

Melanie Ehrhard
Dr. med.

Signaltransduktionswege der Erythrozytenmembranverformung und Beeinflussbarkeit durch Lipid A und Endothelin-1

Geboren am 25.09.1977 in Weinheim
Staatsexamen am 28.10.2003

Promotionsfach: Kinderheilkunde
Doktorvater: Prof. Dr. med. J. Pöschl

Die Verformungsfähigkeit der Erythrozyten ist ein entscheidender hämodynamischer Parameter für die Mikrozirkulation im menschlichen Körper. Für die Verformbarkeit des Erythrozyten ist vor allem die Zellmembran mit ihren vielfältigen Proteininteraktionen verantwortlich. Die genauen Regulationsmechanismen dieser Interaktionen sind in ihrer Gesamtheit noch nicht erklärt. Man kennt drei Hauptwege, die Steuerung durch verschieden regulierte Kalziumkanäle und die Steuerung durch Proteinkinasen, insbesondere durch die Proteinkinase C und die Rhokinase und der direkte Einfluss von Lipid A. Die Verformungsfähigkeit wird durch verschiedene Faktoren negativ beeinflusst. In der vorliegenden Studie wurden die Wirkungen des Endotoxinbestandteils Lipid A und der vasoaktiven Substanz Endothelin-1 untersucht.

Lipid A ist der Hauptbestandteil des Lipopolysaccharids gramnegativer Bakterien. In Studien konnte gezeigt werden, dass sich die Rigidität der Erythrozytenmembran durch Inkubation mit Lipid A erhöht. Diese Rigiditätszunahme ist von der Inkubationsdauer abhängig und nach 15 min maximal. Der zugrundeliegende Mechanismus ist noch unklar, aber man kann davon ausgehen, dass Lipid A direkt auf die Zellmembranen wirkt.

Endothelin-1 ist eine vasoaktive Substanz mit überwiegend vasokonstriktiver Komponente und wird von Endothelzellen, vor allem als Reaktion auf mechanische Reize, freigesetzt. Es konnte nachgewiesen werden, dass Endothelin-1 eine der Substanzen ist, die bei einer Sepsis im Blut erhöht sind. Daraus ergibt sich die wichtige klinische Relevanz, die Wirkung von Endothelin-1 auf die Erythrozytenverformbarkeit mit der Endotoxinwirkung zu untersuchen, da ein direkter Zusammenhang der Wirkung beider Substanzen, bzw. ein ähnlicher Wirkmechanismus, einen neuen therapeutischen Ansatzpunkt für die Sepsis und die daraus resultierenden hämodynamischen Komplikationen, die vor allem Neu- und Frühgeborene vital gefährden, darstellt.

Für die Versuche zur Messung der Erythrozytenverformbarkeit wurde das Laserdiffraktometer Rheodyn SSD benutzt, welches durch Rotation einer Glasplatte die Scherkräfte simuliert, die in kleinen Blutgefäßen auf Erythrozyten einwirken.

In den durchgeführten Experimenten hat sich die Verformbarkeit der Erythrozyten durch Inkubation mit Lipid A zeitabhängig signifikant reduziert (nach einer Inkubationsdauer von 15 min und einer einwirkenden Scherkraft von 12 Pa von $45,5 \% \pm 0,73$ auf $39,5 \% \pm 1,64$; $p = 0,001$). Diese Reduktion war nach 60 min Inkubationsdauer reversibel. Gleichzeitige Mitinkubation des Kalziumkanalblockers vom L-Typ Verapamil und des Proteinkinaseinhibitors Staurosporin, der vor allem die Proteinkinase C inhibiert, konnte

diesen Effekt signifikant hemmen (Erythrozytendeformabilität nach einer Inkubationsdauer von 15 min bei einer Scherkraft von 12 Pa mit Lipid A $39,5 \% \pm 1,64$; mit Lipid A und Verapamil $43,9 \% \pm 1,2$; mit Lipid A und Staurosporin $44,8 \% \pm 1,0$). Der Rhokinaseinhibitor Y-27632 zeigte keinen signifikanten Effekt auf die durch Lipid A reduzierte Erythrozytenverformbarkeit.

Auch durch Inkubation mit Endothelin-1 wurde die Verformungsfähigkeit der Erythrozyten signifikant reduziert (nach einer Inkubationsdauer von 15 min und einer einwirkenden Scherkraft von 12 Pa von $44,4 \% \pm 1,2$ auf $40,1 \% \pm 0,8$; $p = 0,003$). Gleichzeitige Mitinkubation des Proteinkinaseinhibitors Staurosporin konnte diesen Effekt signifikant ($p = 0,001$) hemmen (nach einer Inkubationsdauer von 15 min und einer einwirkenden Scherkraft von 12 Pa $43,5 \% \pm 0,9$). Verapamil und Y-27632 zeigten keinen signifikanten Effekt.

Die vorliegende Studie unterstützt die Hypothese, dass sowohl Toxine, wie Lipid A, als auch vasoaktive Substanzen, wie Endothelin-1, über ähnliche Signaltransduktionswege die Verformbarkeit der Erythrozyten über Wirkungen auf die Membran beeinflussen. Diese Einwirkung scheint leukozytenunabhängig, da sie sowohl in isolierten Erythrozyten, als auch in Vollblut nachweisbar ist. Die Verformbarkeitsreduktion ließ sich bei beiden Substanzen durch gleichzeitige Inkubation mit Staurosporin hemmen. Der Rhokinaseinhibitor zeigte weder bei den Experimenten mit Lipid A noch bei den Experimenten mit Endothelin-1 eine signifikante Änderung der verminderten Verformbarkeit. Verapamil inhibierte den deformabilitätsreduzierenden Effekt von Lipid A signifikant, nicht aber den von Endothelin-1, was eventuell durch die hohe verwendete Konzentration von Endothelin-1 zu erklären ist. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass Kalziumkanäle, insbesondere die durch Proteinkinase C regulierten, für die Verformbarkeit der Erythrozyten und deren Beeinflussbarkeit verantwortlich sind. Diese Annahme muss genauer untersucht werden, insbesondere im Hinblick auf pharmakotherapeutische mögliche Intervention bei mikrozirkulatorischen Störungen durch eine Sepsis.