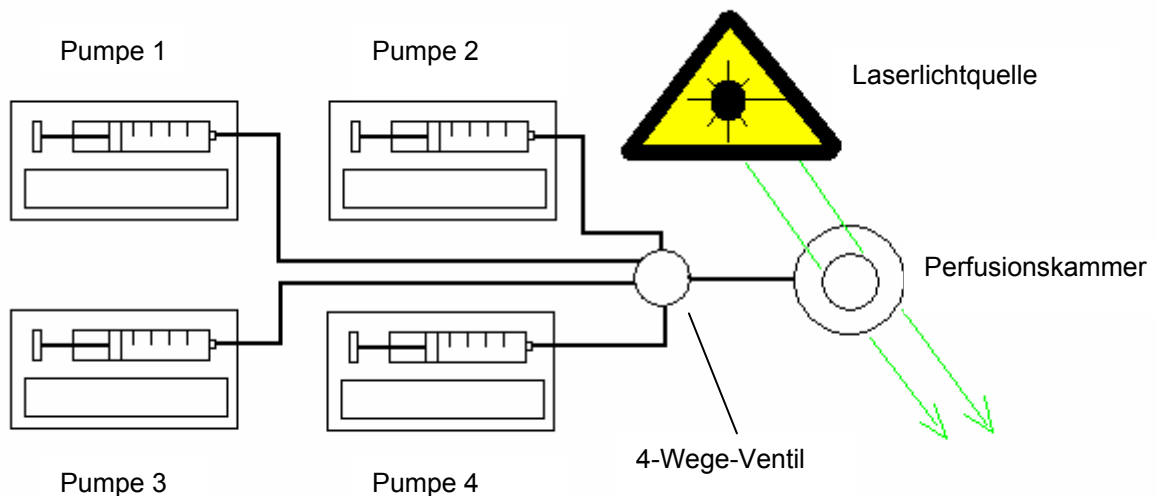


Abbildung 10 Versuchsanordnung mit Spritzenpumpen und 4-Wege-Ventil

Die Spritzenpumpen können mit verschiedenen Substanzen beladen werden. Durch Umschalten des 4-Wege-Ventils lässt sich die Quelle für die Perfusionskammer auswählen. Die HUVEC Zellen in der Perfusionskammer wurden zur Bestimmung des intrazellulären Ca^{2+} unter dem konfokalen Mikroskop überwacht.

2.4.2 Versuchsdurchführung

Für die Durchführung der Versuche bestand die Möglichkeit, bis zu vier Spritzenpumpen unterschiedlichen Inhalts zu verwenden.

Während der Perfusion wurde die FCS2-Kammer mittels des Bioptechs Heizsystems bei 30°C gehalten und bei allen Experimenten mit einer Flussrate von 1ml/min durchspült. Ein schneller Wechsel zwischen den verschiedenen Lösungen konnte mit einem umschaltbaren 4-Wege-Ventil erreicht werden.

2.5. Statistik

Die Messergebnisse wurden als arithmetische Mittelwerte der Einzelmessungen \pm SE (Standardabweichung) ermittelt.

Zur Überprüfung auf statistische Signifikanz diente der t-Test nach Student. Als signifikant galten Werte mit $p < 0,05$.

III. Ergebnisse

1. Charakterisierung der Histamin-induzierten Prostacyclinbildung

In mehreren Vorversuchen sollten die HUVECs bezüglich ihres Verhaltens unter Histamingabe charakterisiert werden. Da Histamin bei den meisten späteren Versuchen zum Einsatz kommen sollte, war die Kenntnis über die Prostacyclinproduktion unter Histamingabe essentiell. Hierbei wurden Dosis- und Zeitabhängigkeit der PGI₂-Produktion sowie die Abhängigkeit der PGI₂-Produktion vom extrazellulären Ca²⁺-Einstrom geprüft. Außerdem sollte die Abhängigkeit der Prostacyclinproduktion von der Proteinkinase C untersucht werden, da über deren Funktion noch Unklarheit herrscht.

1.1 Dosisabhängigkeit der Prostacyclinbildung

Zu Beginn sollte getestet werden, ob die Prostacyclinbildung dosisabhängig von der Histamingabe erfolgt. Hierzu wurden die Proben mit 0,1µM, 1 µM, 10µM und 100µM Histamin inkubiert.

Wie aus Abbildung 11 deutlich ersichtlich, steigt die Prostacyclinbildung mit zunehmender Histaminzufuhr. Für spätere Versuche war für die Kontrolle ein deutliches Prostacyclinsignal notwendig. Deshalb wurde hierfür weiterhin eine Histaminkonzentration von 100µM gewählt.

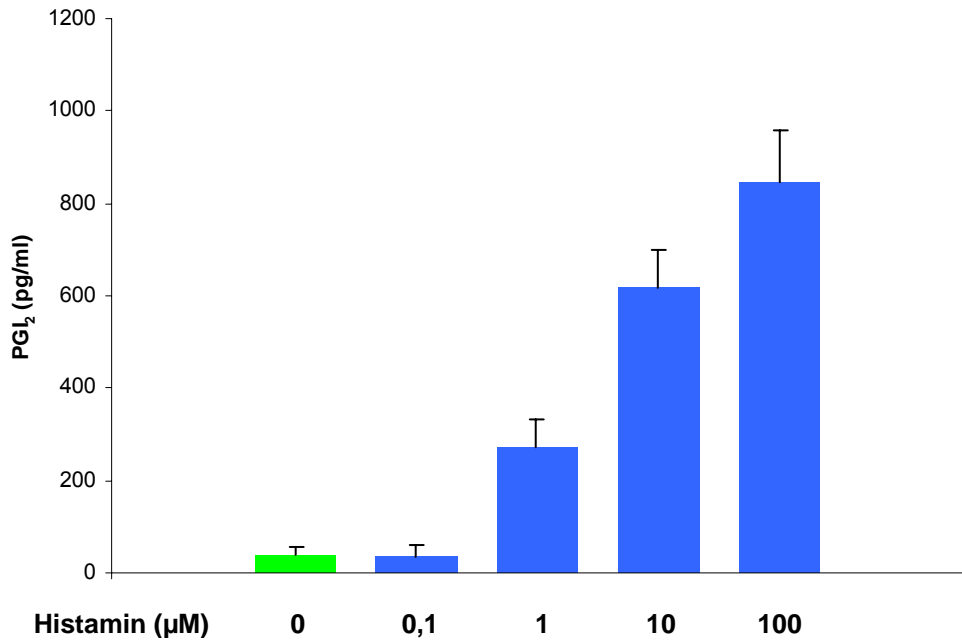


Abbildung 11 Dosisabhängigkeit der Prostacyclinbildung

HUVEC Zellen auf Petrischalen (3 cm) wurden für 5 min bei 36°C mit den angegebenen Histaminkonzentrationen inkubiert und anschließend wurde Prostacyclin im Überstand bestimmt. Die Daten sind Mittelwerte ±SE (n=3)

1.2 Zeitabhängigkeit der Prostacyclinbildung

Ein weiterer Versuch sollte die Abhängigkeit der Prostacyclinbildung von der Inkubationsdauer mit jeweils 100µM Histamin überprüfen. Neben einer Kontrolle ohne Histaminzugabe erfolgte eine Inkubation der HUVECs für jeweils 30 Sekunden, 60 Sekunden, 2 Minuten und 5 Minuten.

Wie in Abbildung 12 deutlich zu sehen ist, zeigt sich bei längeren Inkubationszeiten ein entsprechend erhöhter Anstieg der Prostacyclinbildung.

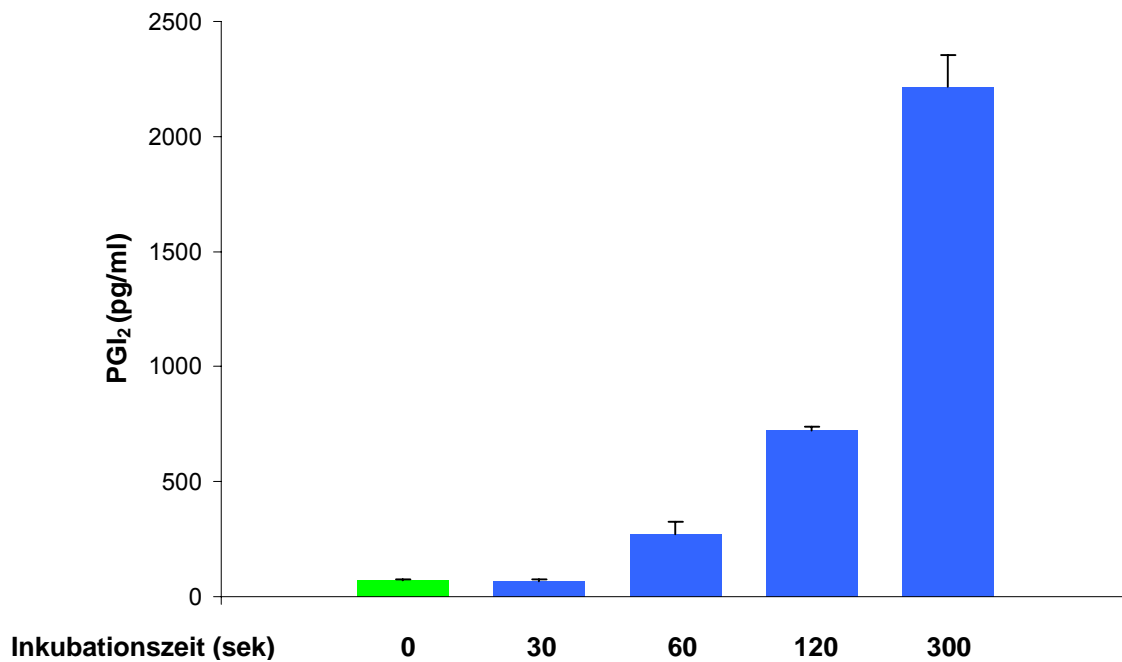


Abbildung 12 Zeitabhängigkeit der Prostacyclinbildung

HUVEC Zellen auf 3 cm Petrischalen wurden mit Histamin für resp. 0, 30, 60, 120 und 300 Sekunden inkubiert und anschließend wurde Prostacyclin im Überstand bestimmt. Die Daten sind Mittelwerte \pm SE (n=3)

1.3 Kalziumabhängigkeit der Prostacyclinbildung

Histamin verursacht ein biphasisches Ca^{2+} -Signal in HUVEC-Zellen (Abbildung 13). Der initiale Anstieg beruht hauptsächlich auf Ca^{2+} -Freisetzung aus internen Speichern und der Plateauphase aus einem Ca^{2+} -Einstrom aus dem Extrazellulärmedium.

Es ist möglich, beide Ca^{2+} -Signale voneinander zu trennen, indem man Histamin in Ca^{2+} -freiem Medium zugibt. Dann beobachtet man nur die Ca^{2+} -Freisetzung aus internen Speichern. Wenn anschließend Ca^{2+} dem extrazellulären Medium zugegeben wird, beobachtet man den Ca^{2+} -Einstrom aus dem extrazellulären Raum (Abbildung 14).

Dabei war es interessant zu untersuchen, ob die Ca^{2+} Freisetzung aus internen Speichern oder der Ca^{2+} -Einstrom für die Prostacyclinsynthese wichtig ist. Wir untersuchten daher die Prostacyclinbildung in An- und Abwesenheit von extrazellulärem Kalzium. Die Ergebnisse in Abbildung 13 zeigen, dass die Ca^{2+} -Freisetzung aus internen Speichern entscheidend ist für die Prostacyclinbildung. Ähnliche Ergebnisse wurden erzielt, wenn zusätzlich noch EGTA dem extrazellulären Medium zugegeben wurde (Abbildung 16).

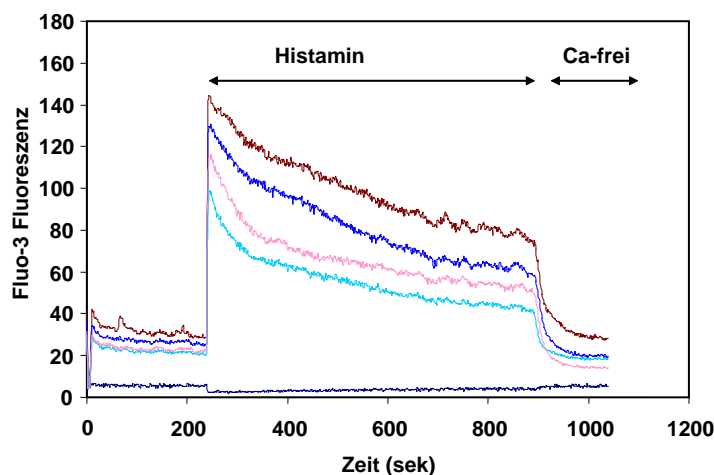


Abbildung 13 Biphasisches Ca^{2+} -Signal im HUVEC System

HUVEC Zellen unter dem CLSM unter Zugabe von Histamin. Zu erkennen ist das typische biphasische Fluoreszenzsignal unter Histamineinwirkung mit einem „Peak“ und anschließendem „Plateau“ bei 4 HUVEC-Zellen

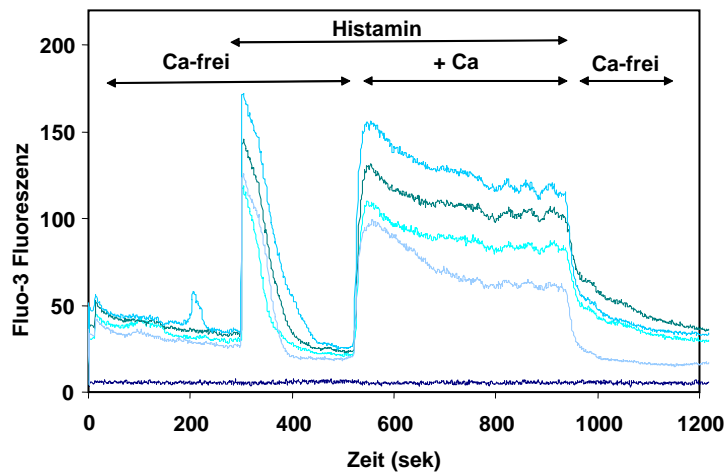


Abbildung 14 Ca^{2+} -Signal im HUVEC System in An- und Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+}
 HUVEC Zellen unter dem CLSM. Im Ca^{2+} -freien Medium ist bei Histaminzugabe nur der „Peak“ zu sehen, was auf Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern schließen lässt. Bei Zugabe von Ca^{2+} sieht man ein „Plateau“ (Einstrom von Ca^{2+} aus dem Extrazellulärraum)

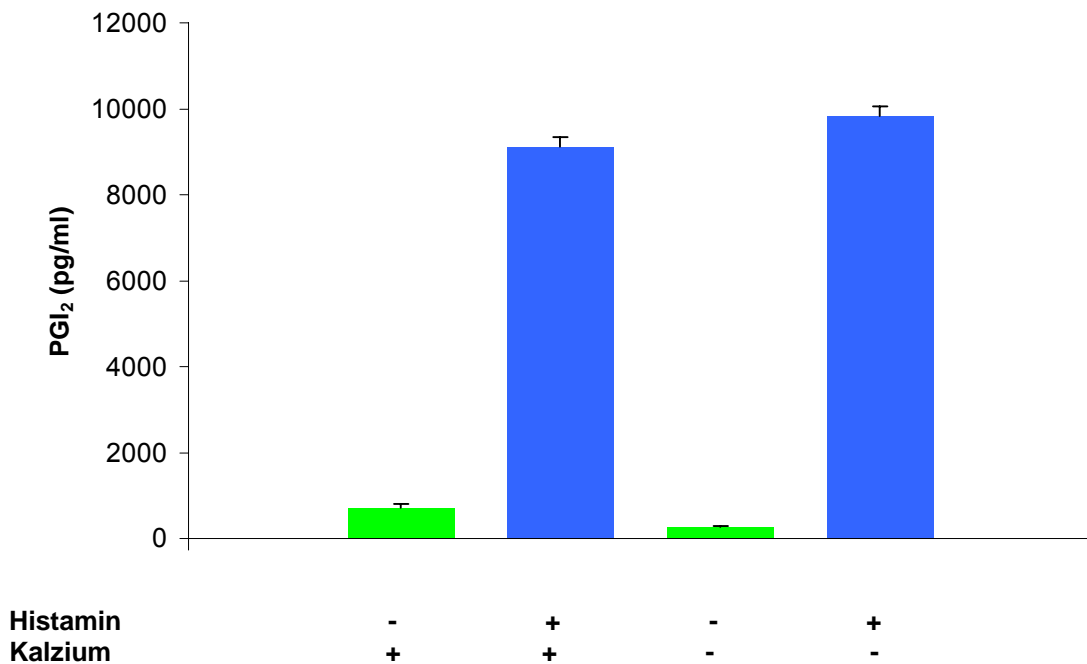


Abbildung 15 Kalziumabhängigkeit der Prostacyclinbildung

HUVEC Zellen auf 3 cm Petrischalen wurden mit oder ohne 100 μM Histamin in resp. Puffer C oder Puffer C ohne Ca^{2+} inkubiert. Die Daten sind Mittelwerte $\pm\text{SE}$ (n=3). Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment.

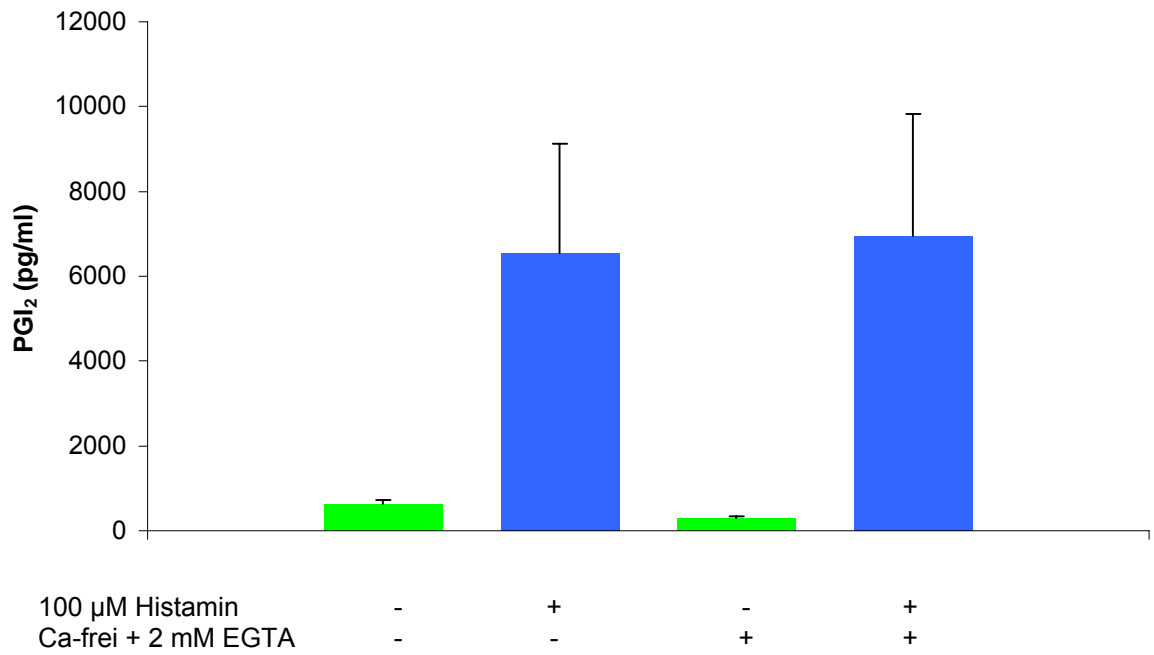


Abbildung 16 Prostacyclinbildung in An- und Abwesenheit von EGTA

HUVEC Zellen auf 3 cm Petrischalen wurden mit oder ohne Histamin in resp. Puffer C oder Ca²⁺-freiem Puffer C + 2 mM EGTA inkubiert. Die Daten sind Mittelwerte \pm SE (n=3). Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment

1.4 Einfluss von PMA auf die Prostacyclinbildung

Volatile Anästhetika können die Aktivität der Proteinkinase C stimulieren [99,100]. Daher war es interessant zu untersuchen, ob eine Aktivierung der Proteinkinase C mittels des Aktivators PMA (4 α Phorbol 12-Myristat 13-Acetat) die Prostacyclinbildung in HUVEC Zellen beeinflusst. Als Kontrolle wurden Zellen mit 4 α PD (4 α -Phorbol-12,13-Didecanoat) stimuliert. Diese Substanz ähnelt PMA, aktiviert jedoch nicht die Proteinkinase C. Abbildung 17 zeigt, dass eine Aktivierung der PKC keinen signifikanten Einfluss auf die Histamin-induzierte Prostacyclinbildung hat ($p > 0,05$). Eine stimulierende Wirkung der Anästhetika auf die Prostacyclinbildung via PKC-Aktivierung ist daher unwahrscheinlich.

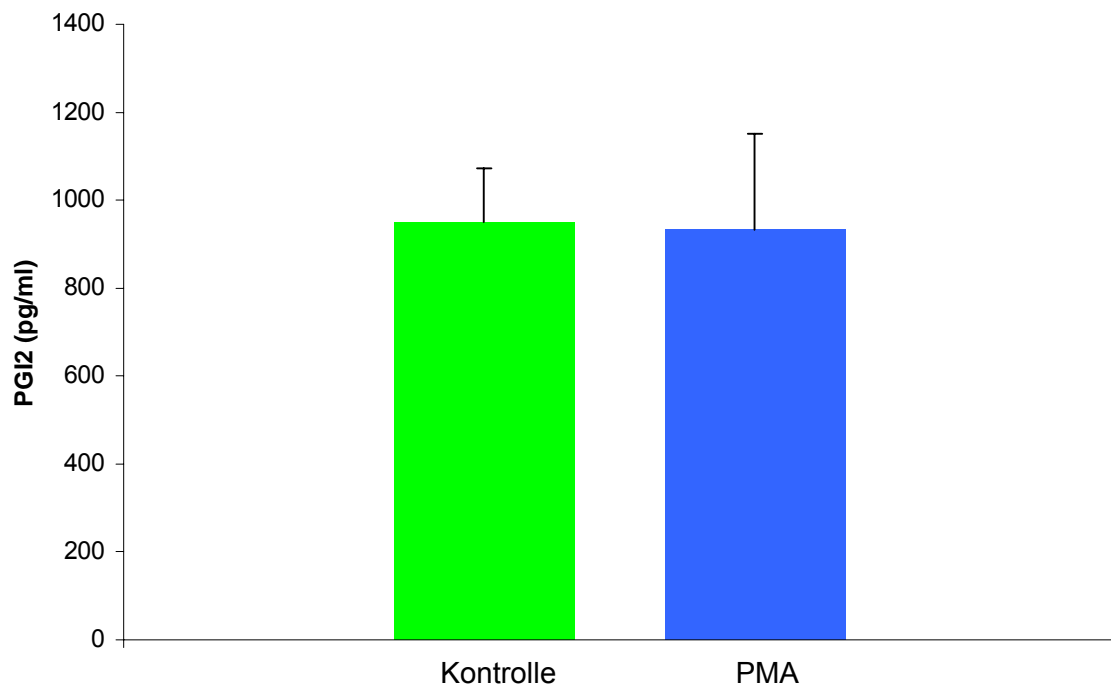


Abbildung 17 Einfluss von PMA auf die Prostacyclinbildung

Histamin-induzierte PGI₂-Bildung nach 30 min Vorbehandlung der HUVEC-Zellen mit 4 α PD (Kontrolle) oder PMA. Nach der Vorbehandlung wurden die Zellen 5 min bei 36°C mit und ohne 100 μ M Histamin inkubiert und nachfolgend die Prostacyclinkonzentration im Überstand bestimmt. Die Daten sind Mittelwerte \pm SE (n=3).

2. Der Einfluss von Allgemeinanästhetika auf die Prostacyclinbildung

2.1 Einfluss von Halothan auf die Prostacyclinbildung

Um den Einfluss des volatilen Anästhetikums Halothan auf die Prostacyclinbildung zu untersuchen, wurden die Zellen mit 100 μM Histamin in Abwesenheit (Kontrolle) und Anwesenheit von resp. 1, 2 und 4 Vol.% Halothan stimuliert. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abbildung 18 dargestellt.

Die Konzentration von 1 Vol.% Halothan ergab eine signifikante Stimulation ($p < 0,01$) der Prostacyclinbildung mit 33,8 % gegenüber der Kontrolle. Die Experimente mit 2 Vol.% Halothan ergaben 1,7 % Hemmung, die sich aber nicht signifikant von der Kontrolle unterschied. Eine supraklinische Konzentration von 4 Vol.% Halothan verursachte eine signifikante Hemmung der Prostacyclinbildung von 45,1 % ($p < 0,05$).

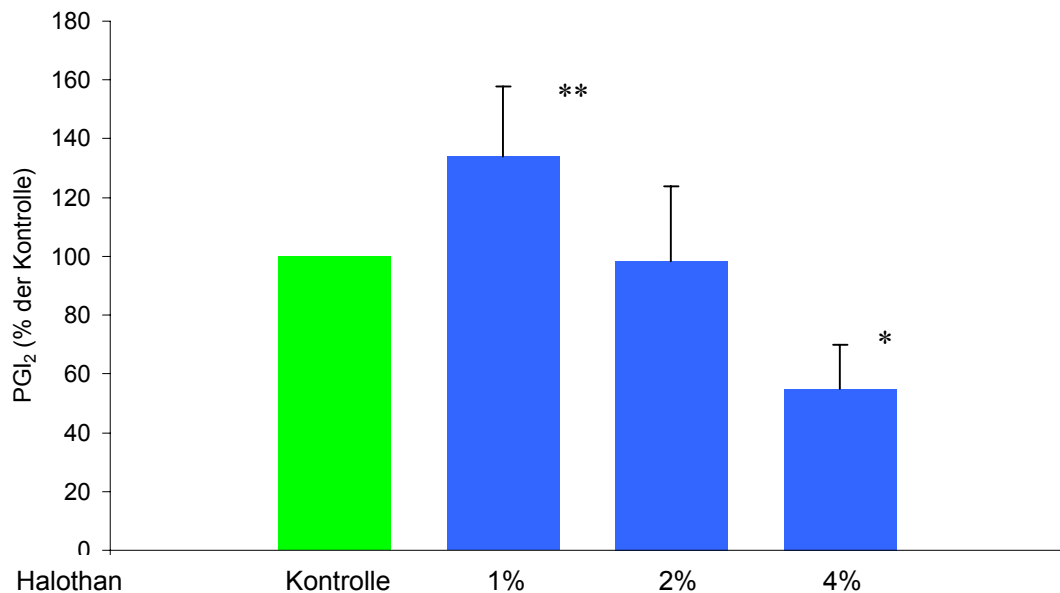


Abbildung 18 Einfluss von Halothan auf die Histamin-induzierte PGI₂-Bildung.

HUVEC Zellen auf 3cm Petrischalen wurden für 5 min bei 36°C stimuliert mit 100 μM Histamin in Abwesenheit resp. Anwesenheit von 1, 2 und 4 Vol% Halothan. Die PGI₂-Konzentration im Überstand wurde bestimmt. Die PGI₂-Bildung der Kontrolle wurde auf 100% gesetzt und die PGI₂-Bildung in Anwesenheit von Halothan berechnet als % der Kontrolle. Die Daten sind Mittelwerte \pm SE (n=9). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

2.2 Einfluss von Isofluran auf die Prostacyclinbildung

Als weiteres volatiles Anästhetikum wurde Isofluran und dessen Einfluss auf die Prostacyclinbildung untersucht. Dies geschah in den Konzentrationen von jeweils 1, 2,5 und 5 vol. %.

Es zeigte sich bei 1 Vol.% Isofluran eine nicht-signifikante Stimulation um 18% und bei 2,5% Isofluran eine nicht-signifikante Stimulation um 10% gegenüber der Kontrolle. Bei Inkubation der Zellen mit 5 Vol.% Isofluran ergab sich eine signifikante Hemmung von 38,2 % gegenüber der Kontrolle ($p < 0,05$).

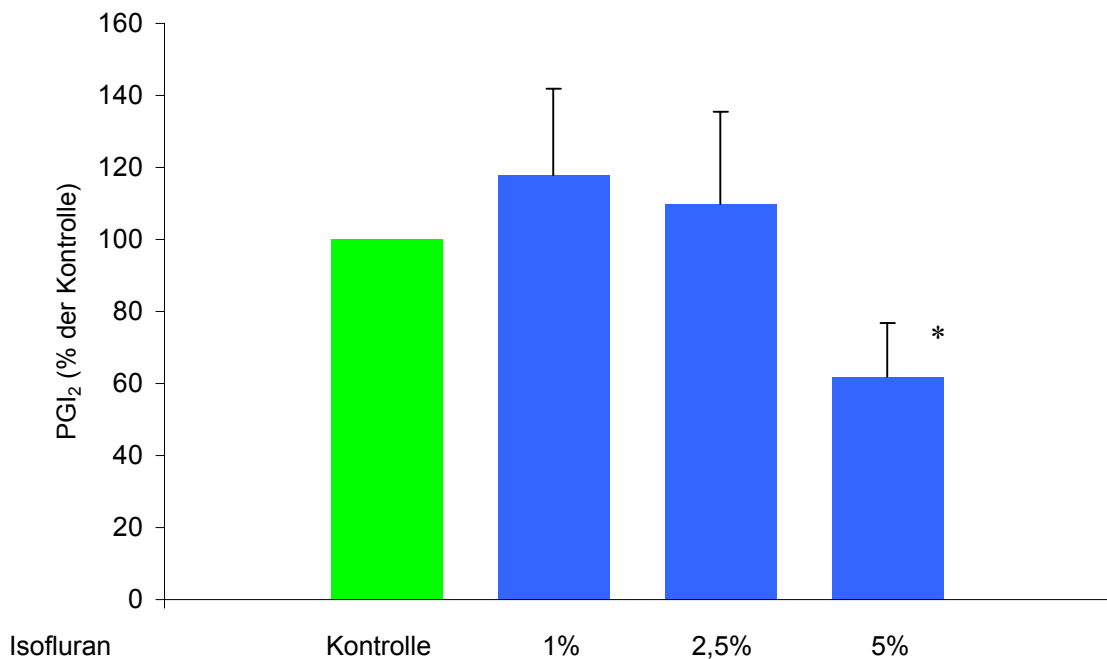


Abbildung 19 Einfluss von Isofluran auf die Histamin-induzierte PGI₂-Bildung

HUVEC Zellen auf 3cm Petrischalen wurden für 5 min bei 36°C mit 100µM Histamin in Abwesenheit resp. Anwesenheit von 1, 2,5 und 5% Isofluran stimuliert. Die PGI₂-Konzentration im Überstand wurde bestimmt. Die PGI₂-Bildung der Kontrolle wurde auf 100% gesetzt und die PGI₂-Bildung in Anwesenheit von Isofluran berechnet als % der Kontrolle. Die Daten sind Mittelwerte ±SE (n=9). * $p < 0,05$ (Student's t-Test)

2.3 Einfluss von Propofol auf die Prostacyclinbildung

Das einzige in dieser Arbeit untersuchte Anästhetikum, das nicht zur Gruppe der volatilen Anästhetika gehört, ist das intravenöse Anästhetikum Propofol. Propofol wurde in Konzentrationen zu 50, 100, 200 und 400 μM ohne Zugabe von Histamin getestet.

Jedoch zeigten die Ergebnisse, dass sämtliche PGI_2 -Werte der Proben, die Propofol enthielten, stark erniedrigt waren. Dies ließ die Vermutung zu, dass Propofol mit den Bestandteilen des ELISA reagiert. Dies ließ sich bestätigen, indem Propofol den Standards mit bekannten PGI_2 -Werten hinzugefügt wurde. Die Ergebnisse waren dieselben erniedrigten Werte, wie bei den Versuchen zuvor. Der Träger DMSO scheidet hierbei als Verursacher aus, da bei einer Kontrolle ohne Zugabe von Propofol mit DMSO + PGI_2 -Standard keine derart niedrigen Werte zustande kamen.

Die vorliegenden Ergebnisse konnten somit nicht verwendet werden.

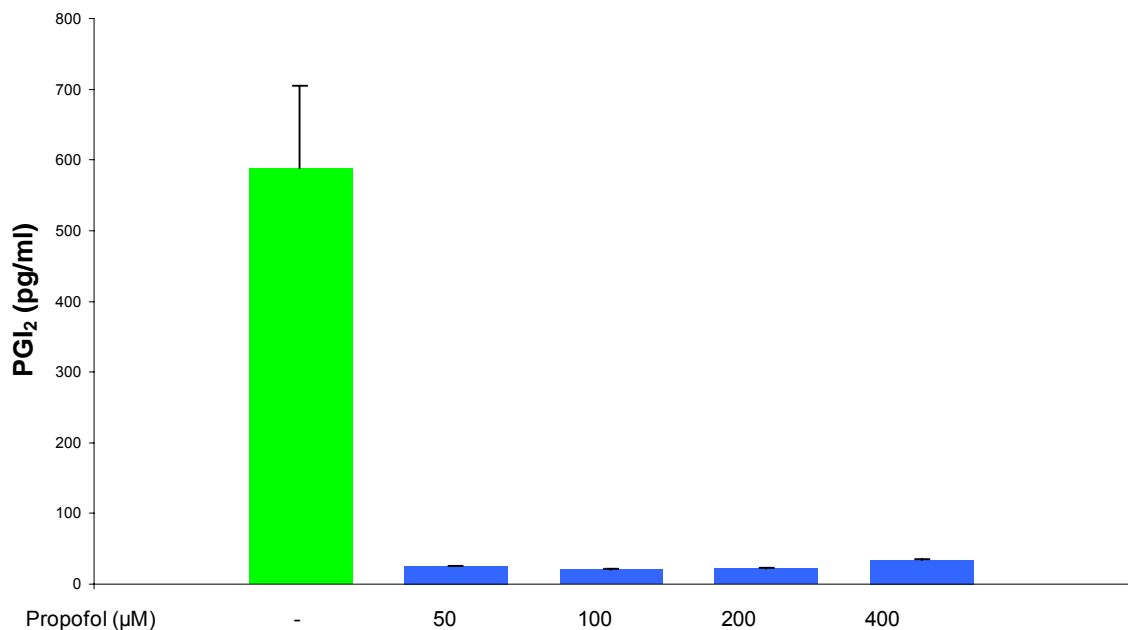


Abbildung 20 Einfluss von Propofol auf die Prostacyclinbildung

HUVEC Zellen auf 3cm Petrischalen wurden bei 36°C ohne oder mit Zugabe von 50, 100, 200 oder 400 μM Propofol inkubiert. Die PGI_2 -Bildung unter Propofoleinwirkung liegt unter der basalen PGI_2 -Bildung. Dies lässt auf eine Interaktion von Propofol mit Bestandteilen des ELISA-Tests schließen.

3. „Cross-talk“ zwischen Prostacyclin und NO-Signalwegen

3.1 Einfluss von L-NAME und SNP auf die Prostacyclinbildung

Mehrere Arbeiten, unter anderem von Bolz und Pohl [82] sowie von Osanai *et al.* [83] weisen auf eine Beeinflussung zwischen NO und Prostacyclin-Signalwegen hin. Daher war es von großem Interesse, diese Zusammenhänge zu untersuchen. Es sollte die Frage beantwortet werden, ob eine Hemmung des NO-Signalweges mit L-NAME oder dessen Stimulierung mit Natrium-Nitroprussid die Prostacyclinbildung beeinflusst.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 21 dargestellt. Vorinkubation mit 100 μM Natrium-Nitroprussid führte zu 41,1% Hemmung der Prostacyclinbildung. Eine starke Stimulation des NO-Signalwegs führt in diesen Versuchen zu einer verminderten Prostacyclinbildung. Andererseits hat eine starke Hemmung dieses Signalweges mit 1 mM L-NAME keinen signifikanten Einfluss auf die PGI_2 -Bildung. Dieses Ergebnis würde bedeuten, dass eine eventuelle Hemmung des NO-Signalwegs durch volatile Anästhetika in unserem HUVEC Zellsystem nicht durch vermehrte PGI_2 -Bildung kompensiert werden kann.

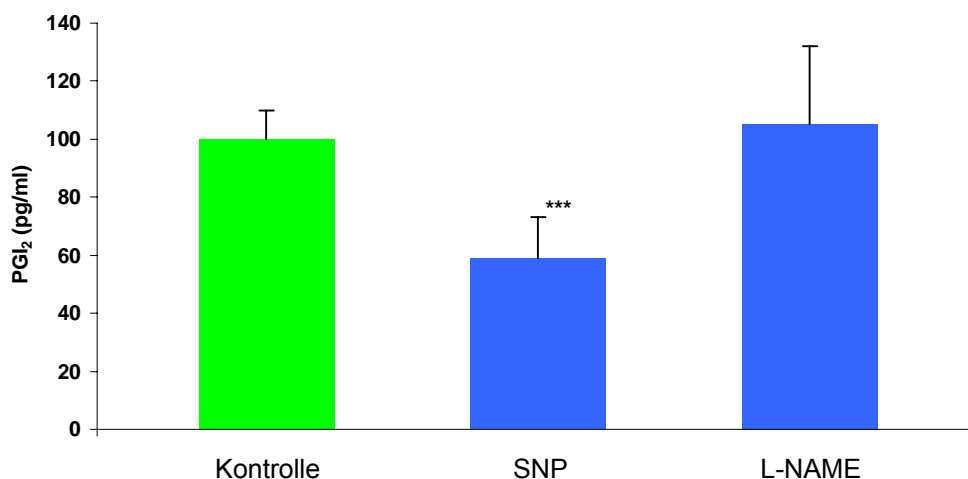


Abbildung 21 Einfluss von Natrium-Nitroprussid (SNP) und L-NAME auf die Histamin-induzierte Prostacyclinbildung

HUVEC Zellen auf 3cm Petrischalen wurden 15 min mit Natrium-Nitroprussid (100 μM) oder L-NAME (1mM) präinkubiert. Anschließend wurde die Prostacyclinbildung in An- oder Abwesenheit von 100 μM Histamin bestimmt. Die Daten sind Mittelwerte $\pm\text{SE}$ (n=9). *** $p < 0,001$ (Student's t-Test).

IV. Diskussion

1. Charakterisierung der Histamin-induzierten Prostacyclin-Bildung

1.1 Warum HUVECs?

Bei dieser Arbeit fiel die Entscheidung für die Verwendung von HUVEC Zellen. Es gibt mehrere Arten von Zellen, die in Frage kommen, auch von anderen Spezies, so zum Beispiel von Ratten oder Rindern. Mehrere Kriterien machen HUVECs als Modellsystem besonders attraktiv. So finden sie breite Anwendung und sind dabei gut erforscht. Die Tatsache, dass diese Zellen vom Menschen stammen, macht die Ergebnisse besser übertragbar als bei Zellkulturen anderer Organismen. Des Weiteren sind die Zellen leicht erhältlich.

Trotz der genannten Vorteile gibt es dennoch einige Aspekte bei der Interpretation, die man bedenken sollte. So sind die Nabelschnüre während und nach dem Geburtsvorgang variierenden Belastungen ausgesetzt. Außerdem ist unbekannt, in welchem Ausmaß Medikamente eingesetzt wurden, die unter Umständen die Ergebnisse beeinträchtigen könnten. Es wäre deshalb denkbar, dass Zellen aus Nabelschnüren verschiedener Individuen in Versuchen unterschiedlich reagieren. Des Weiteren sollte man berücksichtigen, dass mit HUVECs erzielte Ergebnisse nicht zwangsweise auf andere Zellsysteme übertragbar sind.

1.2 Dosis- und Zeitabhängigkeit der Prostacyclinbildung

In der Literatur ist beschrieben, dass die Prostacyclinbildung abhängig von der Dosis des eingesetzten Agonisten ist. So beschrieben Jaffe *et al.* einen dosisabhängigen Anstieg der Prostacyclin-Konzentration nach der Stimulation mit Thrombin [26].

Dies konnte in Versuchen mit Histamin bestätigt werden. Bei Dosen von 0,1, 1, 10 und 100 μM Histamin zeigte sich ein eindeutiger dosisabhängiger Anstieg der Prostacyclinproduktion.

Außerdem ergab sich eine Zeitabhängigkeit der Prostacyclinbildung bei der Stimulation mit 100 μM Histamin über 30, 60, 120 und 300 Sekunden. Damit konnten auch hier Ergebnisse aus der Literatur bestätigt werden. So beschreiben Lückhoff *et al.*, dass die Prostacyclinproduktion bei Aortenendothelzellen von Rindern nach Stimulation mit Bradykinin in den ersten Minuten zeitabhängig ansteigt [25].

1.3 Kalzium-Abhängigkeit der Prostacyclinbildung

Ein weiterer wichtiger Punkt war die Kalzium-Abhängigkeit der Prostacyclinbildung. Breite Übereinstimmung herrscht darüber, dass die Prostacyclinbildung lediglich von der Kalzium-freisetzung aus internen Speichern abhängig ist und unabhängig vom Kalzium-Einstrom aus dem Extrazellulärraum [25,26].

Auch bei uns zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der PGI_2 -Produktion in Ca^{2+} -haltigem und Ca^{2+} -freiem Medium. Auch bei der Verwendung von EGTA war kein signifikanter Unterschied zu sehen. Dies weist darauf hin, dass der Kalzium-Einstrom aus dem Extrazellulärraum für die PGI_2 Produktion nicht relevant ist.

Diese Ergebnisse widersprechen denen von Bhagyalakshmi *et al.*, die einen Einfluss sowohl des Kalziums aus dem Extrazellulärraum als auch aus intrazellulären Speichern auf die PGI_2 -Synthese feststellten [27]. Die Arbeiten von Jaffe *et al.* und Lückhoff *et al.* wurden bestätigt, die besagen, dass die Prostacyclinproduktion ihrer Zellen auch bei Einsatz von EGTA oder Kalzium-freiem Medium im Wesentlichen unverändert bleibt [25,26].

Die hier vorliegenden Ergebnisse bestätigen somit, dass einzig die Ca^{2+} -Freisetzung aus internen Speichern für die Prostacyclinbildung verantwortlich ist. Es wäre durchaus möglich, dieses Kalzium-Signal genauer zu untersuchen. Jedoch ist hierfür das CLSM-System nicht besonders geeignet.

1.4 Einfluss von PMA auf die Prostacyclinbildung

Bei den vorliegenden Versuchen hat eine starke Stimulation der PKC mit PMA keinen signifikanten Einfluss auf die Prostacyclinbildung (Abbildung 17). Dieses Ergebnis schließt eine stimulierende Wirkung der volatilen Anästhetika mittels PKC-Aktivierung auf die Histamin-induzierte Prostacyclinbildung aus.

Ebenfalls keinen signifikanten Effekt von PMA auf die Bradykinin-induzierte Prostacyclinbildung fanden Loeb *et al.* in Endothelzellen aus Rinderaugen [31]. Andererseits berichten Higaki *et al.* von einer stimulierenden Wirkung der PKC auf die Bradykinin-stimulierte PGI₂-Bildung in menschlichen Gefäßendothelzellen [101]. Möglich ist, dass der PKC-Effekt sowohl von Agonist und Endothelzelltyp abhängig ist.

2. Der Einfluss von Allgemeinanästhetika auf die Histamin-induzierte Prostacyclinbildung

2.1 Einfluss von Halothan auf die Prostacyclinbildung

Aus klinischer Erfahrung ist bekannt, dass Anästhetika eine starke vasodilatatorische Wirkung besitzen. Gerade auf dem Gebiet des Prostacyclin-Signalwegs ist noch wenig über diese Wirkung bekannt. Es war deshalb von Interesse, diese Mechanismen genauer zu untersuchen.

Die Inkubation der Zellen mit 1 Vol.% Halothan ergab eine signifikante Stimulation der Prostacyclinbildung von 33,8 % gegenüber der Kontrolle. 2 Vol.% Halothan ergaben 1,7 % Hemmung, die sich nicht signifikant von der Kontrolle unterschied. Eine Konzentration von 4 Vol.% Halothan ergab eine signifikante Hemmung der Prostacyclinbildung von 45,1 %.

Auch Loeb *et al.* beschreiben bereits eine Hemmung der durch Bradykinin, ATP und Mellitin induzierten Prostacyclinproduktion durch Halothan [31]. Die bei den

vorliegenden Experimenten beobachtete Stimulation der Prostacyclinbildung bei niedrigen Konzentrationen von 1 Vol% ist jedoch neu und wurde bis jetzt noch nicht beschrieben. Eine mögliche Erklärung für diese Ergebnisse siehe 3.2.

2.2 Einfluss von Isofluran auf die Prostacyclinbildung

Als weiteres Anästhetikum wurde Isofluran untersucht. In der Literatur zeichnet sich ab, dass der Einfluss von Isofluran auf die Prostacyclinproduktion eher gering ist. Heindl *et al.* fanden keinen Effekt von 1 und 2 MAC Isofluran auf die durch Histamin oder A 23187 stimulierte Prostacyclin-Produktion in HUVEC Zellen [92]. Ähnliche Ergebnisse zeigen Loeb *et al.*, die keinen Effekt von Isofluran auf die durch Bradykinin, ATP und Mellitin induzierte Prostacyclinproduktion in Endothelzellen aus Rinderaorten fanden [25]. Lediglich eine Hemmung des NO-PGI₂ Synergismus unter Isofluran in Pulmonalarterien des Hundes ist beschrieben [93].

In unseren Untersuchungen zeigten 1 und 2,5 Vol.% Isofluran eine leichte Stimulation gegenüber der Kontrolle, welche nicht signifikant war. Inkubation der Zellen mit 5 Vol.% Isofluran ergab eine signifikante Hemmung von 38,2 % gegenüber der Kontrolle ($p < 0,05$).

Unsere Ergebnisse mit klinisch relevanten Konzentrationen von Isofluran (1 und 2,5 Vol.%) bestätigen die Untersuchungen von Heindl *et al.* [92] und Loeb *et al.* [31]. Höhere Konzentrationen wurden von diesen Autoren nicht untersucht. Interessant ist die relative Übereinstimmung der Ergebnisse mit denen unter der Wirkung von Halothan: Stimulation bei niedrigen Konzentrationen und Hemmung bei hohen Konzentrationen, obwohl die stimulierende Wirkung bei Isofluran keine Signifikanz erreichte.

2.3 Einfluss von Propofol auf die Prostacyclinbildung

Wie bereits in den Ergebnissen beschrieben, reagierte Propofol bei unseren Versuchen mit Ingredienzien des ELISA. Somit sind diese Ergebnisse nicht verwertbar. Es wird notwendig sein, für zukünftige Versuche mit Propofol

andere Versuchsmethoden zu finden. Eine Möglichkeit wäre, Propofol vor der Anwendung des ELISA aus dem Medium zu entfernen oder einen anders gearteten Prostacyclinnachweis anzuwenden. Ob ein Radioimmunoassay bessere Ergebnisse liefert, ist hierbei skeptisch zu betrachten, da auch hier eine Reaktion mit den Substanzen des Test-Kits möglich ist.

3. „Cross-talk“ zwischen Prostacyclin und NO-Signalwegen

3.1 Einfluss von L-NAME und SNP auf die Prostacyclinbildung

Mehrere Untersuchungen mit Endothelzellen weisen auf einen möglichen *cross-talk* zwischen NO- und Prostacyclin-Signalwegen hin [82,83]. Es besteht daher die interessante Möglichkeit, dass eine Hemmung des NO-Signalweges durch Anästhetika zu einer vermehrten Prostacyclinbildung führt. Daher wurde sowohl die Hemmung des NO-Signalwegs mit L-NAME als auch die Stimulation dieses Signalwegs mittels Natrium-Nitroprussid und dessen jeweilige Wirkung auf die Prostacyclinbildung untersucht.

Eine Stimulation des NO-Signalwegs mit Natrium-Nitroprussid führte zu einer starken Hemmung der Prostacyclinbildung. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu den Ergebnissen von Vassalle *et al.* [81], die eine stimulierende Wirkung von SNP auf die Prostacyclinbildung beobachteten. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die höhere Konzentration von SNP in den hier dargestellten Experimenten sein.

Andererseits führte eine starke Hemmung des NO-Signalwegs mit L-NAME nicht zu einer signifikanten Änderung in der Prostacyclinbildung. Eine ähnliche Beobachtung wurde von Vassalle *et al.* beschrieben [81].

3.2 Mögliche Wirkungsweisen der Anästhetika

Die Ergebnisse unter Einfluss von Allgemeinanästhetika mögen rätselhaft erscheinen. Sowohl Halothan als auch Isofluran zeigen eine Stimulation der PGI₂-Produktion bei niedrigen Konzentrationen (die bei Isofluran nicht signifikant ist) und eine Hemmung bei hohen Konzentrationen. Bei mittleren Konzentrationen zeigt sich eine Hemmung oder Stimulation, die sich nicht signifikant von der Kontrolle unterscheidet. Wie lässt sich dies erklären? Hierzu lassen sich die folgenden Vorschläge machen, die spekulativ erscheinen mögen:

Es wurde bereits beschrieben, dass die PGI₂-Produktion einem Regulationsmechanismus unterliegt, der über eine negative Rückkopplung die Freisetzung von Prostacyclin hemmt. [82]. Unsere Ergebnisse könnten dadurch zustande gekommen sein, dass diese Rückkopplungsschleife durch Halothan und Isofluran gehemmt wird. Durch das Wegfallen dieser Rückkopplung, welche die Prostacyclinsynthese hemmt, würde dies in einer Stimulation der Prostacyclinsynthese resultieren. Bei weiter steigenden Konzentrationen von Anästhetika wäre es denkbar, dass zusätzlich die Gesamtproduktion von Prostacyclin unterdrückt wird. Dies würde die zunehmende Hemmung bei höheren Konzentrationen erklären. Die Ursache für diesen Mechanismus könnte man in der hemmenden Wirkung von Anästhetika auf Rezeptor- und/oder G-Protein-Ebene finden. Die Interaktion von Anästhetika mit Rezeptoren oder G-Proteinen ist noch weitgehend unklar. Es existieren aber eine Reihe von Arbeiten, die eine Wirkung auf dieser Ebene in verschiedenen Zelltypen beschreiben [86,87,88,89,90,91] Auf dem Gebiet der HUVECs ist hier noch keine Literatur vorhanden. Jedoch findet man bei Nakamura *et al.* die Vermutung über eine Wirkung auf Rezeptor/G-Protein-Ebene.

Natürlich ist es möglich, dass die Anästhetika noch an verschiedenen anderen Orten ihre Wirkung entfalten. Der Kalzium-Einstrom aus dem Extrazellulärraum hat sich zwar als nicht relevant für die Prostacyclinproduktion gezeigt, für die Freisetzung aus intrazellulären Speichern gilt dies jedoch nicht [25,26]. Hier wäre eine Wirkung möglich, wie sie auch von Nakamura *et al.* vorgeschlagen

wurde [85]. Eine dosisabhängige Hemmung der Kalzium-Freisetzung durch Halothan könnte eventuell die beobachtete Hemmung durch 4 Vol % Halothan erklären. Eine Stimulation der Kalzium-Freisetzung ist eher unwahrscheinlich, da 100 μM Histamin eine maximale Kalzium-Freisetzung bewirkt.

Auch weiter abwärts in der Signalkette könnten Wirkungen der Anästhetika stattfinden. So wäre zum Beispiel eine Wirkung auf die Proteinkinase C denkbar, wie dies bereits von Loeb *et al.* vermutet wurde [31]. Bei den hier vorliegenden Ergebnissen ist dies jedoch, zumindest im HUVEC Zellsystem, unwahrscheinlich.

Eine weitere Möglichkeit wäre auch eine Beeinflussung des Arachidonsäure-Stoffwechsels durch die Anästhetika.

Eine Zusammenfassung der möglichen Wirkorte der Anästhetika zeigt Abbildung 22.

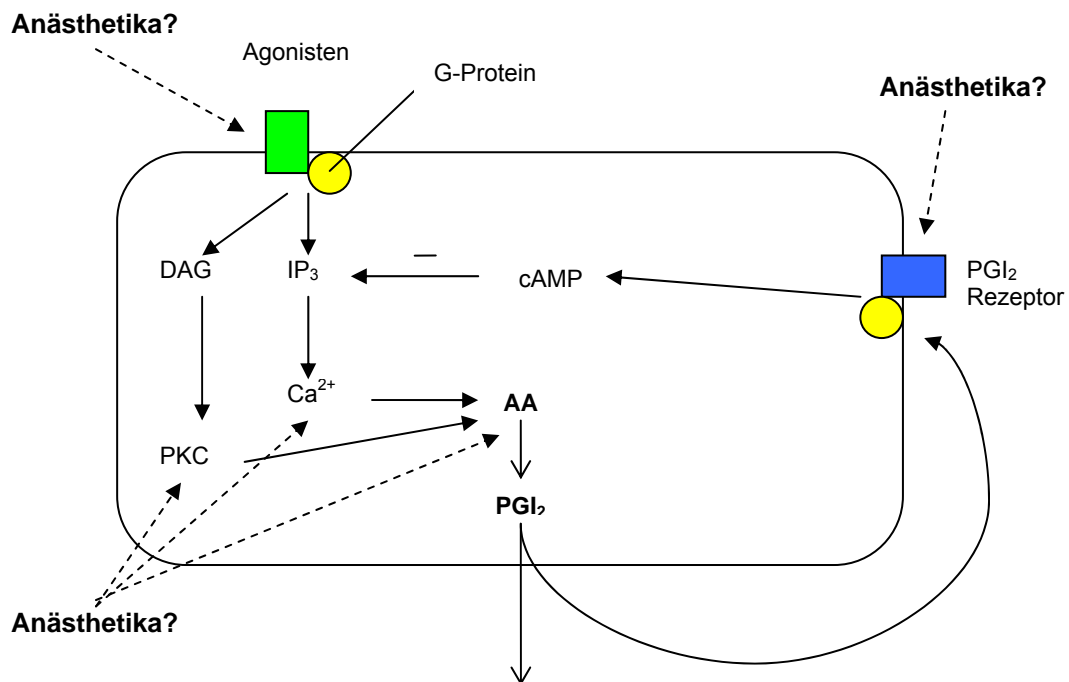


Abbildung 22 Mögliche Wirkorte der Anästhetika

Die Angriffspunkte sind möglicherweise: Rezeptor/G-Protein-Kopplung, Kalziumfreisetzung (aus internen Speichern), Proteinkinase C, Prostacyclin-Rückkopplung – modifiziert nach Bolz und Pohl [82]

V. Zusammenfassung

Viele im klinischen Alltag verwendete volatile Anästhetika verursachen während der Narkose eine Vasodilatation. In dieser Hinsicht wäre es interessant, zu untersuchen, ob volatile Anästhetika die Prostacyclinbildung in Endothelzellen beeinflussen können. Für diese Untersuchungen wurden primäre humane Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC) isoliert und in Zellkulturen kultiviert. Diese Zellen zeigen nach Zugabe von Histamin eine dosis- und zeitabhängige Prostacyclinbildung. Entscheidend für diese Prostacyclinbildung ist die Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern.

Die dosisabhängige Untersuchung von Halothan auf die Prostacyclinbildung zeigte eine signifikante Stimulation der Prostacyclinbildung von 33,8% bei einer klinisch relevanten Konzentration von 1 Vol.%. Diese stimulierende Wirkung von Halothan auf die Prostacyclinbildung könnte einen Beitrag zu der in vivo beobachteten vasodilatierenden Wirkung des Anästhetikums leisten. Eine ähnliche stimulierende Wirkung wurde auch für Isofluran beobachtet, obwohl der stimulierende Effekt auf die Prostacyclinbildung keine statistische Relevanz erreichte. Höhere supraklinische Konzentrationen der beiden Anästhetika hemmen allerdings signifikant die Prostacyclinbildung.

Die Aktivierung der Proteinkinase C in den HUVEC Zellen hat keinen signifikanten Einfluss auf die Histamin-induzierte Prostacyclinbildung. Dieses Ergebnis macht eine stimulierende Wirkung der volatilen Anästhetika auf die Prostacyclinbildung mittels Proteinkinase C-Aktivierung unwahrscheinlich.

Die Stimulation der NO-Signalweges mittels Natrium-Nitroprussid in den HUVEC Zellen verursachte eine signifikante Hemmung der Histamin-induzierten Prostacyclinbildung. Andererseits führte die Hemmung des NO-Signalwegs mit L-NAME nicht zu einer signifikanten Zunahme der Prostacyclinbildung. Eine mögliche Hemmung des NO-Signalwegs durch volatile Anästhetika kann daher in HUVEC Zellen nicht durch vermehrte Prostacyclinbildung kompensiert werden.

Literaturverzeichnis

1 Chen TL, Yang SF, Chang HC, Tai YT, Li NL, Lin CJ
Comparison of hemodynamics and recovery of sevoflurane and isoflurane anesthesia in Chinese adult patients.

Acta Anaesthesiol Sin 1998; 36:31-6

2 Wiesner G, Schwurzer S, Horauf K, Hobbahn J
Emergence times, hemodynamics and adverse effects of sevoflurane and isoflurane: an open, randomized, comparative phase iii study

Anaesthesist 1994; 43:587-93.

3 Kurt F, Derbent A, Demirag K, Eris O, Uyar M, Islekel S
Old method, new drugs: comparison of the efficacy of sevoflurane, isoflurane, and desflurane in achieving controlled hypotension in spinal surgery.

Adv Ther 2005; 22:234-40

4 Beaussier M, Paugam C, Deriaz H, Mestari M, Chandon M, Sautet A, Lienhart A
Haemodynamic stability during moderate hypotensive anaesthesia for spinal surgery. A comparison between desflurane and isoflurane.

Acta Anaesthesiol Scand 2000; 44:1154-9

5 Caverni V, Rosa G, Pinto G, Tordiglione P, Favaro R
Hypotensive anesthesia and recovery of cognitive function in long-term craniofacial surgery.

J Craniofac Surg 2005; 16:531-6

6 Dal D, Celiker V, Ozer E, Basgul E, Salman MA, Aypar U
Induced hypotension for tympanoplasty: a comparison of desflurane, isoflurane and sevoflurane.

Eur J Anaesthesiol 2004; 21:902-6.

7 Frink EJ Jr, Malan TP, Atlas M, Dominguez LM, DiNardo JA, Brown BR Jr.
Clinical comparison of sevoflurane and isoflurane in healthy patients.
Anesth Analg 1992; 74: 241-5

8 Torri G, Casati A
Cardiovascular homeostasis during inhalational general anesthesia: a clinical
comparison between sevoflurane and isoflurane. On behalf of the Italian Research
Group on sevoflurane.
J Clin Anesth 2000; 12:117-22

9 Sarner JB, Levine M, Davis PJ, Lerman J, Cook DR, Motoyama EK
Clinical characteristics of sevoflurane in children. A comparison with halothane.
Anesthesiology 1995; 82:38-46.

10 Stekiel TA, Stekiel WJ, Bosnjak ZJ
The Peripheral Vasculature: Control and Anesthetic Actions,
Anesthesia: Biologic Foundations 1997; 1135-68

11 Mulvany MJ Aalkjaer C
Structure and function of small arteries
Physiol. Rev. 1990; 70: 921-61

12 Villar IC, Francis S, Webb A, Hobbs AJ, Ahluwalia A
Novel aspects of endothelium-dependent regulation of vascular tone
Kidney International advance online publication 2006; 7

13 D'Orleans-Juste P, Mitchell JA, Wood EG, Hecker M, Vane JR
Comparison of the release of vasoactive factors from venous and arterial bovine
cultured endothelial cells
Can J Physiol Pharmacol 1992; 70:687-94

14 Daugherty MO, Rich GF, Johns RA

Vascular Endothelium;

Current Opinion in Anesthesiology 1995; 8:88-94

15 Stankevičius E, Kévelaitis E, Vainorius E, Simonsen U

Role of nitric oxide and other endothelium-derived factors

Medicina 2003; 39

16 Rubanyi GM

Endothelium-derived relaxing and contracting factors.

J Cell Biochem. 1991; 46:27-36

17 Rudic RD, Brinster D, Cheng Y, Fries S, Song WL, Austin S, Coffman TM,

FitzGerald GA

COX-2-derived prostacyclin modulates vascular remodeling

Circ Res. 2005; 96:1240-7

18 Marasciulo FL, Montagnani M, Potenza MA

Endothelin-1: the yin and yang on vascular function.

Curr Med Chem. 2006; 13:1655-65

19 Bunting S, Gryglewski R, Moncada S, Vane JR

Arterial walls generate from prostaglandin endoperoxides a substance (prostaglandin X) which relaxes strips of mesenteric and coeliac arteries and inhibits platelet aggregation.

Prostaglandins. 1976; 12:897-913

20 Moncada S, Higgs EA, Vane JR

Human arterial and venous tissues generate prostacyclin (prostaglandin x), a potent inhibitor of platelet aggregation.

Lancet. 1977; 1:18-20

21 Vane JR, Botting RM

Pharmacodynamic profile of prostacyclin.

Am J Cardiol. 1995; 75:3A-10A.

22 Brock TG, McNish RW, Peters-Golden M

Arachidonic Acid Is Preferentially Metabolized by Cyclooxygenase-2 to Prostacyclin and Prostaglandin E2

J Biol Chem, 1999; 274:11660-6

23 Liou JY, Shyue SK, Tsai MJ, Chung CL, Chu KY, Wu KK

Colocalization of Prostacyclin Synthase with Prostaglandin H Synthase-1 (PGHS-1) but Not Phorbol Ester-induced PGHS-2 in Cultured Endothelial Cells

J Biol Chem 2000; 275:15314-20

24 Moncada S.

Eighth Gaddum Memorial Lecture. University of London Institute of Education, December 1980. Biological importance of prostacyclin.

Br J Pharmacol. 1982 ;76:3-31

25 Lückhoff A, Pohl U, Mülsch A, Busse R

Differential role of extra- and intracellular calcium in the release of EDRF and prostacyclin from cultured endothelial cells,

Br. J. Pharmacology 1988; 95:189-196

26 Jaffe EA, Grulich J, Weksler BB, Hampel G, Watanabe K

Correlation between Thrombin-induced Prostacyclin Production and Inositol Triphosphate and Cytosolic Free Calcium Levels in Cultured Human Endothelial Cells,

J Biol Chem 1987; 262:8557-65,

27 Bhagyalakshmi A, Frangos JA

Mechanism of shear-induced prostacyclin production in endothelial cells

Biochem Biophys Res Commun 1989; 158:31-7

28 Berthiaume F, Frangos JA

Flow-induced prostacyclin production is mediated by a pertussis toxin-sensitive G protein

FEBS 1992; 8:277-9

29 Frangos JA, Eskin SG, McIntire LV, Ives CL

Flow effects on prostacyclin production by cultured human endothelial cells

Science 1985; 227:1477-9

30 Frangos JA, McIntire LV, Eskin SG

Shear Stress Induced Stimulation of Mammalian Cell Metabolism

Biotechnology and Bioengineering 1988; 32:1053-60

31 Loeb AL, O'Brien DK, Longnecker DE

Halothane Inhibits Bradykinin-stimulated Prostacyclin Production in Endothelial Cells

Anesthesiology 1994; 81:931-928

32 Williams B, Schrier RW

Glucose-induced protein kinase C activity regulates arachidonic acid release and eicosanoid production by cultured glomerular mesangial cells.

J Clin Invest 1993; 92:2889-96

33 Huwiler A, Fabbro D, Pfeilschifter J

Possible regulatory functions of protein kinase C-alpha and -epsilon isoenzymes in rat renal mesangial cells. Stimulation of prostaglandin synthesis and feedback inhibition of angiotensin II-stimulated phosphoinositide hydrolysis

Biochem J 1991; 279:441-5

34 Coussens L, Rhee L, Parker PJ, Ullrich A

Alternative splicing increases the diversity of the human protein kinase C family

DNA 1987; 6:389-94

35 Lang U, Vallotton MB

Effects of angiotensin II and of phorbol ester on protein kinase C activity and on prostacyclin production in cultured rat aortic smooth-muscle cells.

Biochem J 1989; 259:477-83

36 Ho AK, Chik CL, Klein DC

Protein kinase C is involved in adrenergic stimulation of pineal cGMP accumulation

J Biol Chem 1987; 262:10059-64

37 Godson C, Weiss BA, Insel PA

Differential activation of protein kinase C alpha is associated with arachidonate release in Madin-Darby canine kidney cells

J Biol Chem 1990; 265:8369-72

38 Halenda SP, Banga HS, Zavoico GB, Lau LF, Feinstein MB

Synergistic Release of Arachidonic Acid from Platelets by Activators of Protein in the Activation of Phospholipase A2 and Independence from the Na⁺/HS Kinase C and Ca²⁺ Ionophores. Evidence for the Role of Protein Phosphorylation Exchanger?

Biochemistry 1989, 28:7356-7363

39 Lim H, Dey SK

Minireview: A Novel Pathway of Prostacyclin Signaling-Hanging Out With Nuclear Receptors

Endocrinology 143:3207-3210

40 Namba T, Oida H, Sugimoto Y, Kakizuka A, Negishi M, Ichikawa A, Narumiya S
cDNA cloning of a mouse prostacyclin receptor. Multiple signalling pathways and expression in thymic medulla

J Biol Chem 1994; 269:9986-92

- 41 Smyth EM, Austin SC, Reilly MP, Fitzgerald GA
Internalization and Sequestration of the Human Prostacyclin Receptor
J Biol Chem 2000; 275:32037-45
- 42 Furchgott RF, Zawadzki JV
The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine
Nature 1980; 288:373-376
- 43 Moncada S, Palmer RM, Higgs EA
The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator
Hypertens 1988; 12:365-72
- 44 Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA
Generation of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor from endothelial cells. In: Jolles G, Legrand JY, Nurden A, eds. Biology and pathology of platelet-vessel wall interactions.
London Academic 1986:289-304
- 45 Busse R, Trogisch G, Bassenge E
The role of endothelium in the control of vascular tone
Basic Res Cardiol 1985; 8:475-90
- 46 Radomski MW, Palmer RM, Moncada S
The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide
Br J Pharmacol 1987; 92:639-46
- 47 Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S
Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide and prostacyclin in platelets
Br J Pharmacol 1987; 92:181-7

- 48 Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium
Lancet 1987; 2:1057-8
- 49 Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S
The role of nitric oxide and cGMP in platelet adhesion to vascular endothelium
Biochem Biophys Res Commun 1987; 148:1482-9
- 50 Furchgott RF
Studies on relaxation of rabbit aorta by sodium nitrite: the basis for the proposal that the acid activatable inhibitory factor from bovine retractor penis is inorganic nitrite and the endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide. In: Vanhoutte PM, Mechanisms of vasodilatation
New York: Raven Press, 1988: 401-14
- 51 Ignarro LJ, Byrns RE, Wood KS
Biochemical and pharmacological properties of EDRF and its similarity to nitric oxide radical. In: Vanhoutte PM, Mechanisms of vasodilatation
New York: Raven Press, 1988: 427-35
- 52 Hutchinson PJA, Palmer RMJ, Moncada S
Comparative pharmacology of EDRF and nitric oxide on vascular strips.
Eur J Pharmacol 1987; 141:445-51
- 53 Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S
Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor
Nature 1987 27:524-6
- 54 Johns RA
Endothelium-derived relaxing factor: basic review and clinical implications
J Cardiothorac Vasc Anesth. 1991; 5:69-79

55 Förstermann U, Boissel JP, Kleinert H

Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III)

FASEB J. 1998; 12:773–90

56 Ranjan V, Xiao Z, Diamon SL

Constitutive NOS expression in cultured endothelial cells is elevated by fluid shear stress

Am J Physiol Heart Circ Physiol 1995; 269:550-5

57 Hecker M

Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor-Fact or Fiction?

News in Physiol Sci 2000; 15:1-5

58 Triggle CR, Ding H

Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor: Is There A Novel Chemical Mediator?

Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology 2002; 29:153

59 Shepherd JT, Katusic ZS

Endothelium-derived vasoactive factors: I. Endothelium-dependent relaxation.

J Hypertens 1991; 18:76-85.

60 Katusic ZS, Shepherd JT.

Endothelium-derived vasoactive factors: II. Endothelium-dependent contraction.

J Hypertens 1991; 18:86-92.

61 Hürlimann D, Ruschitzka F, Lüscher TF

The relationship between the endothelium and the vessel wall

European Heart Journal Supplements 2002; 4(Supplement A):A1–A7

62 Katusic ZS, Shepherd JT., Vanhoutte PM

Endothelium-dependent contraction to stretch in canine basilar arteries

Am J Physiol Heart Circ Physiol 1987; 252:671-3

63 Reynolds EE, Mok LL

Role of thromboxane A₂/prostaglandin H₂ receptor in the vasoconstrictor response of rat aorta to endothelin

JPET 1990; 252:915-21

64 Asano H, Shimizu K, Muramatsu M, Iwama Y, Toki Y, Miyazaki Y, Okumura K, Hashimoto H, Ito T

Prostaglandin H₂ as an endothelium-derived contracting factor modulates endothelin-1-induced contraction.

J Hypertens 1994; 12:383-90

65 Ushikubi F, Nakajima M, Hirata M, Okuma M, Fujiwara M, Narumiya S

Purification of the thromboxane A₂/prostaglandin H₂ receptor from human blood platelets

J Biol Chem 1989; 264:16496-501

66 Halushka PV, Mais DE, Saussy DL Jr.

Platelet and vascular smooth muscle thromboxane A₂/prostaglandin H₂ receptors.

Fed Proc 1987; 46:149-53.

67 Ito T, Kato T, Iwama Y, Muramatsu M, Shimizu K, Asano H, Okumura K,

Hashimoto H, Satake T

Prostaglandin H₂ as an endothelium-derived contracting factor and its interaction with endothelium-derived nitric oxide.

J Hypertens 1991; 9:729-36.

68 Ziyyat A, Zhang BL, Benzoni D

Interactions between nitric oxide and prostanoids in isolated perfused kidneys of the rat.

Br J Pharmacol 1996; 119:388-92.

69 Patrono C

Biosynthesis and pharmacological modulation of thromboxane in humans.

Circulation 1990; 81:12-5,22-3

70 Patscheke H, Hornberger W, Zehender H

Pathophysiological role of thromboxane A2 and pharmacological approaches to its inhibition.

Z Kardiol 1990; 79 Suppl 3:151-4

71 Ogletree ML

Overview of physiological and pathophysiological effects of thromboxane A2.

Fed Proc 1987; 46:133-8

72 Gryglewski RJ, Palmer RMJ, Moncada S

Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor

Nature 1986; 320:454-6

73 Rengasamy A, Jo RA

Inhibition of nitric oxide synthase by a superoxide generating system

JPET 1993; 267:1024-7

74 Cosentino F, Sill JC, Katusic ZS

Role of superoxide anions in the mediation of endothelium-dependent contractions

Hypertension 1994; 23:229-35

75 Schror K, Woditsch I, Strobach H, Schroder H

Interactions between nitric oxide and prostacyclin in myocardial ischemia and endothelial cell cultures

Basic Res Cardiol 1991; 86:117-25

76 Doni MG, Whittle BJ, Palmer RM, Moncada S

Actions of nitric oxide on the release of prostacyclin from bovine endothelial cells in culture

Eur J Pharmacol 1988; 151:19-25

77 Sautebin L, Ialenti A, Ianaro A, Di Rosa M

Modulation by nitric oxide of prostaglandin biosynthesis in the rat

Br J Pharmacol. 1995; 114:323-8.

78 Sievi E, Lahteenmaki TA, Alanko J, Vourinen P, Vapaatalo H

Nitric oxide as a regulator of prostacyclin synthesis in cultured rat heart endothelial cells

Arzneimittelforschung 1997; 47:1093-8

79 Shimokawa H, Flavahan NA, Lorenz RR, Vanhoutte PM.

Prostacyclin releases endothelium-derived relaxing factor and potentiates its action in coronary arteries of the pig.

Br J Pharmacol. 1988; 95:1197-203

80 Gambone LM, Murray PA, Flavahan NA

Synergistic interaction between endothelium-derived NO and prostacyclin in pulmonary artery: potential role for K⁺ATP channels

Br J Pharmacol 1997; 121:271-9

81 Vassalle C, Domenici C, Lubrabo V, L'Abbate A

Interaction between Nitric Oxide and Cyclooxygenase Pathways in Endothelial Cells

J Vasc Res, 2003;40:491-9

82 Bolz S, Pohl U

Indomethacin Enhances Endothelial NO Release – Evidence for a Role of PGI₂ in the Autocrine Control of Calcium-dependent Autacoid Production

Cardiovasc. Res 1997; 36:437-44

83 Osanai T, Fujita N, Nakano T, Takanashi K, Guan W, Okumura K, 2000

Cross Talk of Shear-induced Production of Prostacyclin and Nitric Oxide in Endothelial Cells, Am J Physiol Heart Circ Physiol 2000; 278:233-8

84 Lischke V, Kessler P, Hecker M

Anästhetika und Stickstoffmonoxid

Anästhesist 1997; 46; 659-76

85 Nakamura K, Terasako K, Toda H, Miyawaki I, Kakuyama M, Nishiwada M, Hatano Y, Mori K

Mechanisms of inhibition of endothelium-dependent relaxation by halothane, isoflurane, and sevoflurane

Can J Anaesth 1994, 41:340-6

86 Durieux, Marcel E. MD

Halothane Inhibits Signaling through m1 Muscarinic Receptors Expressed in Xenopus Oocytes

Anesthesiology 1995; 82:174-82

87 Bohm M, Schmidt U, Gierschik P, Schwinger RH, Bohm S, Erdmann E

Sensitization of adenylate cyclase by halothane in human myocardium and S49 lymphoma wild-type and cyc- cells: evidence for inactivation of the inhibitory G protein Gi alpha

Mol Pharmacol 1994; 45:380-9

88 Schmidt U, Schwinger RH, Bohm M

Interaction of Halothane with Inhibitory G-proteins in the Human Myocardium

Anesthesiology 1995; 83:353-60

89 Nakayama T, Hayashi M, Warner DO, Jones KA

Anesthetics Inhibit Membrane Receptor Coupling to the Gq/11 Heterotrimeric G Protein in Airway Smooth Muscle

Anesthesiology 2005; 103:296–305

90 Rooney TA, Hager R, Stubbs CD, Thomas AP

Halothane Regulates G-protein-dependent Phospholipase C Activity in

Turkey Erythrocyte Membranes

J Biol Chem 1993; 268:15550-6,

91 Rebecchi MJ, Pentylala SN

Anesthetic actions on other targets: protein kinase C and Guanin nucleotide-binding proteins

Br J Anaesth 2002; 89: 62-78

92 Heindl B, Reichle F, Becker BF

Sevoflurane but not Isoflurane can reduce prostacyclin production of endothelial cells

Eur J Anaesth 2003; 20:116-9

93 Gambone LM, Murray PA, Flavahan NA

Isoflurane Anesthesia Attenuates Endothelium-dependent Pulmonary Vasorelaxation by Inhibiting the Synergistic Interaction between Nitric Oxide and Prostacyclin

Anesthesiology 1997; 86:936-44

94 Mutschler Ernst, Geisslinger G, Kroemer HK, Schäfer-Korting M

Mutschler Arzneimittelwirkungen, Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie, 8. Aufl.

Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 2001: 277-280

95 Kretz FJ, Schäffer J

Anästhesie, Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie, 4. Aufl.

Springer Verlag, 2006: 45-53

96 Eger EI 2nd

The pharmacology of Isoflurane

Br J Anaesth 1984; 56 Suppl 1:71-99

97 Mutschler Ernst, Geisslinger G, Kroemer HK, Schäfer-Korting M

Mutschler Arzneimittelwirkungen, Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie, 8. Aufl.

Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 2001: 280-287

98 AstraZeneca

DIPRIVAN® (propofol) Injectable Emulsion

Beipackzettel

99 Su JY, Vo AC

Role of PCK in Isoflurane-induced biphasic contraction in skinned pulmonary arterial strips

Anesthesiology 2002; 96:155-61

100 Marinovic J, Stadnicka A, Kwok WM, Bosnjak ZJ

Isoflurane Induces Prolonged Sensitization of the Sarcolemmal K_{ATP} Channel by a PKC Mediated Mechanism

Anesthesiology 2004; 101: A614

101 Higaki T, Sawada S, Kono Y, Isamura H, Toda Y, Yamasaki S, Toratani A, Sato T, Komatsu S, Akamatsu N, Tamagaki T, Tsuda Y, Tsuji H, Nakagawa M

A Role of Protein Kinase C in the Regulation of Cytosolic Phospholipase A2 in Bradykinin-Induced PGI₂ Synthesis in Human Vascular Endothelial Cells

Microvasc Res 1999, 58:144-55

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Chemische Struktur von Prostacyclin	4
Abbildung 2	Stoffwechselfad der Arachidonsäure-Derivate.....	5
Abbildung 3	Überblick über die relaxierenden Faktoren Prostacyclin und NO.....	10
Abbildung 4	Überblick über die kontrahierenden Faktoren.....	13
Abbildung 5	Mögliche Wirkorte volatiler Anästhetika im NO-Signalweg.....	17
Abbildung 6	Chemische Struktur von Halothan.....	19
Abbildung 7	Chemische Struktur von Isofluran.....	19
Abbildung 8	Chemische Struktur von Propofol	20
Abbildung 9	Bereitung eines Anästhetikum-äquilibrierten Puffers	29
Abbildung 10	Versuchsordnung mit Spritzenpumpen und 4-Wege-Ventil.....	33
Abbildung 11	Dosisabhängigkeit der Prostacyclinbildung	36
Abbildung 12	Zeitabhängigkeit der Prostacyclinbildung.....	37
Abbildung 13	Biphasisches Ca^{2+} -Signal im HUVEC System.....	38
Abbildung 14	Ca^{2+} -Signal im HUVEC System in An- und Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+}	39
Abbildung 15	Kalziumabhängigkeit der Prostacyclinbildung.....	39
Abbildung 16	Prostacyclinbildung in An- und Abwesenheit von EGTA	40
Abbildung 17	Einfluss von PMA auf die Prostacyclinbildung	41
Abbildung 18	Einfluss von Halothan auf die Histamin-induzierte PGI_2 -Bildung. ...	42
Abbildung 19	Einfluss von Isofluran auf die Histamin-induzierte PGI_2 -Bildung.....	43
Abbildung 20	Einfluss von Propofol auf die Prostacyclinbildung.....	44
Abbildung 21	Einfluss von Natrium-Nitroprussid (SNP) und L-NAME auf die Histamin-induzierte Prostacyclinbildung	45
Abbildung 22	Mögliche Wirkorte der Anästhetika	53

Abkürzungsverzeichnis

4 α PD	4 α -Phorbol-12,13-Didecanoat
ACh	Acetylcholin
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
CLSM	Confocal Laser Scanning Microscope
COX	Cyclooxygenase
DAG	1,2-Diacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDHF	Endothelium Derived Hyperpolarizing Factor
EDRF	Endothelium Derived Relaxing Factor
EDTA	Ethyldiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykoltetraacetat
ELISA	Enzyme Linked Immuno Assay
FCS	Fetal Calf Serum
HMEC-1	Human Microvascular Endothelial Cells-1
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
IP ₃	Inositol 1,4,5-Trisphosphat
L-NAME	N ^G -Nitro-L-Arginin-Methylester
MAC	Minimale alveoläre Konzentration
NO	Nitric Oxide
NOS	NO-Synthase
PBS	Phosphate Buffered Saline
PGH ₂	Prostaglandin H ₂
PGI ₂	Prostacyclin
PKC	Proteinkinase C
PMA	4 α Phorbol 12-Myristat 13-Acetat
RDGF	Retina Derived Growth Factor
TxA ₂	Thromboxan A ₂

Ich danke Herrn Priv.-Doz. Dr. Tas für das Überlassen des Themas, die kontinuierliche, zuverlässige Betreuung und seine endlos scheinende Geduld. Des Weiteren bedanke ich mich bei Andrea Jahn für die ständige intensive Unterstützung.

Curriculum Vitae

geboren am 12.12.1979 in Schwäbisch Gmünd
verheiratet, keine Kinder

Schule/Ausbildung/Studium

- 1987-1991 **Grundschule Wäschenbeuren**
- 1991-1999 **Hohenstaufen-Gymnasium Göppingen**
Abitur 06/99
- 1996-1997 **George Washington High School, Charleston, West Virginia, USA**
Auslandsjahr
- 1999-2000 **DRK Rems-Murr, Rettungsdienst**
Zivildienst
- 2000-2001 **Ausbildung zum Rettungsassistenten**
Ausbildungsgesellschaft Werdau, Anerkennung 08/2002
- 04/2001-04/2007 **Studium Humanmedizin,**
Julius-Maximilian-Universität Würzburg
2. Ärztliche Prüfung bestanden mit dem 01.06.2007

Famulaturen/Praktisches Jahr

- 09/2003 **Auguste Viktoria Krankenhaus, Berlin**
- 03/2004 **Centre Hospitalier Universitaire Ibn Sina, Rabat, Marokko**
- 09/2004 **Gilbert Bain Hospital, Lerwick/Shetland Islands, GB**
- 03/2005 **Khoula Hospital, Mina al Fahal/Muscat, Sultanat von Oman**
- 02/2006-10/2006 **Juliusspital Würzburg**
- 10/2006-01/2007 **Université Catholique de Louvain, Cliniques St. Luc, Brüssel, Belgien**

Düsseldorf, 30.08.07