



U O S S T E C

APNOE-TAUCHEN: Forschung zu Static Apnea

DCS-FORSCHUNG: Rolle von Microparticles

NITROX vs. LUFT: Weniger Erschöpfung mit Nitrox?

PRO & CONTRA: Monoplace vs. Multiplace Chamber



GTÜM-SYMPOSIUM 2016

und Jubiläumsveranstaltung „20 Jahre Druckkammerzentrum Traunstein“

Stellenwert der Hyperbaren Sauerstofftherapie bei Knochenerkrankungen & Aktuelles aus der Tauchmedizin

Samstag, 4. Juni 2016

Traunstein

Tagungsort

Landratsamt Traunstein
Ludwig-Thoma-Str.
283278 Traunstein

Zeit

09.00 Uhr bis ca. 17.00 Uhr

Sprache

Deutsch und Englisch, deutsche Übersetzungen der englischsprachigen Vorträge sind verfügbar, die Bildpräsentationen sind ins Deutsche übersetzt

Teilnehmergebühr

50,- € Tagungsgebühr inkl. Kaffee und Mittagessen

Information

Fr. Claudia Wölfle, Fr. Anne Auner
Druckkammerzentrum Traunstein
Cuno-Niggel-Str. 3, 83278 Traunstein, Tel.: +49-861-15967, Fax: +49-861-15889
Email: mail@hbo-traunstein.de

Unterkunft

Parkhotel Traunstein
Bahnhofstr. 11, 83278 Traunstein, Tel. +49-861-988820

Hotel Rosenheimer Hof
Rosenheimer Str. 58, 83278 Traunstein, Tel. 0861-986590

Kennwort: „Tagung/Kongress Druckkammerzentrum“

Partnerprogramm

4.6.16 (noch offen)
5.6.16 Ausflug nach Salzburg

CME

Anerkannt mit 8 Punkten für ärztliche Weiterbildung
Anerkannt mit 8 UE als Refresher für GTÜM-Diplome I und IIa

Download des vorläufigen Programms unter folgendem Link: <http://www.gtuem.org/files/349/gtuem-symposium-2016-vorlaeufiges-programm.pdf>



Editorial



Sehr geehrte Leserinnen,
sehr geehrte Leser,

Evidence based Medicine, Reviews und mündige Leser...

Kurz vor Redaktionsschluss erreichte uns ein Artikel zur Frage der Wirksamkeit der HBO-Therapie beim Diabetischen Fußsyndrom (s.S. 56), der den Anlass für dieses Editorial darstellte. Hintergrund: Durch meine Mitarbeit in der Arbeitsgruppe „Hyperbare Sauerstofftherapie“ im Ausschuss Krankenhaus und im Gemeinsamen Bundesausschuss (2002-2009), sowie in der S3-Leitlinien-Gruppe der Deutschen Gesellschaft für Wundheilung und Wundbehandlung (2010-2014) habe ich etwas Einblick in die Erstellung evidenz-basierter Leitlinien und Health Technology Assessment (HTA)-Reports gewinnen können.

Zu den Entstehungsprozessen für evidenzbasierte Leitlinien und HTA-Reports ist festzuhalten: bei allem Bemühen um objektive Literatursuche, Studienanalyse und Bewertung der Primärliteratur, und trotz konsequenter Anwendung international akzeptierter Standards und detaillierter Dokumentation all dieser Punkte ist es letztlich nicht auszuschließen, dass am Entstehungsprozess beteiligte Gruppen oder Einzelpersonen tendenziell versuchen, das Ergebnis ihren ‚Wunschzielen‘ anzunähern. Jeder HTA-Report hat im Übrigen einen (zahlenden) Auftraggeber, der zumindest schon einmal die genaue Fragestellung des Reports vorgibt.

Inzwischen sind die Verarbeitungs- und Bewertungs-Prozesse so komplex geworden, dass es eigene Fachleute dafür gibt. Eine Durchdringung des Verfahrens und Nachvollziehbarkeit von Entscheidungen ist für Leser nur schwer möglich. Grundsätzlich sollten sie immer dann besonders skeptisch sein, wenn es

um viel Geld geht und mächtige Interessengruppen involviert sind. Evtl. können sie Schieflagen in einzelnen Metaanalysen erkennen, wenn sie Leitlinien und HTA-Reports von unterschiedlichen Auftraggebern zum gleichen Thema vergleichen können.

So schwierig die Bewertung von HTA-Reports und evidenzbasierte Leitlinien auch sein mag, ihre Aussagen sind i.d.R. deutlich belastbarer als Aussagen in nicht systematischen Reviews u.ä. Veröffentlichungen. Frei nach dem Sir Winston Churchill zugeschriebenen Bonmot ‚Traue keiner Statistik, die du nicht selbst gefälscht hast‘ kann ich ihnen eigentlich nur empfehlen, zu jedem Review - auch zu HTA-Reports & evidenzbasierten Leitlinien - die zitierten Studien selbst zu lesen, und zwar im Volltext (wenn sie nur die Abstracts lesen, entgeht ihnen vieles!). Sie würden dann evtl. einen persönlichen Eindruck gewinnen, der sich mit der Interpretation des Review-Autors nicht unbedingt deckt. Dieser Aufwand ist für viele Kollegen neben der täglichen Arbeit oft kaum leistbar. Bleiben Sie aber zumindest skeptisch und hinterfragen Sie immer die Hintergründe solcher Veröffentlichungen. Geht es wirklich nur um die reine akademische Lehre? - oder um anderes?

Wenn zu einem Thema sehr unterschiedliche Darstellungen verschiedener Interessengruppen vorliegen, dann gibt es für Leser leider keine Alternative zur eigenen Lektüre der zitierten Primärliteratur. Nur so können sie evtl. erkennen, ob ihnen jemand ein X für ein U vormachen will.

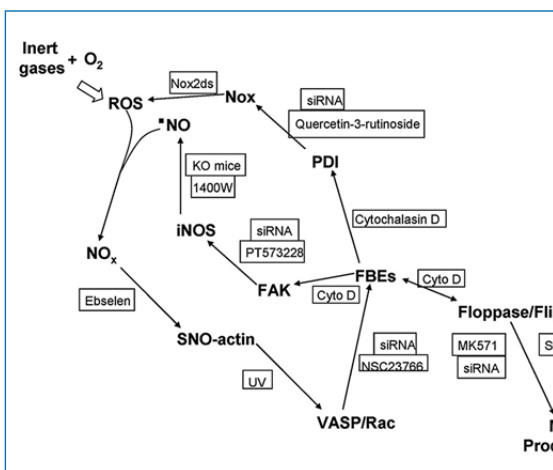
Ihr



02
GTÜM-
Symposium 2016



06
Titelthema
Statische Apnoe



18
DCS und
Mikropartikel



44
Luft oder Nitrox



48
Monoplace vs.
Multiplace



56
HBO bei Diabetischem Fußsyndrom

Zum Titelbild:

Die Apnoetaucher Gerhard Pribitzer und Martin Mühlbauer haben es sich gemütlich gemacht am "Pokaltisch". Die Sitzgruppe befindet sich im Neufeldersee (bei Neufeld an der Leitha, südlich von Wien) vor dem Action Diving Austria (ADA)-Seegrundstück auf ca. 5m Tiefe. Foto: Henriette Kissling, www.divepage.at, mit freundlicher Genehmigung.

Inhalt

02 **GTÜM-Symposium 2016**

03 **EDITORIAL**
Evidence based Medicine...

05 **Impressum & Hinweise für Autoren**

TAUCHMEDIZIN

06 **Statische Apone**
Angehaltene Atmung aus physiologischer Sicht: Theorie, Experiment und Forschung
Eugenijus Kaniusas, Florian Thürk, Stefan Kampusch, Stefan Traxler

18 **DCS und Mikropartikel**
Neutrophile generieren Mikropartikel während der Exposition gegenüber Inertgas aufgrund von zytoskelettalem oxidativem Stress
Stephen R. Thom

44 **Luft oder Nitrox**
Tauchen mit Luft oder Nitrox und das Gefühl der Erschöpfung. Warum haben manche Taucher den Eindruck, dass sie nach einem Nitrox-Tauchgang nicht so erschöpft sind?
Dr. Ulrich van Laak

HYPERBARMEDIZIN

48 **Monoplace vs. Multiplace**
PRO und CONTRA

A pro/con review comparing the use of mono- and multiplace hyperbaric chambers for critical care
Folke Lind

56 **HBO-Therapie bei DFS**
HBO beim diabetischen Fuß erneut falsch dargestellt
Christian Oest

AKTUELLES

58 **Leserbriefe**
zu PRO und CONTRA
Tauchtauglichkeit bei Kindern & Jugendlichen mit Diabetes Mellitus
Benno Kretzschmar, Karsten Theiss, Hansjörg Mühlen

60 **VDD mit neuem Vorstand**

61 **Kongress-Ankündigungen**

63 **Kursangebote**

65 **GTÜM-zertifizierte Veranstaltungen**

66 **GTÜM-Adressen**

Impressum & Hinweise für Autoren

caisson | Organ der Gesellschaft für Tauch- und Überdruckmedizin e.V. | ISSN 0933-3991

redaktion: Dr. Wilhelm Welslau, Seeböckgasse 17/2, A-1160 Wien, Tel.: +43 (0)699 1844 2390, caisson@gmx.net

herausgeber: Dr. Karin Hasmler (Vorstand der GTÜM), BG-Unfallklinik Murnau, Prof. Küntschers-Straße 8, D-82418 Murnau
Tel.: +49 (0)8841 48 2709, k.hasmler@gtuem.org

Geschäftsstelle: GTÜM e.V., Dunja Hausmann, BG-Unfallklinik Murnau, Prof. Küntschers-Straße 8, D-82418 Murnau
Tel. +49 (0)8841 48 2167, Fax +49 (0)8841 48 2166, gtuem@gtuem.org

Satz, Layout: medien@19, Paderborn, dagmar.venus@gmx.de, **Lektorat:** taucherarzt.at, Wien, **Druck & Versand:** Druckerei Marquart GmbH, Aulendorf, Auflage 1.400.

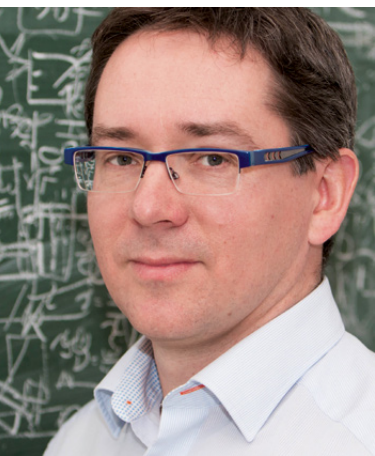
caisson erscheint viermal jährlich, etwa zur Mitte der Monate März, Juni, Sept. und Dez., Redaktionsschluss: 15. Feb., 15. Mai, 15. Aug. und 15. Nov.

Der Bezugspreis ist im Mitgliedsbeitrag enthalten.

Alle Zuschriften an die Redaktionsadresse. Kürzungen vorbehalten. Namentlich gekennzeichnete Beiträge stellen die Meinung des Autors dar und sind nicht als offizielle Stellungnahme der Gesellschaft aufzufassen.

- Einsendeschluss ist jeweils der 15. Tag im ersten Monat des Quartals.
- Es können nur solche Arbeiten und Zuschriften veröffentlicht werden, die per E-Mail oder CD bei der Redaktion eingehen.
- Datenformat: Microsoft Word, Silbentrennung: keine, Literaturverzeichnis: Nummerieren.
- Die Autoren werden gebeten, nach Möglichkeit Artikel aus früheren caisson-Heften zu zitieren.
- E-Mail: caisson@gmx.net

Angehaltene Atmung aus physiologischer Sicht: Theorie, Experiment und Forschung



FÜR DIE AUTOREN

ao.Univ.Prof. Dr.techn.
Eugenijus Kaniusas
Leiter der Forschungsgruppe
Biomedizinische Sensorik,
Institute of Electrodynamics,
Microwave and Circuit
Engineering
Technische Universität Wien
Gusshausstr. 27-29 / E354,
A-1040 Wien
kaniusas@tuwien.ac.at

Eugenijus Kaniusas | Florian Thürk | Stefan Kampusch | Stefan Traxler

Im Gegensatz zur kontinuierlichen Atmung, stellt angehaltene Atmung eine abnorme Situation für den menschlichen Körper dar, die nur über einen limitierten Zeitraum aufrechterhalten werden kann. Im Wesentlichen kann die Atmung entweder willentlich angehalten werden, wie z.B. im Falle einer *statischen Apnoe* unter Wasser in geringer Tiefe (Abb. 1), oder auch unwillentlich zum Stocken kommen, wie z.B. während einer *nächtlichen Apnoe* (Schlafapnoe) bei temporär verlegten Atemwegen [1]. In beiden Fällen werden mehrere physiologische regulatorische Schutzreaktionen ausgelöst, die anfänglich lediglich der Kompensation des fehlenden Lufttransports dienen - im Sinne eines Sparmodus des Körpers - aber später zur baldigen Auflösung des Atemstopps veranlassen sollen - im Sinne einer akuten Stressreaktion des Körpers [2].

Obwohl der Körper auf die beiden Apnoen zum Teil ähnlich reagiert, sind die langfristigen Auswirkungen

gen der statischen Apnoe und der Schlafapnoe gänzlich unterschiedlich. Während der willentliche Atemstillstand auch zur körperlichen und geistigen Fitness beitragen kann [3], zieht die unwillentliche nächtliche Apnoe gravierende pathophysiologische Verschlechterungen des gesundheitlichen Zustands nach sich, wie z.B. Herz- und Kreislauferkrankungen oder ausgeprägte Tagesmüdigkeit [4].

Der Fokus des vorliegenden Beitrags liegt in den grundsätzlichen physiologischen Zusammenhängen während einer *statischen Apnoe*. Dabei stellen Hypoxie und Hypercapnie die wesentlichsten Herausforderungen für den Körper dar. Dies im Gegensatz zur hier nicht weiter behandelten *dynamischen Apnoe* tief unter Wasser, bei der die pathophysiologische Problematik des stark erhöhten Umgebungsdrucks und der erhöhten Partialdrucke der gelösten Gase im Körper bei hohen Tiefen unter Wasser wesentlich zum Tragen kommt. Es ist vorweg anzumerken, dass



Abbildung 1
Apnoe unter Wasser mit Sitz- und Essgelegenheit.
Foto: Henriette Kissling, www.divepage.at

die regulatorischen Mechanismen im Körper recht komplexen mechanischen und neuronalen Zusammenhängen unterliegen [5].

Im vorliegenden Beitrag wollen wir zwischen zwei verschiedenen Fällen unterscheiden, die eine willentliche *statische Apnoe* einleiten können:

- der Atem kann entweder absichtlich und mühelos ohne einen ausgeprägten tiefen Atemzug vor der Apnoe angehalten werden oder
- der Apnoe können vorbereitende Atemübungen, Hyperventilation und/oder ein überdurchschnittlich tiefer Atemzug unmittelbar vor der Apnoe vorangehen.

Apnoe ohne vorangehenden tiefen Atemzug

Während der Apnoe erfährt der Thorax innere Druckschwankungen, die naturgemäß inspiratorischer Natur sind; d.h. der innere *intrathorakale* Druck wird tendenziell kleiner als der umgebende atmosphärische Druck. Somit steigt der Druckgradient zwischen den intrathorakalen venösen Gefäßen und peripheren venösen Gefäßen, die ja praktisch dem atmosphärischen Druck ausgesetzt sind. In der Folge füllt das venöse Blut verstärkt die intrathorakalen Gefäße. Die rechte Seite des Herzens (rechter Ventrikel)

wird somit stärker gefüllt und das *rechtsventrikuläre Schlagvolumen* steigt. Da das Herz insgesamt ein nahezu konstantes Volumen aufweist, müssen die linke Seite und das *linksventrikuläre Schlagvolumen* kleiner werden.

Die *Herzrate* sinkt tendenziell ein wenig ab, um einerseits den O_2 Verbrauch des Körpers während der Apnoe zu reduzieren (siehe Taucherreflex) und andererseits die diastolische Füllzeit des Herzens zu erhöhen¹. In der Folge wird der *Blutfluss* (Blutmenge pro Zeiteinheit) kleiner, da sich der Blutfluss als Produkt vom *linksventrikulären Schlagvolumen* und der *Herzrate* ergibt. Die Hauptverbraucher des arteriellen O_2 während einer Apnoe sind das Gehirn und die Herzmuskulatur, d.h., der Taucherreflex reduziert vor allem den O_2 Verbrauch im Herzen.

Währenddessen setzt die periphere *Vasokonstriktion* durch die aktive Einschnürung der peripheren arteriellen Gefäße ein, um den Gesamtbedarf von O_2 und somit den resultierenden O_2 Verbrauch weiter zu reduzieren. Diese Verengung der Gefäße soll auch als Schutzreaktion des Organismus gesehen werden, wodurch vorwiegend nur die lebenswichtigen Organe (z.B. Herz und Gehirn) mit Sauerstoff versorgt werden und die Durchblutung der weniger wichtigen Organe (z.B. Muskel und peripherer Körperteile) reduziert ausfällt², sprich, das *periphere Blutvolumen* sinkt. Die Einschnürung ist auf die Kontraktion der glatten Muskeln der peripheren Gefäße zurückzuführen.

Die *Vasokonstriktion* zentralisiert das Blut und erhöht den *zentral venösen Druck*, da ca. 80% des Gesamtblutes im venösen System verweilt. Folglich wird auch der *Pulmonalarteriendruck* massiv erhöht [5]. Der arterielle *Blutdruck*, z.B. seine systolischen und diastolischen Werte³, steigen während der Apnoe ebenfalls stetig an, wobei dieser Anstieg vorwiegend auf die besagte *Vasokonstriktion* während der Apnoe zurückzuführen ist. Die erhöhten Drücke erhöhen ihrerseits natürlich auch den aktuellen *Blut-*

1 Die reduzierte Herzrate bedeutet eine verlängerte Intervalldauer zwischen den einzelnen Herzschlägen und somit mehr Zeit für die Füllung der Ventrikel.

2 Die Reduktion der Herzrate im Zusammenhang mit der peripheren Vasokonstriktion während des Atemstillstandes wird als Taucherreflex bezeichnet. Übrigens fällt der Taucherreflex verstärkt aus, wenn das Gesicht in Kontakt mit kaltem Wasser steht, wobei Temperaturrezeptoren in den oberen Atemwegen aktiviert werden.

3 Der systolische Wert ist der höchste Blutdruckwert während einer Herzperiode, während der diastolische Wert der kleinste ist. Der systolische Wert steigt wesentlich mit dem linksventrikulären Schlagvolumen, während der diastolische Wert stark mit der einsetzenden Vasokonstriktion ansteigt.

fluss. Aufgrund der überdurchschnittlichen Herz- ausdehnung durch das zentralisierte Blut wie auch den Kältereiz im Gesichtsbereich, kann es sogar zu *Arrhythmien* im Herzen kommen. Der ansteigende *Blutdruck* aktiviert auch den *Baroreflex*, welcher dann die *Herzrate* weiter absinken lässt, um dem Blutdruckanstieg entgegenzuwirken [4].

Aufgrund des anhaltenden Metabolismus, sinkt die *Sauerstoffsättigung* des Blutes⁴ während der CO₂ Gehalt im Blut steigt. Die Luftzufuhr und daher die O₂ Zufuhr wie auch die CO₂ Abgabe sind ja unterbrochen. Bei zu geringen O₂ Werten, insbesondere bei zu hohen CO₂ Werten, wechselt der Körper vom Spar- in den Stressmodus, wobei die kumulierten O₂ und CO₂ Änderungen von der vergangenen Apnoezeit sowie die kumulierten psychischen und physischen Anstrengungen wesentlich mitbestimmend sind.

Der *Blutdruck* steigt weiterhin an, da die *periphere Vasokonstriktion* zunehmend stärker wird. In der Atemnot, beginnt die *Herzrate* stressbedingt zu steigen, der davon abhängige *Blutfluss* ebenfalls. Der sich ergebende tatsächliche Verlauf der *Herzrate* über die Apnoedauer ist eigentlich eine Kombination aus ihrem anfänglichen Abfall im Sinne des Taucher- reflexes und ihrem abschließenden Anstieg durch den ansteigenden Stress.

Gegen Ende der Apnoe setzen unwillkürliche Kon- traktionen des Zwerchfells ein, vorwiegend dem CO₂ Mangel folgend, die das Wiedereinsetzen der At- mung forcieren. Übernimmt nun der Atemdrang die Oberhand, beginnen sich - bereits nach dem ersten Atemzug der auf die Apnoe folgt - die physiologi- schen Parameter zu normalisieren.

Atemrate und -volumen nach der Apnoe fallen al- lerdings höher aus (Hyperventilation), da der be- stehende Mangel an O₂ rasch ausgeglichen wer- den muss. Auch die *periphere Durchblutung* fällt nach der Apnoe auch verstärkt aus, da der aktuell bestehende O₂ Mangel bzw. der CO₂ Überschuss in der Peripherie durch einsetzende verstärkte Durch- blutung kompensiert bzw. abgebaut werden muss. Die hiermit einsetzende *periphere Vasodilatation* bedingt auch einen Abfall im arteriellen *Blutdruck*. Die *Herzrate* ist dabei meist starken Schwankungen aufgrund der starken respiratorischen Brustkorbex- kursionen - welche ja mechanisch den venösen und folglich auch den arteriellen *Blutdruck* modulieren - in der Kombination mit dem *Baroreflex* unterworfen.

Apnoe mit vorangehendem tiefem Atemzug

Im Wesentlichen verläuft alles nach dem vorher dis- kutierten Schema. Zu unterscheiden ist allerdings die anfängliche Phase der Apnoe, da diese von einer Hyperventilationsphase und/oder der überdurch- schnittlichen anfänglichen Dehnung des Brutkorbes durch einen tiefen Atemzug wesentlich beeinflusst wird. Die Hyperventilation reduziert bekannterma- ßen CO₂ im Blut noch vor der Apnoe, während der gleichzeitige Anstieg in O₂ vernachlässigbar klein ausfällt (das Blut ist im Normalfall bereits fast voll- ständig mit O₂ gesättigt). Der vorwiegend durch den CO₂ Gehalt geregelte Atemdrang wird somit durch die Hyperventilation reduziert bzw. während der Apnoe hinausgezögert.

Wenn überdurchschnittlich viel Luft geholt wurde (tiefer Atemzug) und die Luft nun durch ein absicht- liches Verschließen der Atemwege angehalten wird, so steigt durch das nachfolgende Entspannen der Atemmuskulatur und dem Eigengewicht des Tho- raxes der *intrathorakale* Druck an. Dominierend ist dabei, dass die großen venösen Gefäße im Thorax komprimiert werden, da sie einerseits sehr nach- giebig sind und andererseits unter einem relativ geringen venösen Blutdruck stehen. Infolge dessen wird der venöse *Blutzufluss* zum Herzen, d.h. das *rechtsventrikuläre Schlagvolumen*, gedrosselt. Der *Blutzufluss* muss bekanntermaßen dem Blutabfluss im zeitlichen Mittel gleich sein, ansonsten würde das Herz oder der Herzlungenkreislauf das Blut kon- tinuierlich speichern und immer größer werden, was es bekanntlich nicht tut. Somit wird das *linksvent- rikuläre* Schlagvolumen des Herzens bei steigen- dem Druck im Thorax - im zeitlichen Mittel - auch zunehmend kleiner. Wenn dieses Schlagvolumen sinkt, muss auch der systolische *Blutdruck* sinken. Der sinkende Blutdruck alarmiert den Körperkreis- lauf und seine unmittelbare Reaktion besteht in der Anhebung der *Herzrate* durch den *Baroreflex*, um einen möglichst konstanten Blutfluss angesichts des reduzierten *Schlagvolumens* zu gewährleisten⁵.

4 Die Sauerstoffsättigung stellt den prozentuellen Anteil von mit Sauerstoff behaftetem Hämoglobin in den roten Blutkörperchen dar.

5 Das verminderte linksventrikuläre Schlagvolumen wird somit öfter in den Körperkreislauf geschickt, so dass die beförderte Blutmenge pro Zeiteinheit annähernd konstant bleibt.

Ähnliche Reaktionen - wie beim vorangehenden ausgeprägten Atemzug - sind auch bei dem sogenannten *Lung packing* zu beobachten, wobei bis zu 20% mehr an der *Vitalkapazität der Lunge* durch ein kraftvolles und mehrfach wiederholtes Hineinschlucken der Luft in die Lunge dazugewonnen werden kann [5]. Eine aufgeblähte Lunge bedeutet mehr Raum für das eingeatmete O_2 und das abzuatmende CO_2 , allerdings mit den Nachteilen und Gefahren eines stark erhöhten *intrathorakalen* Druckes und folglich eines stark reduzierten *Schlagvolumens*.

Es muss hier angemerkt werden, dass sich zu Beginn der Apnoe nach einer überdurchschnittlichen Lungenfüllung der bereits besprochene Abfall der Herzrate (im Sinne des Taucherreflexes) und der hier diskutierte Anstieg der Herzrate (im Sinne des erhöhten intrathorakalen Druckes) überlagern.

Minuten nach dem Ende der Apnoe, sobald sich der physiologische Zustand wieder normalisiert hat.

Der Fall der absichtlich und mühelos angehaltenen Atmung bei einem gesunden Probanden für etwa 60 Sekunden - ohne Hyperventilation und ohne einen tiefen Atemzug - ist in Abb. 3 dargestellt. Die Exkursionen des Brustkorbes (Abb. 3b), gemessen mit einem Gurtsensor⁶, sind erwartungsgemäß vor und nach der Apnoe erkennbar. Während des Atemstillstandes ist ein deutlicher Anstieg von systolischen und diastolischen Blutdruckwerten⁷ zu sehen (Abb. 3a). Nach der Apnoe normalisieren sich die Werte, wobei etwa 40 Sekunden nach der Apnoe geringfügig reduzierte Werte vorliegen. Das könnte auf die diskutierte überdurchschnittliche Erweiterung der peripheren Gefäße unmittelbar nach der Apnoe zurückgeführt werden.

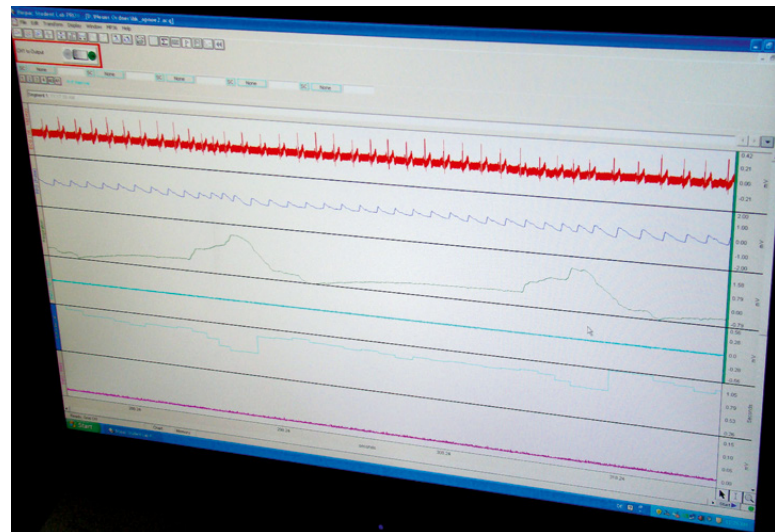
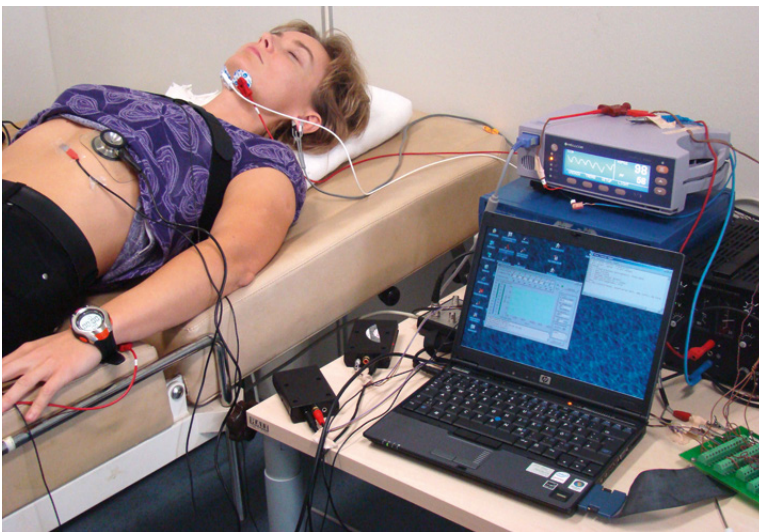


Abbildung 2

Erfassung physiologischer Parameter im Labor an der Technischen Universität Wien.

a) Die statische Apnoe wird simuliert. b) Synchroner Registrierung verschiedener physiologischer Parameter.

Foto: Eugen Kaniusas

Experimentelle Darstellungen

Das diskutierte physiologische Verhalten der willentlichen Apnoe lässt sich auch bildhaft darstellen, indem man mehrere physiologische Parameter synchron erfasst (Abb. 2). Dabei werden mehrere biomedizinische Sensoren am Körper angebracht und deren Messwerte synchron aufgezeichnet. Die Messung beginnt bei normaler Atmung, umfasst den willentlichen apnoischen Abschnitt und endet einige

6 Der Gurtsensor besteht aus einem dehnbaren Gurt an dem ein Drucksensor angebracht ist. Bei Ausdehnung des Brustkorbes spannt sich der Gurt, wobei gleichzeitig eine Kraft auf den Sensor ausgeübt wird. Das daraus resultierende dynamische Signal entspricht der respiratorischen Ausdehnung des Brustkorbes.

7 Der Blutdruck wurde mittels sogenannter „Volume-Clamp“ Methode erfasst [4]. Bei diesem Verfahren wird eine am Finger angebrachte Manschette verwendet, die so weit aufgeblasen wird, dass die Ausdehnung der arteriellen Gefäße im Finger über die kardielle Periode hinweg konstant gehalten wird. Der hierbei errechnete Druck in der Manschette entspricht dem aktuellen arteriellen Blutdruck in den arteriellen Gefäßen des Fingers.

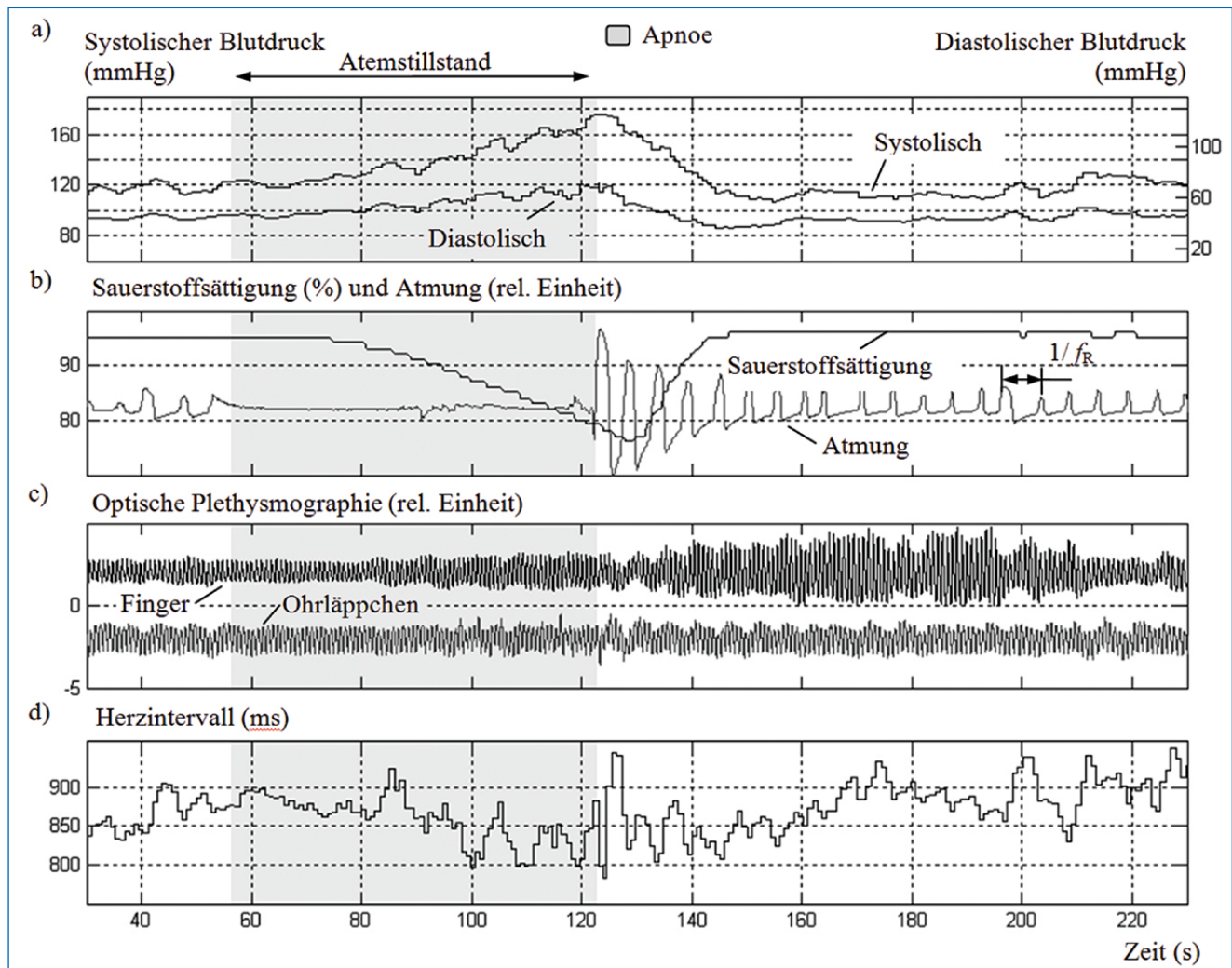


Abbildung 3

Angehaltene Atmung bei einem gesunden männlichen Probanden ohne vorangehenden tiefen Atemzug, dargestellt durch synchronisierten (a) systolischen und diastolischen Blutdruck, (b) Sauerstoffsättigung im Finger und respiratorische Expansion des Brustkorbes mit der Atemrate f_R , (c) optische Plethysmographie am Finger und Ohr läppchen, und (d) die Zeitintervalle zwischen zwei benachbarten Schlägen (umgekehrt proportional zur Herzrate).

Das Ausmaß der peripheren Durchblutung (und der dazugehörigen Gefäßerweiterung) ist anhand der optischen Plethysmogramme⁸ in Abb. 3c zu sehen. Das pulsierende periphere Blutvolumen im Finger sinkt etwas in der ersten Hälfte des Atemstillstands, während es nach der Apnoe deutlich ansteigt. Es ist zu beobachten, dass der letztere Anstieg am Blut-

volumen mit den temporär reduzierten systolischen und diastolischen Blutdruckwerten zusammenfällt. Im Gegensatz zu dem peripheren Blutvolumen im Finger, ändert sich jenes im Ohr läppchen kaum, da das Ohr läppchen deutlich zentraler im arteriellen Gefäßsystem liegt als der Finger.

⁸ Die optische Plethysmographie arbeitet hier mit einer am Finger angebrachten Infrarotlichtquelle und einem gegenüberliegenden Detektor, der die transmittierte Lichtintensität misst [1]. Da das Blut das Infrarotlicht deutlich stärker absorbiert als das umliegende Gewebe, wird die Transmission des Lichtes schwächer, sobald sich die Gefäßabschnitte zwischen der Lichtquelle und dem Detektor (mit jedem Pulsschlag) ausgedehnt und sich mit dem Blut gefüllt haben. Die pulsatile Änderung in der registrierten Lichtabsorption reflektiert folglich die gewünschte pulsatile Gefäßausdehnung.

Die Sauerstoffsättigung⁹ gemessen am Finger in Abb. 3b erfährt einen temporären Abfall ganze 20 Sekunden nach dem Anfang der Apnoe. Ähnlich verzögert verhält es sich mit der Normalisierung der Sauerstoffsättigung, welche erst ca. 30 Sekunden nach dem Ende der Apnoe abgeschlossen ist. Diese Verzögerungen sind auf eine relativ lange Distanz zwischen dem Messort, dem Finger, und den zentralen arteriellen Gefäßen in der Lungennähe, auf die limitierte Fließgeschwindigkeit des arteriellen Blutes wie auch auf die periphere Vasokonstriktion, welche ja den Blutaustausch in der Extremität wesentlich verlangsamt, zurückzuführen. Auch die methodische Mittelung der errechneten Sauerstoffsättigung im Pulsoximeter trägt zu dieser Verzögerung bei.

Im vorliegenden Messergebnis von Abb. 3d, steigt die Herzrate¹⁰ tendenziell während der Apnoe an und weist zudem markante Schwankungen gegen Ende der Apnoe auf. Diese Schwankungen wurden wahrscheinlich durch starke intrathorakale Druckänderungen verursacht. Nach dem Ende der Apnoe normalisiert sich die Herzrate wieder. Die respiratorische Arrhythmie ist deutlich im Verlauf der Herzrate zu beobachten, wie anschließend in Bezug auf Abb. 5 erörtert wird.

Abb. 4 veranschaulicht den Blutdruckverlauf vor und während der simulierten Apnoe. Neben dem bereits diskutierten Anstieg von systolischen und diastolischen Werten, ist eine respiratorische Modulation der systolischen Werte vor der Apnoe zu beobachten (Abb. 4a). Während der Einatmung sinkt der intrathorakale Druck und somit das linksventrikuläre Schlagvolumen. Dieses reduzierte Schlagvolumen vermindert folglich auch den systolischen Blutdruck. Somit ergibt sich eine Oszillation der systolischen Werte über jede respiratorische Phase hinweg.

In Abb. 5 sieht man den Verlauf der Herzrate vor, während und nach der Apnoe. Deutliche Oszillationen der Herzrate vor und nach der Apnoe sind offensichtlich, wie auch in Abb. 3d dargestellt. Die Herzrate steigt mit der Einatmung bzw. sinkt mit der Ausatmung um jeweils das verminderte bzw. vergrößerte linksventrikuläre Schlagvolumen zu kompensieren. Der eigentliche Zweck der dargestellten Herzratenvariabilität ist somit ein ausgeglichener Blutfluss. Zudem vergrößert sich die Austauschfläche für O_2 und CO_2 in der Lunge mit der fortschreitenden Einatmung, so dass es funktionell sinnvoll erscheint, die Herzrate während der Einatmung zu steigern, um so den momentanen Austausch von

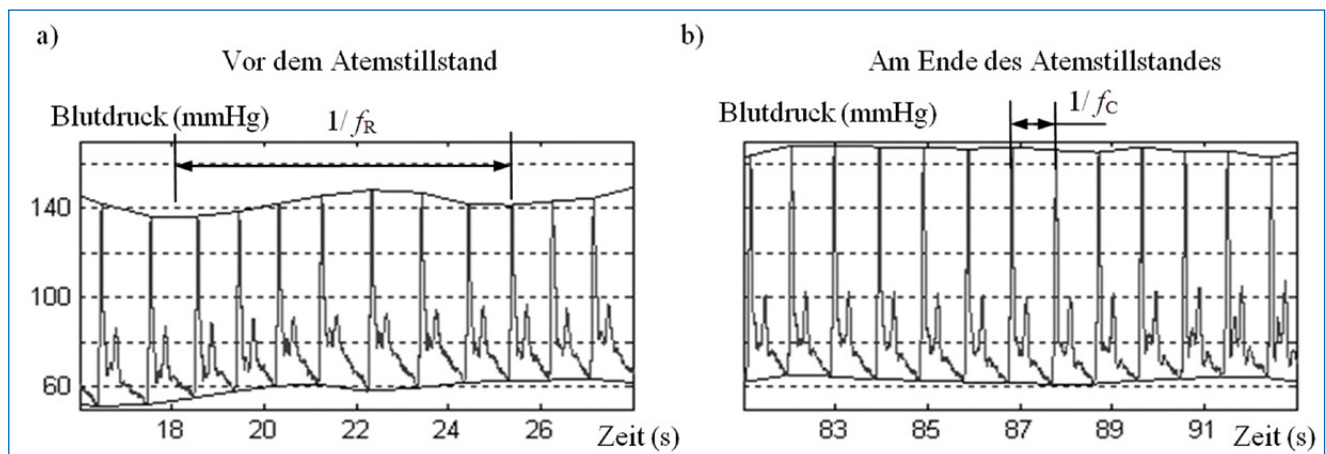


Abbildung 4

Blutdruck gemessen an einem gesunden männlichen Probanden. (a) Die periodische Blutdruckänderung mit der Herzrate f_c erfährt durch die periodische Atmung und die daraus resultierende Druckänderung im Thorax eine geringe Amplitudenmodulation mit der Atemrate f_R . (b) Gegen Ende der willentlichen Apnoe ist eine deutliche Steigerung des Blutdruckes erkennbar.

⁹ Die Sauerstoffsättigung wurde mittels Pulsoximetrie am Finger gemessen. Hierbei wird - wie bei der Plethysmographie⁸ - das Infrarotlicht kombiniert mit dem Rotlicht verwendet, um die sich ergebenden unterschiedlichen Intensitäten im transmittierten Licht beim Durchgang des pulsierenden arteriellen Blutes zu ermitteln. Der Sauerstoffgehalt lässt sich näherungsweise als Verhältnis der beiden resultierenden Lichtintensitäten errechnen.

¹⁰ Die Herzrate wurde aus dem Elektrokardiogramm durch die Detektion der einzelnen Herzschläge gemessen. Die resultierende zeitliche Differenz zwischen den benachbarten Herzschlägen ist umgekehrt proportional zur Herzrate. Das Elektrokardiogramm gibt - mit mehreren Flächenelektroden am Thorax gemessen - die elektrische Aktivität des Herzens wieder, welche die aufeinander derfolgenden Kontraktionen der beiden Herzmuskeln einleiten.

O₂ und CO₂ zu begünstigen. Während des Atemstillstands (Abb. 5), fehlt die respiratorische Auswirkung auf das Schlagvolumen und daher auch die respiratorisch bedingte Herzratenvariabilität.

Eine längere Apnoe von etwa 4 Minuten - gehalten durch eine professionelle Taucherin - ist in Abb. 6 anhand von verschiedenen physiologischen Parametern dargestellt. Im Gegensatz zur relativ kurzen willentlichen Apnoe in Abb. 3, wurde der apnoische Abschnitt hier durch einen tiefen Atemzug ohne vorangehende Hyperventilation eingeleitet. Am Anfang der Apnoe sinkt der Blutdruck vorübergehend, begleitet von einem gleichzeitigen Anstieg in der Herzrate; siehe die Markierung I in Abb. 6a und 6e. Deutliche Exkursionen des Brustkorbes sind in der zweiten Hälfte der Apnoe als Atemreize zu erkennen, welche durch aufeinanderfolgende Zwerchfellkontraktionen

und somit den oszillierenden intrathorakalen Druck verursacht werden; siehe die Markierung II in Abb. 6b. Sinngemäß folgen der Blutdruck und die Herzrate diesen abrupten Änderungen des intrathorakalen Drucks.

Ferner ist auch die Muskelaktivität¹¹ in Abb. 6 abgebildet, deren Pegel vor allem in der zweiten Hälfte der Apnoe atemreizbedingt ansteigt und somit den ansteigende Stress im Körper reflektiert; siehe die Markierung III in Abb. 6c. Das periphere Blutvolumen, verglichen zur Ruhephase vor der Apnoe, fällt in der apnoischen Zeit deutlich reduziert aus. Demgegenüber ist ein überdurchschnittlicher Anstieg der peripheren Durchblutung nach dem Ende der Apnoe zu verzeichnen (vergleiche Abb. 3c), bedingt durch den vorangegangenen O₂ Mangel und CO₂ Überschuss im Gewebe.

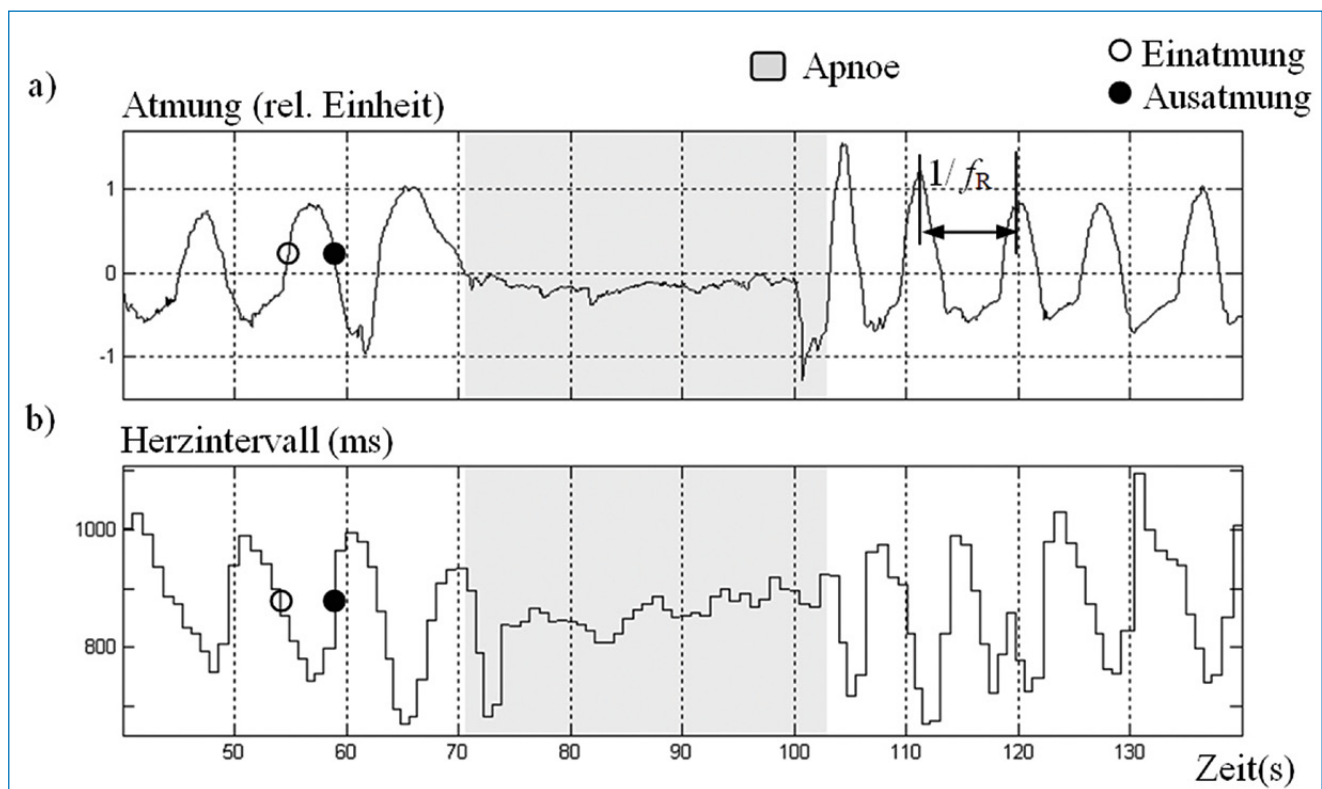
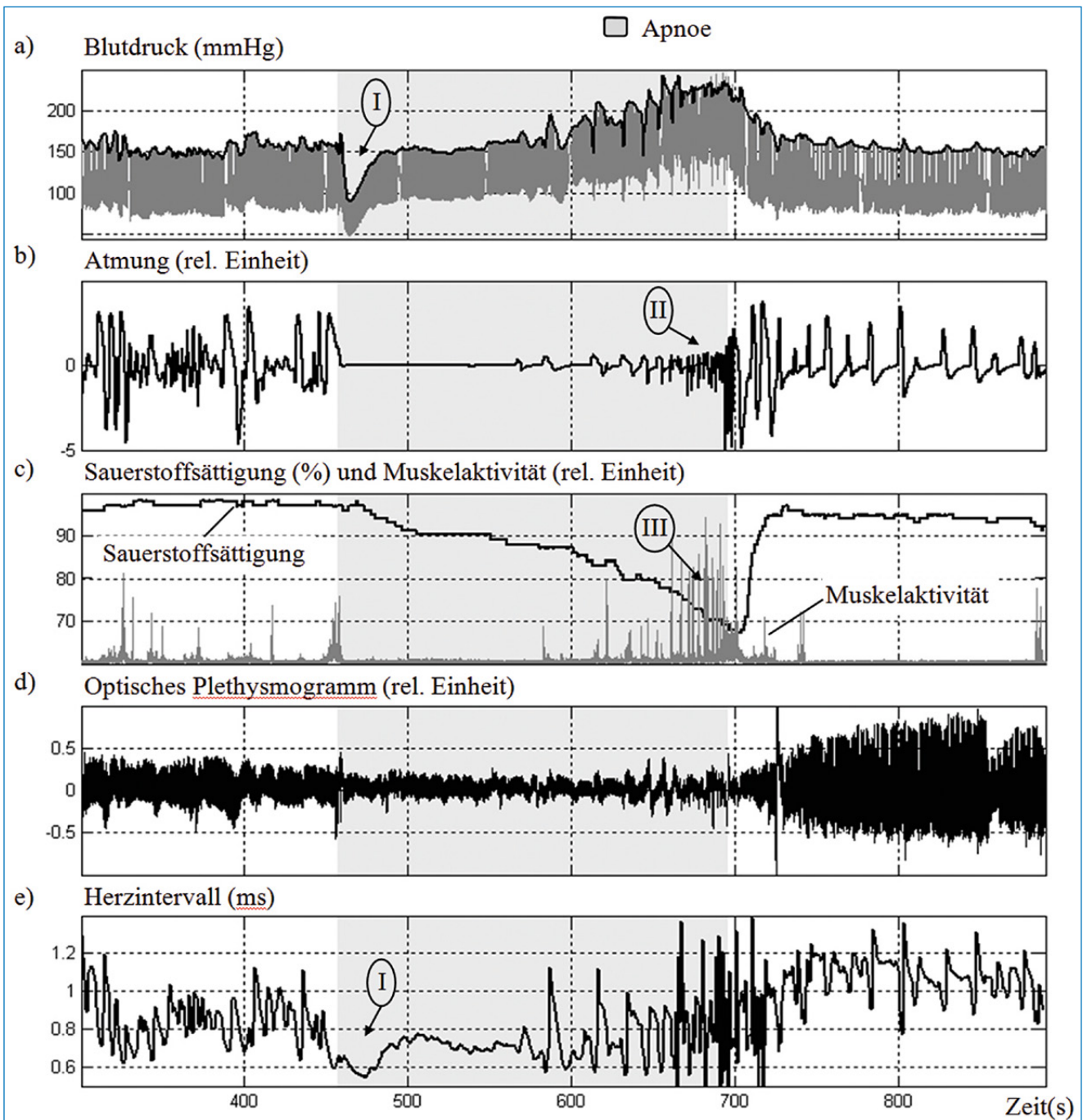


Abbildung 5

Herzratenvariabilität einer gesunden weiblichen Probandin bei normaler Atmung und einem temporären Atemstillstand. (a) Die Expansion des Brustkorbes mit der Atemrate f_R und (b) die synchron aufgenommenen Zeitintervalle zwischen benachbarten Herzschlägen (umgekehrt proportional zur Herzrate).

¹¹ Die Muskelaktivität wurde mittels Elektromyographie mit Flächenelektroden im Kinnbereich erfasst. Dieses Verfahren funktioniert ähnlich wie die Elektrokardiographie¹⁰, mit dem Unterschied dass die elektrische Aktivität der Skelettmuskeln und somit ihre Anspannung registriert wird.

**Abbildung 6**

Multiparametrische Apnoeaufnahme einer professionellen Taucherin, inklusive eines tiefen Atemzuges vor der Apnoe. a) Temporärer Abfall des Blutdruckes (markiert als I) gefolgt durch einen deutlichen Anstieg und periodische Druckschwankungen. b) Respiratorische Expansion des Brustkorbes. Gegen Ende der Apnoe, kurz vor Wiedereinsetzen der Atmung, kommt es zu heftigen respiratorischen Kontraktionen (II). c) Die stressbedingt erhöhte Muskelanspannung (III) gegen Ende der Apnoe, korrespondierend mit der Abnahme der Sauerstoffsättigung im Finger. d) Optische Plethysmographie am Finger. Die Gefäße ziehen sich während der Apnoe zusammen und werden anschließend stark erweitert bzw. durchblutet. e) Zeitintervalle zwischen benachbarten Schlägen (umgekehrt proportional zur Herzrate).

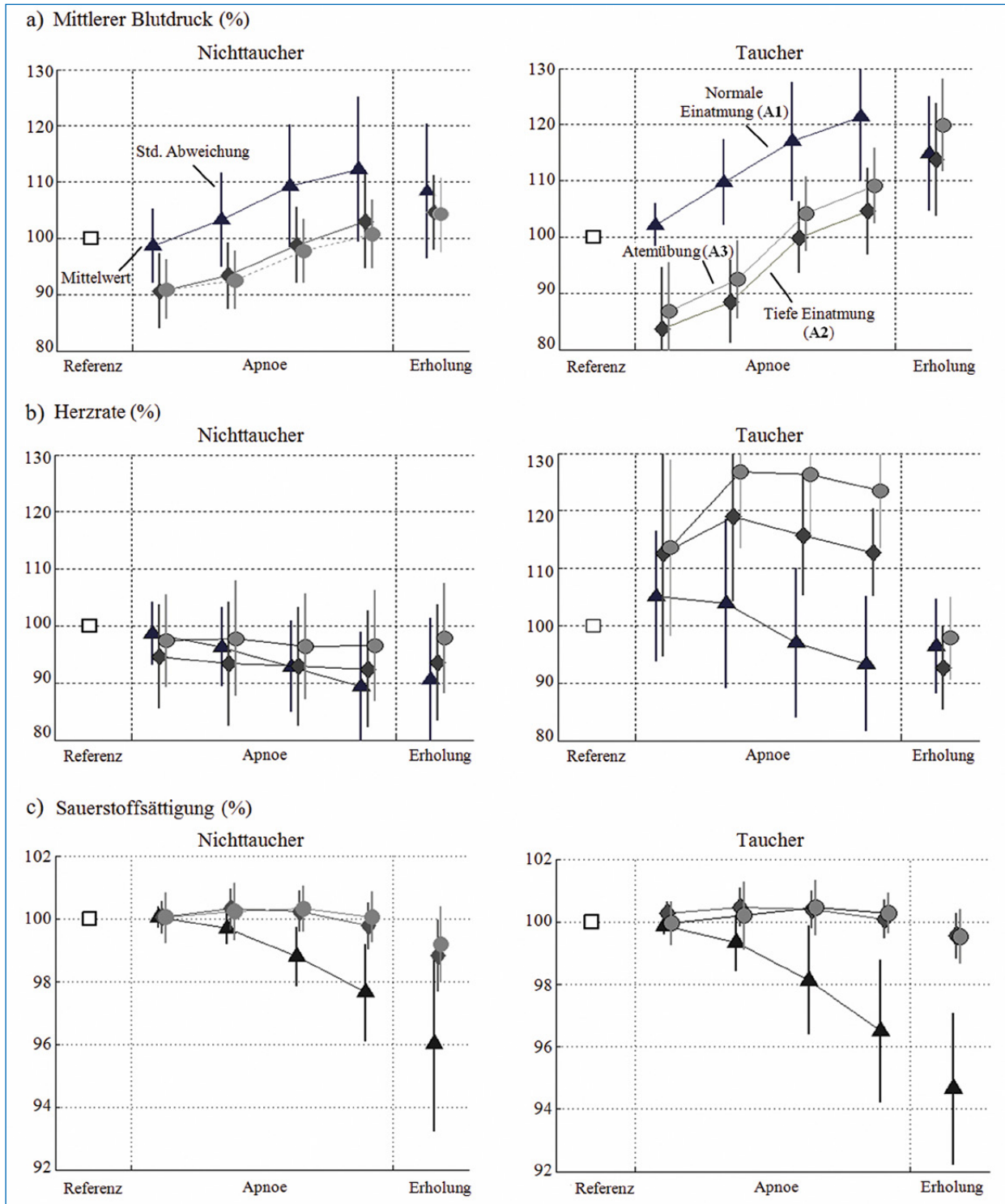


Abbildung 7

Normierte 45 Sekunden Apnoe und deren Auswirkung auf (a) den relativen mittleren arteriellen Blutdruck, (b) die relative Herzrate und (c) die relative Sauerstoffsättigung in Anlehnung an [8]. Verschiedene Vorbereitungsphasen vor der Apnoe werden dabei unterschieden, wie normale Atmung, tiefe Einatmung und eine einfache Atemübung vor tiefer Einatmung.

Forschungsthemen

Die Forschungsgruppe Biomedizinische Sensorik an der Technischen Universität Wien (Leiter Ao.Univ. Prof. Eugenijus Kaniusas) verfügt unter anderem über eine jahrzehntelange Erfahrung im Bereich der Schlafapnoe [6] und über fortschrittliche Analyseverfahren hybrider Biosignale [7]. Somit war es naheliegend den Forschungsfokus der Gruppe von der unwillentlichen zur willentlichen Apnoe auszudehnen, in dessen Folge es zu einer Reihe von interessanten Kooperationen in der österreichischen Taucherszene und zu etlichen peer-begutachteten wissenschaftlichen Publikationen kam. Nachstehend soll ein sehr kurzer Überblick über die publizierten Arbeiten aus dem Bereich der statischen Apnoe gegeben werden.

Eine initiale Publikation [2] der Gruppe veranschaulicht die körperliche Reaktion auf die willentliche Apnoe, die einerseits mit dem Ende der normalen Inspiration und andererseits mit dem Ende der normalen Expiration eingeleitet wurde. Unterschiede in der Blutdruck- und Herzrateänderung während der Apnoe, der Ausprägung der peripheren Vasokonstriktion, und in der resultierenden Apnoedauer wurden aufgezeigt.

Die Effekte der unterschiedlichen Vorbereitungsphasen bevor der Atem tatsächlich angehalten wurde waren der Gegenstand einer weiteren Forschungsarbeit bei professionellen Apnoetauchern und Nichttauchern [8]. Drei verschiedene Vorbereitungsphasen - normale Einatmung (A1), tiefe Einatmung (A2) und eine einfache Atemübung vor tiefer Einatmung (A3) - wurden in Bezug auf eine nachfolgende normierte Apnoe von 45 Sekunden untersucht. Ein Auszug der Ergebnisse ist in Abb. 7 dargestellt.

Bei Tauchern scheint der Blutdruck stärker zu steigen als bei Nichttauchern (Abb. 7a), was auf eine stärkere Vasokonstriktion und somit auf einen stärkeren Taucherreflex hinweisen könnte. Die größten Anstiege im Blutdruck sind bei A1 zu beobachten. Das beobachtete Absinken von Blutdruckwerten zu Beginn der Apnoe - nur bei A2 und A3 laut Abb. 7a - sind auf den diskutierten Anstieg des intrathorakalen Druckes beim letzten tiefen Atemzug zurückzuführen. Der letztere Abfall dominiert bei Tauchern, was wahrscheinlich durch deren höhere vitale Lungenkapazität erklärt werden kann.

Die Herzrate senkt sich regulatorisch am stärksten bei A1, was die Schwere der betreffenden Apnoe demonstriert (Abb. 7b). Die größte Änderung der Herzrate ist bei Tauchern und A1 zu beobachten ist, was auch auf die starke Ausprägung des Taucherreflexes hindeutet. Im Gegensatz zu Nichttauchern, steigt die Herzrate bei Tauchern während der Apnoe und sinkt dann anschließend, allerdings nur bei A2 und A3 (Abb. 7b), was auf den kompensatorischen Effekt der Herzrate in Bezug auf den reduzierten Blutdruck zwecks Aufrechterhaltung eines möglichst konstanten Blutflusses hinweisen könnte. Abb. 7c zeigt eine starke Belastung des Körpers durch A1, da die entsprechende Entsättigung während dieser kurzen Apnoe am deutlichsten ausfällt.

Der körperschonende und regulatorische Taucherreflex bei Nichttauchern scheint dabei umso stärker ausgeprägt zu sein, je ungünstiger die Vorbereitungsphase bzw. je größer die Körperbelastung während der Apnoe war; d.h. die stärkste Ausprägung bei A1, die geringste bei A3. Bei professionellen Tauchern tendiert der Taucherreflex stärker als bei Nichttauchern zu sein. Überraschenderweise sind aber die Unterschiede zwischen Tauchern und Nichttauchern weniger markant bei A1. Auch subjektiv wurden die A1 Apnoen von den beiden Gruppen als belastend empfunden; vergleiche die jeweiligen annähernd gleichen Entsättigungen in Abb. 7c.

Daher suggeriert diese kleine Studie einen spannenden Schluss: vorbereitungsfreie Apnoen (A1) führen bei untersuchten Athleten, im Vergleich zu Nichttauchern, zur annähernd gleichen physiologischen Belastung. Anders ausgedrückt, extreme Leistungen erfordern unbedingt eine entsprechende Vorbereitung unmittelbar vor der Apnoe. Dieses interessante Teilergebnis muss allerdings noch statistisch validiert werden.

Eine Folgestudie [9] untersuchte den Einfluss von den drei obigen Vorbereitungsphasen (d.h. von der Schwere der Apnoe) auf den O_2 Verbrauch und die CO_2 Produktion im Körper während einer normierten 45 Sekunden Apnoe und einer Apnoe mit Maximaldauer. Interessanterweise verringerte sich der O_2 Verbrauch pro Apnoedauer wie auch die CO_2 Produktion pro Apnoedauer (gemessen in ein- und ausgeatmeter Luft) mit steigender Apnoedauer und mit der günstiger werdenden Vorbereitungsphase. Diverse Gasparameter in ein- und ausgeatmeter Luft wie auch kardiovaskuläre Parameter wurden als

Funktion der Apnoedauer bei einem kontrolliertem Atemvolumen in [10] aufgezeigt. Dabei wurde die Reproduzierbarkeit der obigen Parameter an verschiedenen Tagen und bei verschiedenen Apnoedauern untersucht.

Schlusswort

Die dargestellten Zusammenhänge sind exemplarisch gewählt worden, sie können von Fall zu Fall variieren, da jeder Mensch individuell auf einen provozierten willentlichen Atemstillstand reagiert. Dabei spielen physische wie auch geistige Vorbereitung - langfristig wie auch kurzfristig vor der Leistungserbringung - und Erfahrung im Atemanhalten eine ausschlaggebende Rolle. Nichtsdestotrotz sind die diskutierten physiologischen Zusammenhänge maßgeblich und bestimmend, während ihre individuelle Ausprägung und Dominanz unterschiedlich sind.

Referenzen

- [1] E. Kaniusas: Biomedical Signals and Sensors II. Springer Publisher, 217 pages (2015).
- [2] F. Thürk, S. Traxler, E. Kaniusas: Cardiovascular response to static apneas. Proceedings of IEEE International Symposium on Medical Measurements and Applications (MeMeA), 217-220 (2011).
- [3] E. Schagatay, M. van Kampen, S. Emanuelson, B. Holm: Effects of physical and apnea training on apneic time and the diving response in humans. Eur J Appl Physiol 82, 161-169 2000.
- [4] E. Kaniusas: Biomedical Signals and Sensors I. Springer Publisher, 296 pages (2012).
- [5] P. Lindholm, C.E. Lundgren: The physiology and pathophysiology of human breath-hold diving. J. Appl. Physiol 106, 284-292 (2009).
- [6] E.Kaniusas: Acoustical fingerprints of apneas - their properties and clinical relevance. Invited chapter contribution to "Sleep apnea syndrome: Research trends", Ed. Andrew O. Lang, Nova Science Publishers, 65-105 (2007).
- [7] F. Thürk, S. Kampusch, E. Kaniusas: Strategic framework for management of hybrid biosignals from study design to statistics. Proceedings of IEEE Sensors Applications Symposium, 1-5 (2015).
- [8] F. Thürk, E. Kaniusas: Physiological unbalance during dry static apneas: effects of preceding preparations. Proceedings of IEEE International Symposium on Medical Measurements and Applications (MeMeA), 151-155 (2013).
- [9] F. Thürk, E. Kaniusas: Effects of preceding preparation in breath-hold divers: gas analysis in expired air and blood. Proceedings of 17th International Conference on Biomedical Engineering, 4-8 (2013).
- [10] F. Thürk, O. Gindlhumer, E. Kaniusas: Reproducibility of cardiovascular and gas parameters in voluntary apnea related to apnea duration. Proceedings of IEEE International Symposium on Medical Measurements and Applications (MeMeA), 424-428 (2014).



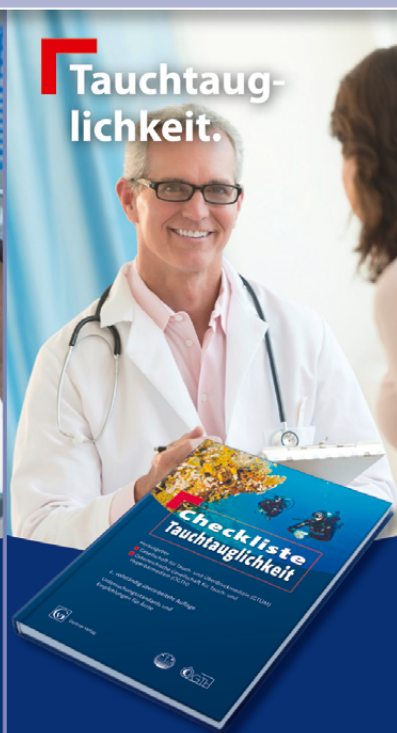
Standardwerk.

Ch. Klingmann
K. Tetzlaff (Hrsg.)

Moderne Tauchmedizin

■ Handbuch für Tauchlehrer, Taucher und Ärzte

2. vollständige überarbeitete Auflage 2012
ISBN 978-3-87247-744-6
Gebunden, 844 Seiten, fünffarbig
€ 65,- ; sFr 80,-



Tauchtauglichkeit.

Gesellschaft für Tauch- und Überdruckmedizin (GTÜM)
Österreichische Gesellschaft für Tauch- und Hyperbarmedizin (ÖGTH) (Hrsg.)

Checkliste Tauchtauglichkeit

■ Untersuchungsstandards und Empfehlungen der Gesellschaft für Tauch- und Überdruckmedizin (GTÜM) und der Österreichischen Gesellschaft für Tauch- und Hyperbarmedizin (ÖGTH)

2., vollständig überarbeitete Auflage 2014
ISBN 978-3-87247-747-7
Gebunden, 384 Seiten
€ 40,- ; sFr 50,-



Management.

Mirko Obermann
Andreas Häckler
Nicole Kiefhaber (Hrsg.)

Modernes Tauchbasenmanagement

■ Handbuch für Tauchschulen Tauchbasen nach ISO 24803

1. Auflage 2012
ISBN 978-3-87247-732-3
Gebunden, 496 Seiten, vierfarbig
€ 49,- ; sFr 60,-



Rettungsplan Tauchunfall.

Hubertus Bartmann
Claus-Martin Muth (Hrsg.)

Notfallmanager Tauchunfall

■ Praxishandbuch für Taucher Tauchmediziner Rettungsdienste

4. vollst. überarbeitete Auflage 2012
ISBN 978-3-87247-746-0
Gebunden, Taschenbuchformat vierfarbig, 456 Seiten,
Preis € 40,- ; sFr 50,-

**Grundlagen – Vorbeugung – Diagnose – Therapie
Management – Ausrüstung – Rettung**



Gentner Verlag

Gentner Verlag • Buchservice Medizin

Postfach 101742 • 70015 Stuttgart

Tel. 0711/63672-857 • Fax 0711/63672-735

buch@gentner.de • www.asu-arbeitsmedizin.com/buecher • www.tauchmed.com

Mehr Informationen
und versandkostenfrei
online bestellen:



Neutrophile generieren Mikropartikel

während der Exposition gegenüber Inertgas aufgrund von
zytoskelettalem oxidativem Stress

Neutrophils Generate Microparticles during Exposure to
Inert Gases Due to Cytoskeletal Oxidative Stress



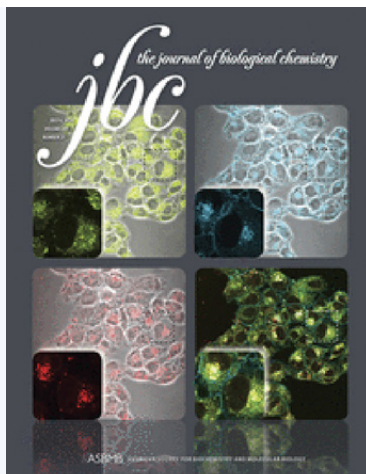
AUTOR

Stephen R. Thom
Abteilung für
Notfallmedizin
Universität Maryland

Baltimore, Maryland
21201, USA
Email:
sthom@smail.umaryland.edu

Stephen R. Thom, Veena M. Bhopale und Ming Yang
Abteilung für Notfallmedizin, Universität Maryland,
Baltimore, USA

J. Biol. Chem., veröffentlicht online am 27. Mai 2014
(M113.543702)



Dieser Artikel wurde erstveröffentlicht in

The Journal of Biological Chemistry

Stephen R. Thom, Veena M. Bhopale, and Ming Yang. Neutrophils Generate Microparticles during Exposure to Inert Gases Due to Cytoskeletal Oxidative Stress. J. Biol. Chem. 2014 289: 18831-18845. First Published on May 27, 2014, doi:10.1074/jbc.M113.543702

Der Original-Artikel kann kostenlos unter folgendem Link heruntergeladen werden. Auf der Zielseite finden Sie den Artikel mit Download-Link links unten an vierter Stelle (ggf. etwas scrollen): <http://www.jbc.org/content/289/27.toc>



Schlüsselwörter

Sauerstoffradikale, S-Nitrosylierung, reaktive Stickstoffspezies, O₂-Singulett, Dekompression, NADPH-Oxidase, fokale Adhäsionskinase, Actinfilamente

Hintergrund

Mikropartikel werden in vivo unter Druckexposition gebildet, wobei der Mechanismus unklar ist

Ergebnis

Hoher Inertgasdruck verursacht die Bildung von Sauerstoffradikalen, die wiederum eine S-Nitrosylierung von Proteinen sowie die Aktivierung der Nitritoxid-Synthase-2 und der NADPH-Oxidase verursachen. Dies führt zur Bildung von Mikropartikeln.

Schlußfolgerung

Inertgas-induzierter oxidativer Stress führt zur Bildung von Mikropartikeln.

Bedeutung

Dieser Mechanismus könnte zur Entstehung der Dekompressionserkrankung beitragen.

Ziel dieser Untersuchung war der Entstehungsmechanismus von Mikropartikeln (MPs), der durch die Exposition gegenüber hohen Inertgasdrücken getriggert wird. Humane Neutrophile generieren MPs ab einem Wert von ca. 186 kPa und einer Expositionsdauer von 30 Minuten oder mehr. Murine Zellen verhalten sich gleich, aber ihre MP-Bildung verläuft langsamer und hält für ca. 4 Stunden an, egal ob die Zellen unter Druck bleiben oder nicht. Neutrophile unter erhöhten Gasdrücken – aber nicht hydrostatischem Druck – produzieren MPs in folgender Potenzreihe: Argon ~ Stickstoff > Helium. Die Aktivierung der Typ-2 Nitritoxidase ((NOS-2) und der NADPH-Oxidase (NOX) verläuft nach dem gleichen Schema. Die Produktion von Mikropartikeln entsteht nicht, wenn die Neutrophilen einem NOX-Inhibitor (Nox2ds) oder einem NOS-2-Inhibitor (1400W) ausgesetzt sind oder wenn es Mäusezellen ohne NOS-2 sind. Reaktive Spezies verursachen die S-Nitrosylierung von zytosolischem Aktin, hierdurch wird die Aktinpolymerisation verstärkt. Studien mit Proteinquervernetzung und Immunoprecipitation zeigen, daß eine vermehrte Aktinpolymerisation aufgrund von Vorgängen entsteht, die vasodilatator-stimulierte Phosphoproteine, fokale Adhäsionskinase, H⁺/K⁺-ATPase (Flippase), den multidrug-resistance Protein-ABC-Transporter der hämatopoetischen Zellen (Floppase) sowie die

Protein-Disulfid-Isomerase in Nähe der kurzen Aktinfilamente mit einschließen.

Chemische Inhibition oder Reduktion der intrazellulären Konzentration dieser Proteine mittels inhibitorischer RNA verhindert die NOS-2-Aktivierung, die Bildung von reaktiven Spezies, die Aktinpolymerisation und die MP-Produktion. Dies wurde ebenfalls durch die Exposition von Zellen mit UV-Licht verhindert, die die S-nitrosylierten Reaktionen an Cystein umkehrt. Gleiches kann mittels Ko-Inkubation mit dem Antioxidant Ebselen oder mit Cytochalasin D erreicht werden. Der autokatalytische Zyklus der Proteinaktivierung wird nach Inertgasexposition durch Sauerstoffradikale initiiert.

Einleitung

Diese Untersuchung soll das Verständnis der Pathophysiologie der Dekompressionserkrankung (DCS) verbessern. DCS ist ein systemischer pathophysiologischer Prozess der entsteht, wenn Gewebe mit Stickstoff oder anderem Gas supersaturiert wird, die in Atemgasmischungen verwendet werden - z.B. beim Tiefseetauchen, Flügen in großen Höhen und bei Raumspaziergängen. Zirkulierende Mikropartikel (MPs) sind von einer Membran umschlossene Zellfragmente mit Durchmessern von 0,1 bis 1 µm. Sie sind in Menschen und Tieren nach simulierten oder echten Tauchgängen erhöht (1-5). In einem murinen Modell initiierten MPs nach Dekompression einen systemischen inflammatorischen Prozeß, der der Aktivierung von Neutrophilen gleicht (6-9). Gleiche Verletzungen wie in dekomprimierten Tieren kann durch die Injektion von Dekompressions-assoziierten MPs in native Mäuse hervorgerufen werden. Die Resultate dieser Studien sowie mehrere Untersuchungen mit menschlichen Tauchern führten zu der Hypothese daß die Produktion von MPs durch Druckexposition hervorgerufen wird und nicht nur eine Folge der Dekompression darstellt.

Es gibt drei Gründe, warum MP gebildet werden: oxidativer Stress, Apoptose und Zellaktivierung / Ca²⁺-Influx (10-12). Weitgehend akzeptiert ist die Annahme, das MPs entstehen, wenn die normalerweise asymmetrische Verteilung von Lipiden in der inneren und äußeren Schicht der Plasmamembran verloren geht (13). Die Verteilung dieser Lipide wird durch zwei Enzymklassen reguliert: die Aminophospholipid-Translokasen „Flippasen“ (lipid-selektive P-Typ ATPasen die die Einwärtsbewegung der Aminophospholipide katalysieren) sowie die „Floppasen“, eine Subgruppe von ATP-abhängigen ABC-Lipidtransporter

tern zur Katalysierung der Auswärtsbewegung der Lipide. Zudem gibt es noch unspezifische bidirektionale „Scramblasen“, calciumabhängige und ATP-unabhängige Enzyme zur Steuerung der beidseitigen Bewegungen in Abhängigkeit der Konzentrationsgradienten. Eine Proteolyse des Aktinzytoskeletts entsteht in Zusammenhang mit Veränderungen dieser Transportenzyme (13). Die präzise Rolle der zytoskelettalen Modifikationen ist bisher nur schlecht verstanden, aber eine Instabilität des Zytoskeletts stellt eine Triggerung der MP-Bildung (14) dar.

Aufgrund der zentralen Rolle der Neutrophilen in der Pathophysiologie der Dekompression untersuchten wir die MP-Produktion in isolierten neutrophilen Zellen, die erhöhten Partialdrücken verschiedener Gase ausgesetzt waren. Die Ergebnisse suggerieren, daß die Zellen auf oxidativen Stress reagierten. Inertgase verstärken die Produktion von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS) (15-18). Dies geschieht aufgrund einer transienten Veränderung der Elektronendichte von den äußeren Molekularorbitalen zu den π -Orbitalen des O_2 (15,16). Inertgase können oxidativen Stress in einzelligen Organismen hervorrufen und verstärken unter bestimmten Umständen die O_2 -Toxizität in Tieren (19-23).

Menschliche und murine Neutrophile zeigen ähnliche Antworten auf hohe Gasdrücke, aber murine Zellen zeigen eine persistierende MP-Produktion sogar nach der Dekompression. Dies bot eine Gelegenheit für eine detailliertere Analyse der zugrundeliegenden Mechanismen, da post-Expositions-Untersuchungen durchgeführt werden konnten und da effiziente Methoden zur Reduktion von intrazellulären Proteinen in murinen Zellen mit Hilfe von inhibitorischen RNAs existieren (24-26).

Aktuelle Studien an Mäusen haben den besonderen Stellenwert der induzierbaren / inflammatorischen oder Typ-2-NOS (NOS-2 oder iNOS) in dekompressions-induzierter Neutrophilen-Aktivierung gezeigt (3, 4, 6-9). Die Erhöhung der MP-Rate ist niedriger und es kommen weniger Fälle von DCS in Mäusen vor, wenn diese einen spezifischen iNOS-Inhibitor injiziert bekamen (1400W, N-3-(aminomethyl)-benzyl-Azetamine) oder es Knock-out Mäuse ohne iNOS waren (7). Es gibt starke Hinweise für die Aktivierung von NOS-Isoformen durch Inertgase. Helium mit einem Druck von 71kPa verursacht eine kardiale Präkonditionierung in Kaninchen aufgrund einer Aktivierung der endothelialen NOS (NOS-3) und Exposition bei 700kPa aktiviert die iNOS in Mäusen (27,28).

Ein verstärkter Umsatz von Aktin hat eine Aktivierung von iNOS in Neutrophilen zur Folge (26). Dies ist eine Antwort auf oxidativen Stress, wenn die Zellen einem hohen Sauerstoffpartialdruck ausgesetzt wurden. Die erhöhte Produktion von Radikalen verursacht die S-Nitrosylierung von zytosolischem Aktin (SNO-Aktin) (29). Das vasodilator-stimulated Phosphoprotein (VASP) hat eine höhere Affinität zu SNO-Aktin und verstärkt dann seinerseits die Aktinpolymerisierung (24). VASP scheint zudem die Bausteine Rac1, Rac2, PKA und PKG (AMP- und GMP-abhängige Proteinkinasen) zusammen mit kurzen Aktinfilamenten zusammen zu bringen. Der erhöhte Aktinumsatz verstärkt zudem wiederum die Vernetzung von FAK (fokal adhesion kinase), und eine FAK-unterstützte Aktin-Dimerbildung erhöht die iNOS-Aktivität (25).

Das Ziel der vorliegenden Studie war die Untersuchung der MP-Bildung in Neutrophilen unter hohen Partialdrücken von Stickstoff oder Edelgasen. Zu betonen ist hierbei die Tatsache, daß der Sauerstoffpartialdruck nicht höher war wie in normaler Raumluft. Die Bildung von MPs in humanen und murinen Neutrophilen entsteht, wenn diese Zellen erhöhten Inertgasdrücken ausgesetzt sind. Hier kommt es zu einer Enzymaktivierung, die mit der Entstehung von reaktiven Spezies und Aktinveränderungen vergesellschaftet ist.

Material und Methoden

Material

Chemikalien wurden wenn nicht anderes angegeben von Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) gekauft. Die Druckgase kamen von Air Products and Chemicals, Inc. (Allentown, PA). Ein NADPH-Oxidase-Inhibitor, Nox2ds, inhibiert selektiv die Interaktion zwischen Nox2 und p47^{phox} und hat die Sequenz NH_3 -CSTRVRR-QL-CONH₂. Dieses Protein sowie eine Scrm-b-Nox2ds (Kontrollpeptid mit der Sequenz NH_3 -CLRVTRQSR-CONH₂) wurden beide von der American Peptid Company (Sunnydale, CA) erworben (30). Ein Rac-Inhibitor (N-3-(aminomethyl)-benzyl-acetamine (NSC 237669); ein FAK-Inhibitor (PF573228; 3,4-Dihydro-6-[[4-[[[3-(methylsulfonyl)phenyl]methyl]amino-5-(trifluoromethyl)-2-pyrimidinyl]amino]-2(1H)-quinolinone]; ein MRP-1-Inhibitor (MK571; „Floppase-Inhibitor“; 3-[[[3-[(1E)-2-(7-Chloro-2-quinolinyl)-ethenyl]-]phenyl]-[[3-dimethylamino]-3-oxopropyl]-thio]-methyl]-thio]-Propansäure); ein H^+/K^+ -ATPase-Inhibitor („Flippase-Inhibitor“);

SCH28080 (2-Methyl-8-(phenylmethoxy)-imidazol-[1,2-a]-pyridin-3-acetonitril) und ein Proteindisulfid-Isomerase-Inhibitor (Quercetin-3-rutinosid) wurden bei Tocris Bioscience (Ellisville, MO) gekauft. N-[6-(biotinamido)-hexyl]-3`-(2-pyridyldithio)-propionamide und Streptavidinagarose wurden von Thermo/Fisher Scientific erstanden. Ultrafree-MC-Filter, PVDF Immobilon-FL und ZipTipC₁₈P10 wurden bei Millicorp gekauft. Antikörper gegen Aktin für Western Blot- und Immunoprecipitation-Untersuchungen waren ebenfalls von Thermo/Fisher. Die iNOS-Dimer-Assays bei Santa Cruz Biotechnology, CA. Biotin-Antikörper bei Sigma. Anti-VASP, anti-FAK und Anti-PDI sowie Annexin-V-conjugated APC und Annexinbindungs-puffer-Lösung kamen von BD Pharmingen (San José, CA.). Small inhibitory RNA-Sequenzen (siRNA) wurden bei Santa Cruz Biotechnology erstanden. Dies beinhaltete auch eine Kontrollsequenz-RNA ohne Auswirkung auf jede bekannte zelluläre RNA (UUCUCCGAACGUGUCACCGU). FAK-siRNA beinhaltet drei Stränge. Strang A (GCAUCCUGAAUUCUUUGA), Strang B (CCAGUACUCAAACAGUGAA) und Strang C (CGACCAGGGAUUAUGAGAU). VASP-siRNA besitzt ebenfalls drei Stränge. Strang A (GGGGUGUCAAAGUACAAUCA), Strang B (CCACUCCCAUCUCCAUCA) und Strang C (GAGUGAACUGUGAGAAGA). MRP-1-siRNA ist ein Pool aus drei verschiedenen RNA-Doppelhelices. Strang A (GGAAGCACAUUUUGAGAAtt und UUCUCAAGAUGUGCUUCctt), Strang B (CUGAAGGAGUAUUCUGAAAtt und UUUCAGAUACUCCUUCAGtt), Strang C (GCAUGAACUUGGACCCUUUtt und AAAGGGUCCAAGUUAUGtt). PDI-siRNA besteht ebenfalls aus drei RNA-Doppelhelices. Strang A (GAACGGUCAUUGAUUACAAtt und UUGUAUCAUAGACCGUtt), Strang B (GGAAGACGACGAUCAGAAAtt und UUUCUGAUCGUCGUCUUCctt) und Strang C (GCUACCACUUCGCAUUUAtt und UGAAAUGCGAAGUGGUAGctt). Die H⁺/K⁺-ATPase β besitzt auch drei Doppelhelices. Strang A (CUGUACUACGAGGUUUCUtt und AGAAACUGCGUACAGtt), Strang B (GACAGCAUACUGUACAAtt und AUGUACAGUUGAUCGUGUctt) sowie Strang C (CACUAAGGAAGGCCUAUCUtt und AGAUAGGCCUCCUUGAGUtt).

Tiere

Mäuse (*Mus musculus*) wurden bei Jackson Laboratories Inc. (Bar Harbor, ME) gekauft, mit einer Standard-Nagetiernahrung gefüttert und erhielten Wasser ad libitum. Sie wurden in der Tierforschungsstation der Universität untergebracht. Eine Gruppe von iNOS-knockout-Mäusen wurde durch Brutpaare gezüchtet, die ebenfalls von den Jackson Laboratories gekauft worden waren. Nach Anästhesie (intra-

peritoneale Applikation von 100mg/kg Ketamin und 10mg/kg Xylazin) wurde die Haut durch Betadin-Tupfer desinfiziert und aortales Blut wurde mittels heparinisierter Spritzen gewonnen.

Gewinnung von Neutrophilen und Exposition gegenüber verschiedener Substanzen

Heparinisiertes Blut (4ml) wurde von gesunden menschlichen Probanden gewonnen und unter Beimengung von zwei Schichten Histopaque (1077 und 1119 von Sigma) bei 400g für 30min zentrifugiert. Die gewonnene Schicht wurde mit PBS gewaschen. Murine Neutrophile wurde wie vorbeschrieben (29) isoliert.

Die Vorgehensweise der Gasexposition war für humane und murine Zellen dieselbe. Eine Lösung aus 9×10^5 Neutrophilen/ml PBS, 1mM CaCl₂, 1,5mM MgCl₂ und 5,5mM Glukose wurde bei Raumtemperatur entweder normobarer Raumluft (~100 kPa) oder Luft + Helium, N₂ oder Argon bei einem Gesamtdruck von 690kPa wie vorbeschrieben ausgesetzt (29). Wo explizit aufgeführt wurden murine Zelllösungen für 20 Stunden bei Raumtemperatur mit 0,08nM siRNA versetzt und erst danach den Gasmischungen ausgesetzt. Dies geschah nach Angaben des Herstellers und beinhaltete Kontroll-siRNA sowie die siRNA spezifisch für Mäuse-VASP, -FAK, -PDI, -Flippase oder -Floppase. Der Grad an Proteinreduktion nach dieser Behandlung wurde mittels Western Blot ermittelt. Die Ergebnisse wurden als Aktin/Protein-Fraktion in siRNA-inkubierten Zelllösungen versus Proteinkonzentrationen in Zelllysaten mit Kontroll-siRNA beschrieben. Die VASP-Band-Intensität nach si-RNA-Inkubation war $12,1 \pm 2,5\%$ (SE, n=6) der Kontrollgruppe, die FAK-Band-Intensität $6,5 \pm 1,4\%$ (SE, n=6), PDI-Band-Intensität $10,0 \pm 2,8\%$ (SE, n=6), Flippase-Band-Intensität $14,1 \pm 1,1\%$ (SE, n=6) und die Intensität des Floppase-Bandes betrug $11,9 \pm 1,6\%$ (SE, n=6) nach Hemmung mittels der spezifischen siRNA und gegenüber der Kontrollgruppe. Die Inhibitoren waren in folgenden Konzentrationen verabreicht worden: 200 μ M MK571 (Floppase), 200 μ M SCH28080 (Flippase), 20 μ M PT573228 (FAK), 50 μ M NSC23766 (Rac), 30 μ M Quercetin-3-rutinosid (PDI), 10 μ M Nox2ds (NOX) und 10 μ M der Nox2ds-Negativ-Kontrolllösung. In einer anderen Versuchsreihe wurden die Zellsuspensionen nach der Gasexposition und vor weiteren Untersuchungsschritten für 5 Minuten gegenüber UV-Licht exponiert (via einer 200W Quecksilberdampfampe).

Aktinpolymerisation in permeablen Zellen

Neutrophil-Suspensionen wurden durch 0,2% N-octyl- β -glucopyranosid (OG) membranpermeabel gemacht und danach den oben genannten Gas-mischungen ausgesetzt. Die Aktinpolymerisation wurde wie in (31) beschrieben analysiert. Die Suspensionen wurden für 10s mit einem Zehntel OG-Buffer inkubiert (60mM PIPES, 25mM Hepes [pH 6,9], 10mM EGTA, 2mM $MgCl_2$, 4% OG, 10 μ M Phalloidin, 42nM Leupeptin, 10mM Benzamidin und 0,123mM Aprotinin). Danach wurden 3 Teile Puffer B beigefügt (1mM Tris [pH 7,0], 1mM EGTA, 2mM $MgCl_2$, 10mM KCl, 5 mM β -Mercaptoethanol und 5mM ATP). Die Aktinpolymerisation wurde für 5 Minuten mittels Fluoreszenzspektrometer (355nm Erregung, 405nm Emission) beobachtet, nachdem 1 μ M Pyrene-beladenes Aktin (aus Kaninchen-Skelettmuskulatur) der Neutrophilensuspension beigemischt wurde.

NOS-Aktivität in permeablen Neutrophilen

Isolierte Neutrophile wurden mit 0,2% OG durchlässig gemacht und die NOS-Aktivität wurde wie in (24) ermittelt. In Kürze beschrieben wurden die Zellen (9×10^5 /ml PBS + 5,5mM Glukose) mit 40 μ M N-hydroxy-L-Arginin versetzt, um die Arginase zu inhibieren. Nach 10 Minuten wurden 20mM [3H]-L-Arginin zugefügt. Der Hälfte der Proben wurde dann 0,1 μ M 1400W zugemischt und in Zeitintervallen bis zu 2 Stunden 0,7M Trichlorsäure zum Stop der Reaktion zugesetzt. Die Proben wurden mit Ethylether gewaschen, durch Dowex 50WX8 gefiltert und die [3H]-L-Citrullin-Konzentration in der Lösung gemessen. Dieselbe Menge an [3H]-L-Citrullin konnte generiert werden wenn die Menge an [3H]-L-Arginin um das fünffache erhöht wurde. Kein Citrullin war intrazellulär nachweisbar wenn die Neutrophilen nicht durch OG durchlässig gemacht worden waren.

NOS2-Dimer-/Monomer-Differenzen

Der Unterschied zwischen NOS2-Dimeren und -Monomeren wurden wie vorbeschrieben untersucht (26, 32, 33). Neutrophile wurden durch die Suspension in Puffer ([100mM NaCl, 40mM Tris (pH 7,3), 4 mM Tetrahydrobiopterin, 3mM DTT, 2mM L-Arginin, 0,1% Triton X-100, 10% Glycerol] lysiert und danach einem dreimaligen Einfrieren-Auftauen-Zyklus unterzogen. Hiernach wurden sie bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Danach erfolgte eine Zentrifugation mit 12 000g für 30 Minuten bei 4°C. Die erhaltenen Proben wurden dann auf 5% SDS-PAGE-Gel verbracht und per Western-blotting auf iNOS und Aktin analysiert (29).

NAPDH-Oxidase-Aktivität

Der O_2 -Verbrauch wurde in Lösungen untersucht, die $3,6 \times 10^5$ Neutrophile in 400 μ l PBS + 1mM $CaCl_2$, 1,5mM $MgCl_2$ und 5,5mM Glukose enthielten. Der Hälfte der Proben wurde 10 μ M Nox2ds beigefügt. Der Sauerstoffgehalt wurde mit einer Model-5300 Sauerstoffelektrode (Yellow Springs Instruments Co., Yellow Springs, OH) gemessen.

Generierung von freien Radikalen

Neutrophilen-Suspension wurden mit 10 μ M 2,7-Dihydrodichlorofluorescein-diacetat (DCF-DA) gemischt und die Fluoreszenz ermittelt (492nm Erregung, 530nm Emission). Dies geschah nach der Inkubation mit Raumluft oder Luft + 690kPa He, N_2 oder Ar wie vorbeschrieben (7).

Detektion von Sauerstoff-Singulets

O_2 -Singulets wurden mit Hilfe des „Luminescent probe singlet oxygen sensor green“ (SOSG, Invitrogen Inc., Carlsbad, CA) ermittelt. Die Methode ist vergleichbar der von Gollmer et al. beschriebenen (34). Eine Lösung aus 1mM SOSG wurde in Methanol aufgelöst. Hiervon wurden 2 μ l zu 200 μ l der Neutrophilenlösung beigemischt und das Gemisch bei Raumtemperatur in Dunkelheit für 30 Minuten inkubiert. Danach wurde die Gasexposition vorgenommen. Nach Dekompression wurden die Proben in definierten Zeitintervallen untersucht (480nm Erregung, 535nm Emission). Wenn angegeben, wurden 1mM Ascorbinsäure oder 2mM Azid 5 Minuten vor Kompression der Lösung beigefügt.

Zytoskelett-Protein-Quervernetzung aufgrund von Triton-Löslichkeit

Neutrophile wurden in einer Lösung aus 0,5 mM Dithiobis (Succinimidyl-Propionat, DTSP) gelöst, um Proteine mit Sulfhydrylverbindungen in einer Distanz von $\sim 12 \text{ \AA}$ zu vernetzen (beschrieben in 29, 35). Zelllysate wurden danach in tritonlösliches G-Aktin, kurzes F-Aktin und tritonunlösliches Protein separiert, einer Elektrophorese (Gradient 4-15% SDS-PAGE) unterzogen und per Western-Blot untersucht (beschrieben in 29).

Immunoprecipitation von Proteinkomplexen

F-Aktin-Suspensionen mit 250 μ g Protein wurden gereinigt und mit 5 μ g Anti-Aktin-Antikörper auf einem Rüttler bei 4°C über Nacht belassen. Danach wurde 30 μ l 20% Protein-G-Sepharose (mit 2% BSA versetzt) hinzugefügt und für 1,5 Stunden bei 4°C inkubiert. Die Proben wurden wie in (29) beschrie-

ben weiterverarbeitet und einer Elektrophorese mit anschließendem Western-blotting analysiert.

Zellextrakt-Vorbereitung und Biotin-Switch

Isolierte Neutrophile wurden nach der Exposition gegenüber Luft oder komprimierten Inertgasen in HEN-Puffer (250mM Hepes (pH 7,7), 1mM EDTA und 0,1mM Neocuproin) aufgelöst, lysiert und einer Biotin-Switch-Untersuchung unterzogen, wie sie in (29) beschrieben wurde.

MPs-Zählung via Flusszytometrie

Alle benutzten Materialien waren steril und alle Lösungen gefiltert (0,1µm Durchlässigkeit). Eine Flusszytometrie wurde mit Hilfe eines 4-Farben-Lasers (FACSCalibur von Becton Dickinson, San Jose, CA) sowie eines 8-Farben-Dreifach-Lasers (MACSQuant, Miltenyi Biotec Corp., Auburn, CA) und der jeweiligen Herstellersoftware durchgeführt. Nach definierten Zeitintervallen wurde die Zellen nach der Gasexposition mit 100µl/ml Caltag Reagenz A Fixiermedium (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA) fixiert und mit 15 000g für 30min zentrifugiert um die Neutrophilen zu gewinnen. EDTA wurde dem Überstand hinzugefügt, bis eine Konzentration von 0,125M erreicht wurde. 50µl dieser Lösung wurde dann mit 3µl Annexin-V-FITC in 100µl Annexin-Bindungspuffer (1:10 mit Aqua dest.) vermischt. Die Proben wurden danach für 30min in Dunkelheit inkubiert. Beide verwendete Protokolle der Zytometrie erforderten zunächst die Etablierung von Negativ-Kontrollen durch eine Fluoreszenz-minus-1-Analyse. Die Streuung nach vorne und seitwärts wurde logarrhythmisch geeicht. Mikropertlen mit verschiedenen Durchmessern (0,3µm von Sigma Inc.; 1,0µm und 3,0µm von Spherotech Inc. Lake Forest, IL) wurden zur Eichung der Geräte vor jedem Untersuchungsangang benutzt. Annexin-V-positive Partikel mit einem Durchmesser bis zu 1,0µm wurden als Mikropartikel definiert und die absolute Anzahl/ml wurde aufgrund der Anzahl der Partikel und des genauen Volumens der untersuchten Probe berechnet.

Statistische Analyse

Ergebnisse sind als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung angegeben. Zum Datenvergleich wurde die Varianzanalyse (ANOVA) unter Verwendung von Sigmastat (Jandel Scientific, San Jose, CA) und Newman-Keuls-post-hoc-Test angewandt. Die statistische Signifikanz wurde bei $p < 0,05$ definiert.

Ergebnisse

Bildung von Mikropartikeln durch humane Neutrophile

Isolierte humane Neutrophile von gesunden Freiwilligen generieren unter Exposition gegenüber einem erhöhten N₂-Partialdruck Mikropartikel. Abbildung 1 zeigt die Dosisabhängigkeit dargestellt als Anzahl der MP / Neutrophile; diese steigt ab einem Grenzwert von ~186 kPa an. Wie dargestellt generieren die humanen Kontroll-Neutrophilen unter Raumluft nur $0,001 \pm 0,001$ MPs / Neutrophile in einem Zeitraum von 4 Stunden nach der Dekompression ($n=6$). Die MP-Anzahl in Suspensionen, die Luft + 186, 345 oder 690kPa N₂ ausgesetzt waren, waren nach 30minütiger Gasexposition und anschließender Dekompression signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe. Zudem war die MP-Anzahl in diesen Proben für ungefähr 4 Stunden post dekompressionem gleichbleibend. Wenn die Zellen für 4 Stunden unter Druck gehalten wurden, war die Anzahl der MP statistisch nicht signifikant unterschiedlich im Vergleich zur Exposition für 30 Minuten (Daten nicht gezeigt). Daher ziehen wir die Schlußfolgerung, daß Mikropartikel innerhalb der ersten 30 Minuten generiert werden und die Bildung nach der Dekompression aufhört.

Die Anzahl der lebenden Neutrophilen betrug direkt nach der Blutentnahme $90,2 \pm 0,5\%$ ($n=12$). Diese Fraktion nahm nach ≥ 30 Minuten Inkubation unter Raumluft leicht ab ($85,0 \pm 1,1\%$, $n=9$). Dies war jedoch statistisch nicht signifikant im Vergleich zu den Zellen, die eine Exposition gegenüber erhöhten Gasdrücken erfuhren. Zum Beispiel lag die Anzahl der lebenden Neutrophilen nach 30 Minuten Inkubation unter Luft+690 kPa N₂ bei $84,2 \pm 0,9\%$ (ns ; $n=7$). Zudem wurde keinerlei Zelluntergang durch Fragmentation aufgrund der Kompression oder der Dekompression beobachtet. Alle Zellsuspensionen beinhalteten zu Beginn der Untersuchungen $1,8 \times 10^5$ Neutrophile in 200µl Lösung. Nach Exposition in Raumluft lag die Zellzahl bei durchschnittlich $1,77 \pm 0,02 \times 10^5$ und nach 30minütiger Exposition in Luft + 690kPa N₂ bei $1,75 \pm 0,03 \times 10^5$ (ns).

Aufgrund des bisher entwickelten murinen DCS-Modells stellte sich die Frage, ob die Aktivitäten von iNOS und NADPH-Oxidase für die MP-Bildung notwendig sind (7, 9). Während in der Kontrollgruppe bei 30minütiger Exposition unter Luft + 690kPa N₂ die Anzahl der MP/Neutrophil $3,34 \pm 0,17$ betrug ($n=7$), lag der Wert nach Beimischung von 1mM 1400W nur

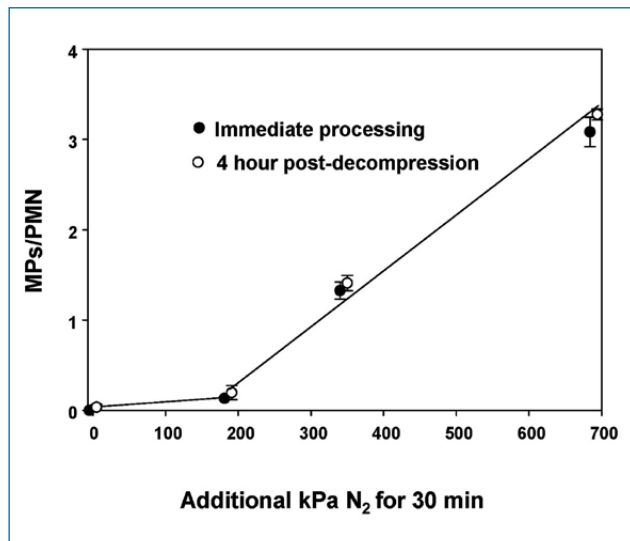


Abbildung 1

MP-Bildung durch humane Neutrophile, die für jeweils 30 Minuten gegenüber Luft (zusätzlich 0kPa N₂) oder Luft + 186, 345 oder 690kPa N₂ exponiert waren. Die Daten zeigen eine MPs/Neutrophile-Rate in Suspensionen mit $1,8 \times 10^5$ Zellen, die gegenüber Luft oder verschiedenen N₂-Gasdrücken für jeweils 30 Minuten ausgesetzt waren und entweder direkt danach (offene Kreise) oder nach 4 Stunden in normobarer Raumluft (gefüllte Kreise) untersucht wurden. Die Proben, die nur Raumluft ausgesetzt waren, wurden direkt nach der Zubereitung fixiert, alle anderen nach 4 Stunden. Die Daten werden als Durchschnitt $\pm$ Standardabweichung und $n = 4-9$ für jede Variable angezeigt. Alle Reihen mit erhöhten N₂-Drücken sind signifikant unterschiedlich von der Kontrollgruppe. Es gibt keine signifikanten Unterschiede auf den jeweiligen Druckniveaus zwischen den Werten direkt oder vier Stunden nach der Exposition.

bei $0,37 \pm 0,27$ ($n=3$, ns gegenüber Kontrollgruppe; $p < 0,05$ gegenüber Luft+N₂). Bei derselben Gasexposition und unter Beimischung von $10 \mu\text{M}$ Scrb-NOx2ds als Kontrollpeptid lag die Produktion von MP pro neutrophiler Zelle bei $3,31 \pm 0,21$ ($n=4$; $p < 0,05$ gegenüber Kontrollgruppe; ns gegenüber N₂-Exposition). Wurde der Suspension hingegen $10 \mu\text{M}$ Nox2ds als NOX-Inhibitor beifügt, so lag die Produktion der MP bei $0,19 \pm 0,19$ pro Neutrophil ($n=3$; ns vs. Kontrolle; $p < 0,05$ vs. N₂-Exposition). Unter der Beimischung von 1mM Ebselen als Antioxidant und unter derselben Gasexposition lag die Produktion bei $0,23 \pm 0,23$ MP/Neutrophil ($n=3$; ns vs. Kontrolle; $p < 0,05$ vs. N₂-Exposition).

Bildung von Mikropartikeln durch murine Zellen

Während der 30minütigen Exposition gegenüber hohen Gasdrücken zeigten sich keinerlei Effekt auf die Produktion von Mikropartikeln durch murine neutrophile Zellen. Nach derselben Kompressionsphase mit anschließender Dekompression zeigte sich jedoch in den darauf folgenden vier Stunden eine lineare Zunahme der MP in den Zellsuspensionen. Die Daten aufgrund der Exposition unter Raumluft sowie Luft + 90kPa N₂ sind in Abbildung 2 dargestellt.

Zudem wurde die MP-Produktion nach einer verlängerten Gasexposition von 4 Stunden untersucht. Tabelle 1 zeigt die MP/Neutrophil-Anzahl sowie den Prozentsatz von lebenden Zellen nach Exposition von 30 Minuten und von 4 Stunden Dauer. Der Unterschied in der Rate der MP-Bildung war statistisch nicht signifikant, wenn die Zellen entweder nach 30minütiger Exposition für 4h unter normobarer Raumluft belassen wurden oder sie für 4 Stunden kontinuierlich unter Druck gehalten wurden. Zudem zeigen die Daten keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf den Prozentsatz von lebenden Zellen in Bezug auf die Kontrollgruppe.

Die Ergebnisse der Exposition gegenüber He, N₂ oder Ar bei 690kPa sind in Tabelle 1 dargestellt. Zudem wurde die Exposition unter 690kPa hydrostatischem Druck untersucht (ohne Gasphase). Diese Kontrolluntersuchung zeigte keinerlei unterschiedliche MP-Produktion gegenüber der Raumluft-Kontrollgruppe. Unter Heliumexposition kam es zu einer Zunahme der MP-Bildung, jedoch nicht in der gleichen Größenordnung wie unter Argon oder Stickstoff.

Es gab keine Zellverluste aufgrund der verschiedenen Expositionsformen. So war z.B. die Neutrophilen-Zellzahl nach 4 Stunden in Raumluft bei $97,3 \pm 5,1\%$ im Vergleich zum Ausgangswert ($n=8$) und in den Proben nach Exposition gegenüber 690kPa N₂ lag die Zellzahl bei $96,2 \pm 1,4\%$ ($n=4$, ns). Daher schließen wir, daß genau wie bei den humanen Zellen die Produktion von Mikropartikel nicht aufgrund von Apoptose oder einer physikalischen Störung wie Blasenformation oder Zelllyse aufgrund von Dekompression geschieht.

Es konnte eine Dosisabhängigkeit der MP-Bildung gezeigt werden, wenn die murinen Zellen aufsteigenden N₂-Partialdrücken ausgesetzt wurden (Tabelle 2; erste Reihe). Die MP-Produktion wurde - vergleichbar der Antwort der humanen Neutrophilen - durch die Inkubation mit Ebselen, 1400W oder

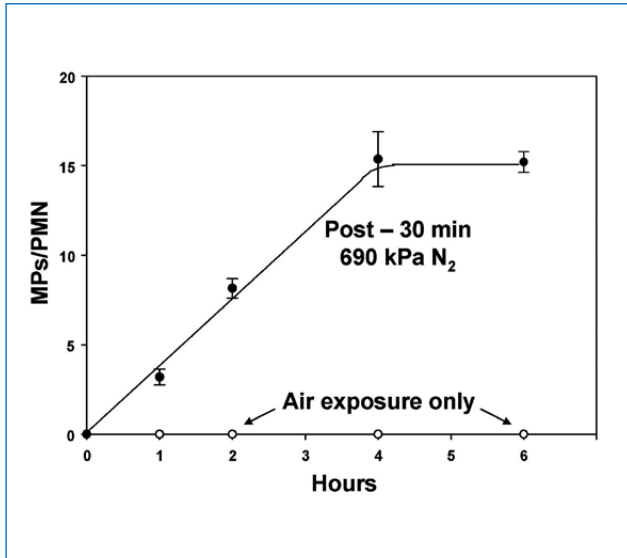


Abbildung 2
MP-Bildung durch murine Neutrophile nach 30minütiger Exposition gegenüber Luft oder Luft + 690kPa N₂. Die Daten zeigen die MP/Neutrophile-Rate in Suspensionen nach den angegebenen Untersuchungszeiten. Alle post-N₂ Werte außer denen zum Zeitpunkt 0 sind signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$) im Vergleich zu den luftexponierten Kontrollproben (offene Kreise). Die Daten sind als Durchschnitt $\pm$ Standardabweichung dargestellt ($n=4-12$).

Nox2ds gehemmt, während Scrb-2-Nox2ds keinen hemmenden Effekt zeigte (siehe die ersten zwei Reihen der Tabelle 3).

Durch die weiter stattfindende MP-Bildung nach der Dekompression in den murinen Zellen konnten weitere Studien stattfinden, um die zugrundeliegenden Mechanismen weiter zu untersuchen. Die MP-Bildung konnte durch eine 5minütige Exposition unter UV-Licht gehemmt werden (im Anschluß an eine 30minütige Exposition gegenüber 690kPa N₂; s. Tabelle 3).

Wie bereits in der Einleitung ausgeführt wird die Reaktion der Neutrophilen durch oxidativen Stress modifiziert; dies geschieht zum Teil durch zytoskelettale Veränderungen. Wenn die Zellen bei der Exposition gegenüber Stickstoff mit Cytochalasin D oder mit Inhibitoren hinsichtlich Rac und FAK inkubiert wurden oder wenn die Zellen durch die jeweilige siRNA hinsichtlich VASP oder FAK depletiert wurden, dann wurde die MP-Bildung unter Stickstoffexposition gehemmt (Tabelle 3).

Ebenfalls wurde in der Einleitung beschrieben, wie die Mikropartikel-Bildung zum Teil durch Enzyme modifiziert wird, die die Zellmembranlipide alterieren. Die N₂-assoziierte MP-Entstehung wurde durch die Beimengung von chemischen Inhibitoren gegenüber der H⁺/K⁺-ATPase oder der MRP-1 sowie der Hemmung dieser Enzyme durch siRNA verhindert. Ebenso durch die chemische Hemmung oder die Beimengung von siRNA gegenüber der PDI. Unter

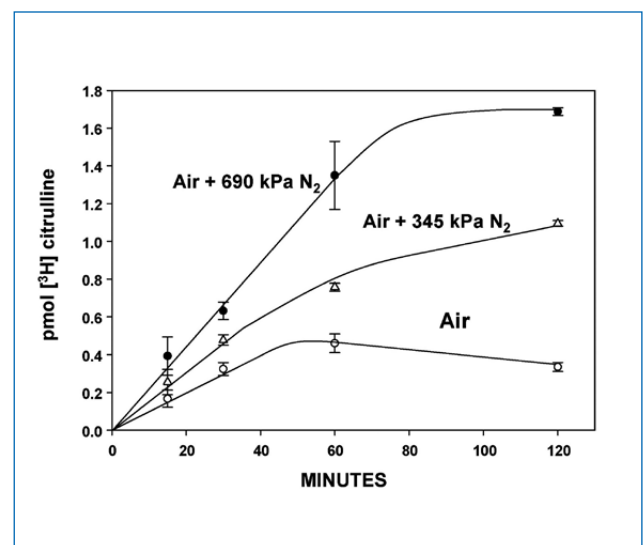


Abbildung 3
Aktivität der iNOS während murine Neutrophile gegenüber Luft (Kontrollgruppe) oder Luft + 345 oder 690kPa N₂ exponiert wurden. Die Daten zeigen die [3H]-Citrullin-Produktion als Durchschnitt $\pm$ Standardabweichung an ($n=3$ bei 15,30 und 120min, $n=5$ bei 60min). [3H]-Arginin wurde den Suspensionen mit $1,8 \times 10^5$ Neutrophilen beigefügt und diese dann entweder unter Druck gesetzt oder in Raumluft belassen. Zu den angegebenen Zeiten wurden die Zellen dekompriert, TCA zugefügt und die Messungen durchgeführt. Zu jedem Zeitpunkt waren die Ergebnisse unter N₂ signifikant unterschiedlich zu den Werten unter Raumluft. Die Werte nach 60min und 120min unter 345kPa N₂ waren zudem statistisch signifikant unterschiedlich zu den Werten unter 690kPa N₂ ($p < 0,05$, ANOVA).

stützt wurden diese Ergebnisse, da die N₂-induzierte MP-Bildung ebenfalls durch die Nox2ds (aber nicht durch die Scrb-2-Nox2ds) inhibiert wurde. PDI aktiviert nämlich ebenfalls die NOX (36).

NOS-Aktivierung

Die Aktivität der iNOS wurde gemessen, nachdem die [3H]-Citrullin-Produktion durch die Ko-Inkubation

Tabelle 1. MP-Bildung durch murine Neutrophile unter Gasexposition

Exposure conditions	MPs count	Viability at 4 hours
30 min Air (24)	$0.3 \times 10^{-3} \pm 0.2 \times 10^{-3}/\text{PMN/hr}$	$85.3 \pm 1.9 \%$
30 min Hydro. Press. (5)	$0.2 \times 10^{-3} \pm 0.3 \times 10^{-3}/\text{PMN/hr}$	$88.3 \pm 2.0 \%$
30 min He (5)	$1.01 \pm 0.12/\text{PMN/hr} *$	$88.0 \pm 0.6 \%$
30 min N ₂ (8)	$3.84 \pm 0.21/\text{PMN/hr} *†$	$85.8 \pm 1.7 \%$
30 min Ar (5)	$3.47 \pm 0.22/\text{PMN/hr} *†$	$82.7 \pm 0.7 \%$
4 hours Air (8)	$0.0011 \pm 0.0007/\text{PMN}@4\text{hr}$	$85.3 \pm 1.9 \%$
4 hours Hydro. Press (5)	$0.0008 \pm 0.002/\text{PMN}@4\text{hr}$	$86.7 \pm 1.9 \%$
4 hours He (4)	$3.9 \pm 0.3/\text{PMN} @ 4 \text{ hr} *$	$86.8 \pm 2.0 \%$
4 hours N ₂ (8)	$15.3 \pm 0.9/\text{PMN} @ 4 \text{ hr} *†$	$85.7 \pm 1.8 \%$
4 hours Ar (4)	$15.2 \pm 0.9/\text{PMN} @ 4 \text{ hr} *†$	$82.5 \pm 1.6 \%$

MPs wurden in Zellsuspensionen nach der Exposition gegenüber 690kPa hydrostatischem Druck (Hydro. Press. = Zellen in verschlossenen Spritzen und ohne Gasphase komprimiert), He, N₂ oder Ar für 30 Minuten oder für 4 Stunden exponiert. Die obere Hälfte der Tabelle zeigt die Produktionsrate nach einer 30minütigen Kompressionsphase mit nachfolgend bis zu 4 Stunden unter normobarer Raumluft an. Die untere Hälfte der Tabelle zeigt die MP/Neutrophil-Rate direkt nach einer 4stündigen Kompressionsphase mit anschließender Dekompression an. Die Viabilität der Zellen wurde mittels Tryptan-Blau 4 Stunden nach Beginn der Exposition ermittelt (keine statistisch signifikanten Unterschiede). Die Werte sind als Durchschnitt $\pm$ Standardabweichung dargestellt, n= Probennummer, * = p<0,05 vs. Kontrolle, † = p<0,05 vs. He, basiert auf ANOVA).

Tabelle 2. Dosisabhängigkeit der murinen Neutrophilen bei N₂-Exposition.

Air + kPa N ₂	MPs/PMN/hr	iNOS	NOX
0	0.0003 ± 0.0002 (24)	0.19 ± 0.02 (21)	1.37 ± 0.14 (11)
186	0.08 ± 0.02 (4)*	0.47 ± 0.12 (3)*	1.95 ± 0.12 (4)*
228	0.72 ± 0.10 (4)*	0.73 ± 0.13 (7)*	2.42 ± 0.23 (4)*
345	1.14 ± 0.08 (8)*	0.83 ± 0.22 (6)*	3.57 ± 0.14 (4)*
455	2.08 ± 0.41 (4)*	1.45 ± 0.15 (3)*	4.09 ± 0.28 (4)*
690	3.84 ± 0.21 (8) *†	1.76 ± 0.08 (24) *†	5.00 ± 0.36 (10) *†

Die MP-Bildung wird als Partikel/Neutrophile/Stunde dargestellt. Die Zellen wurden gegenüber Luft + verschiedenen N₂-Drücken exponiert. iNOS zeigt die produzierte Menge an [³H]-Zitrullin in pmol nach 1 Stunde nach der Druckexposition an. NOX zeigt die Rate des O₂-Verbrauchs in $\mu\text{mol O}_2 \times 10^{-3} / \text{min} / 1 \times 10^6$ Neutrophile nach 30minütiger Exposition gegenüber N₂ an. Die Werte wurden aus dem linearen Teil der Verbrauchskurve entnommen, diese ist in Abb. 4 dargestellt. * = p<0,05 vs. Raumluft-Kontrolle, † = signifikanter Unterschied zwischen 186 und 228kPa N₂ basierend auf ANOVA.

Tabelle 3. Einfluß der verschiedenen Substanzen auf die N₂-induzierte Verstärkung der Mikropartikel-Bildung, die iNOS-Aktivierung, der DCF-DA-Fluoreszenz und der FBE-Formation.

Agent	MPs/PMN/hr x 10 ²		iNOS (pmol [H ³] citrulline/hour)		DCF (fluor @ 10 minutes x 10 ⁻¹)		FBEs (fluor/min) X 10 ³	
	Air	N ₂	Air	N ₂	Air	N ₂	Air	N ₂
PBS	0.03±0.02 (24)	384 ± 21 (8) *	0.19±0.01 (21)	1.76±0.08 (24) *	0.72±0.09 (11)	1213±56.3 (12) *	0.46±0.05 (12)	8.55±0.40 (12) *
KO	0.00±0.00 (5)	0.00±0.00 (5)	0±0 (5)	0.01±0.03 (5)	ND	ND	0.39±0.06 (3)	0.59±0.16 (3)
1400W	0.00±0.00 (4)	0.13±0.06 (5)	0±0 (8)	0±0 (8)	0.93±0.07 (3)	74±13.0 (3) *	0.54±0.12 (5)	0.42±0.08 (3)
Ebselen	0.06±0.02 (3)	0.06±0.04 (3)	0.20±0.001 (3)	0.14±0.04 (3)	0.0±0.0 (4)	63.0±48.1 (4)	0.30±0.01 (5)	0.54±0.12 (5)
UV	0.02±0.003 (4)	0.05±0.03 (4)	0.20±0.003 (5)	0.10±0.001 (4)	0.95±0.18 (3)	100.4±56.5 (3) *	0.42±0.02 (3)	0.46±0.11 (3)
Cyto D	0.09±0.003 (3)	0.13±0.06 (3)	0.20±0.008 (3)	0.14±0.05 (6)	0.92±0.19 (3)	141.2±30.3 (3) *	0±0 (3)	0±0 (3)
Nox2ds	0.04±0.02 (3)	0.05±0.03 (3)	0.20±0.001 (3)	0.04±0.01 (4)	0.92±0.19 (3)	117.0±48.4 (3) *	0.40±0.10 (4)	0.53±0.16 (4)
Scrbm-Nox2ds	0.02±0.003 (3)	496±12 (3)*	0.18±0.01 (3)	1.57±0.08 (5) *	0.91±0.22 (3)	1139±82.8 (4) *	0.30±0.02 (4)	8.11±0.25 (4) *
Rac-i	0.08±0.08 (3)	0.16±0.12 (3)	0.21±0.003 (4)	0.31±0.003 (4)	0.0±0.0 (4)	76.0±76.0 (4)	0.34±0.05 (5)	0.41±0.08 (4)
Cont-si	0.03±0.02 (4)	405±42 (4) *	0.20±0.001 (4)	1.71±0.04 (4) *	0.81±0.19 (4)	1214±51.1 (4) *	0.44±0.03 (4)	8.61±0.55 (4) *
VASP-si	0.09±0.17 (4)	0.15±0.07 (4)	0.20±0.001 (4)	0.03±0.001 (4)	0.97±0.22 (3)	281.1±81.4 (3) *	0.40±0.06 (3)	0.57±0.22 (3)
FAK-i	0.04±0.02 (3)	0.07±0.03 (3)	0.20±0.001 (3)	0.18±0.14 (3)	1.00±0.25 (3)	236.8±98.3 (3) *	0.42±0.04 (5)	0.33±0.03 (3)
FAK-si	0.05±0.02 (4)	0.08±0.04 (3)	0.19±0.002 (4)	0.09±0.002 (4)	0.72±0.12 (3)	205.1±58.3 (3) *	0.40±0.17 (3)	0.67±0.09 (3)
Flip-i	0.07±0.02 (3)	0.16±0.12 (3)	0.20±0.001 (4)	0.19±0.14 (4)	4.2±4.2 (4)	45.8±45.8 (4)	0.42±0.03 (3)	0.35±0.08 (3)
Flip-si	0.02±0.02 (4)	0.06±0.04 (4)	0.20±0.002 (3)	0.16±0.11 (4)	0.98±0.13 (3)	222.4±95.9 (3) *	0.43±0.03 (3)	0.43±0.03 (3)
Flop-i	0.003±0.01 (3)	0.05±0.02 (3)	0.20±0.001 (4)	0.16±0.11 (4)	0.0±0.0 (4)	12.7± 33.9 (4)	0.48±0.09 (3)	0.38±0.06 (5)
Flop-si	0.04±0.04 (4)	0.05±0.04 (4)	0.20±0.001 (3)	0.32±0.16 (4)	0.95±0.10 (3)	235.8±97.3 (3) *	0.47±0.03 (3)	0.53±0.09 (3)
PDI-i	0.02±0.02 (3)	0.01±0.003 (3)	0.19±0.003 (4)	0.24±0.003 (4)	0.57±0.22 (3)	146.0±55.8 (3) *	0.39±0.04 (3)	0.53±0.12 (4)
PDI-si	0.04±0.03 (4)	0.06±0.06 (4)	0.20±0.003 (3)	0.12±0.10 (3)	0.85±0.14 (3)	133.8±17.8 (4) *	0.41±0.02 (3)	0.30±0.01 (3)

Isolierte murine Neutrophile wurden gegenüber Luft oder Luft + 690kPa N₂ exponiert. MPs/PMN zeigt die MP-Anzahl in Suspensionen nach einer 30minütigen Exposition gegenüber 690kPa N₂ an. Danach wurden die Zellen für 4 Stunden in normobarer Raumluft belassen. NOS-Aktivität wird in pmol [³H]-Zitrullin-Produktion angegeben, nachdem [³H]-Arginin den Suspensionen direkt nach der N₂-Exposition zugesetzt wurden und die Zellen danach für 1 Stunde in normobarer Raumluft inkubiert wurden. Die DCF-Fluoreszenz wurde gemessen, nachdem DCF-DA den Suspensionen beigelegt wurde und diese dann Luft oder Luft + Luft+690kPa N₂ für 10 Minuten ausgesetzt wurden. Die Werte der Hemmung sind in der N₂-Reihe alle

signifikant unterschiedlich im Vergleich zu N_2 + PBS. ($p < 0,05$). FBEs reflektiert die Pyren-Aktin-Fluoreszenz in Einheiten/Minute in den Zellen direkt nach 30 Minuten unter Raumluft oder unter 690kPa N_2 . Alle Werte sind als Durchschnitt $\pm$ Standardabweichung angegeben, n= Nummer der jeweiligen Untersuchungsreihe, * = $p < 0,05$ gegenüber der Raumluft-Kontrollgruppe. Abkürzungen und Manipulation: PBS: Phosphat-gepufferte Kochsalzlsg.; KO: Neutrophile von NOS-2-knock-out-Mäusen; 1400W: Inkubation mit 1mM 1400W während der Luft-/N₂-Exposition; Ebselen: Inkubation mit 1mM Ebselen während der Luft-/N₂-Exposition; UV: Exposition gegenüber UV-Licht für 5 Minuten nach der 30minütigen Gasexposition und vor dem Messen; Cyto D: Inkubation mit 5µM Cytochalasin D während der Luft-/N₂-Exposition; Nox2ds: Inkubation mit 10µM Nox2ds während der Luft-/N₂-Exposition; Scrm-b-Nox2ds: Inkubation mit 10µM eines Kontroll-Nox2ds-Peptids ohne Funktion; Rac-i: Inkubation mit 50µM NSC23766 während der Luft-/N₂-Exposition; Cont-si: Kontrollgruppe mit Inkubation mittels einer funktionslosen inhibitorischen RNA-Sequenz für 24h vor den Experimenten; VASP-si: Zellen mit 24h Inkubation mit einer siRNA gegenüber VASP; FAK-i: Inkubation mit 20µM PT 573228 während der Luft-/N₂-Exposition; FAK-si: Zellen mit 24h Inkubation mit einer siRNA gegen FAK vor den Experimenten; Flip-i: Inkubation mit 200µM SCH 28080 während der Luft-/N₂-Exposition; Flip-si: Zellen mit 24h Inkubation mit einer siRNA gegen Flippase vor dem Experiment; Flop-i: Inkubation mit 200µM MK571 während der Luft-/N₂-Exposition; Flop-si: Zellen mit 24h Inkubation mit einer si-RNA gegen Floppase vor dem Experiment; PDI-i: Inkubation mit 30µM Quercetin-3-Rutinosid während der Luft-/N₂-Exposition; PDI-si: Zellen mit 24h Inkubation mit einer siRNA gegen PDI vor dem Experiment; ND: kein Experiment bei den Zellen aus KO-Mäusen durchgeführt.

mit 1400W in Mäusezellen verhindert wurde (vorher wurden die Zellen durch OG membranpermeabel gemacht, um die Notwendigkeit des aktiven [³H]-Arginin-Transport bei dieser Untersuchung auszuschließen). Abbildung 3 zeigt die [³H]-Citruillin-Produktion nach Zugabe von [³H]-Arginin und der nachfolgenden Exposition gegenüber normobarer Raumluft (Kontrollgruppe) oder 345 oder 690kPa N_2 . Nach den festgelegten Zeiten wurden die Zellen dekomprimiert und sofort TCA zugegeben, um weitere Reaktion zu stoppen. (s. Methoden). Die Enzymaktivität wurde signifikant durch die Gasexposition gesteigert und die Aktivität bei 345kPa N_2 war ungefähr halb so groß wie die bei 690kPa N_2 . Die dosisabhängige Steigerung der iNOS-Aktivität nach 30minütiger Exposition der Zellen gegenüber der verschiedenen Inertgase sind in der zweiten Reihe der Tabelle 2 dargestellt.

Wenn die murinen Neutrophilen nach der Behandlung mit OG für 30 Minuten gegenüber Luft + 690kPa N_2 exponiert wurden und danach [³H]-Arginin zugesetzt wurde, war die Konzentration des [³H]-Citruillin nach einstündiger Inkubation $1,76 \pm 0,08$ pmol ($n=24$). Dies war statistisch nicht signifikant unterschiedlich gegenüber der produzierten Menge nach initialer [³H]-Arginin-Gabe mit nachfolgender Druckexposition unter 690kPa N_2 für eine Stunde (Abbildung 3). In einer anderen Studienreihe wurden Neutrophile nach 30minütiger Exposition gegenüber Luft + 690kPa N_2 dekomprimiert und danach für 4 Stunden in normobarer Raumluft belassen, bevor [³H]-Arginin beigefügt wurde. Die Konzentration der [³H]-Citruillin nach diesem Procedere war $1,79 \pm 0,18$ pmol ($n=8$) und damit nichtsignifikant unterschiedlich gegenüber der einstündigen Inkubation, die in Abbildung 3 gezeigt wird. Daher schließen wir, daß die iNOS-

Aktivität für mindestens 4 Stunden nach Druckexposition (690kPa N_2 für 30 Minuten) erhöht bleibt.

Die Enzymaktivierung aufgrund der verschiedenen Inertgasexposition folgt einer Kinetik, die der der MP-Bildung gleicht. Die Zellen wurden für 30 Minuten den verschiedenen Gasen ausgesetzt und danach wurde [³H]-Arginin für insgesamt eine Stunde beigemischt, bevor die Reaktion mittels Gabe von TCA gestoppt wurde. Die Konzentration von [³H]-Citruillin nach der Exposition gegenüber 690kPa Helium betrug $0,66 \pm 0,11$ pmol ($n=7$; $p < 0,05$ vs. Kontrolle und vs. 690kPa N_2). Die Exposition gegenüber Argon zeigte eine Konzentration von $1,80 \pm 0,21$ pmol ($p < 0,05$ vs. Kontrolle und vs. Helium, ns vs. 690kPa N_2).

Die Aktivierung der iNOS geht mit der Bildung von Aktindimeren einher. Die Gesamtkonzentration der iNOS in Relation zu Aktin wurde nicht durch die Gasexposition verändert (Daten nicht dargestellt).

Die Analyse der iNOS-Dimer-Aktin-Relation in Western Blots zeigt einen dosisabhängigen Anstieg, der der Reaktion der Mikropartikel-Bildung sowie der [³H]-Citruillin-Produktion ähnelt. Im Vergleich zur Kontrolluntersuchung unter Raumluft zeigte die iNOS-Dimer/Aktin-Relation unter der Exposition gegenüber Luft+690kPa Helium für 30 Minuten einen Anstieg auf das $1,15 \pm 0,01$ -fache ($n=5$, $p < 0,05$ vs. Raumluft).

Die Exposition gegenüber Luft+ 690kPa Stickstoff erhöhte die Dimerbildung auf das $2,77 \pm 0,22$ -fache ($n=10$, $p < 0,05$ vs. Kontrolle und vs. Helium). Die Studienreihe mit der Hälfte des Partialdrucks (345kPa) zeigte einen Anstieg der Dimere auf das $1,24 \pm 0,06$ -fache ($n=3$; $p < 0,05$ vs. Luft und

690kPa N₂). Zellen unter Argonexposition (690kPa) zeigten eine Erhöhung der Dimere auf das $3,92 \pm 0,35$ -fache ($n=5$; $p<0,05$ vs. Kontrolle und Helium, ns vs. 690kPa N₂).

Wir benutzten die Studienreihe unter der Exposition gegenüber 690kPa Stickstoff als repräsentatives Inertgas, um herauszufinden, ob die Erhöhung der iNOS-Aktivität in murinen Neutrophilen in derselben Weise verhindert wird wie die Bildung von Mikropartikeln. Diese Daten sind in der zweiten Reihe von Tabelle 3 gezeigt. Wenn die Zellen während der Exposition gegenüber N₂ mit Ebselen inkubiert wurden stieg die iNOS-Aktivität nicht an. In anderen Studien konnten wir zudem zeigen, das Ebselen keinerlei inhibitorischen Effekt auf gereinigtes iNOS-Enzym hat und ein Partialdruck von 690kPa N₂ ebenfalls die Aktivität des gereinigten Enzyms nicht alteriert (Daten nicht gezeigt).

Daher kommen wir zu der Schlußfolgerung, daß Inertgas-getriggerte Ereignisse die intrazelluläre Aktivitätssteigerung der iNOS verursachen und diese durch die Zugabe eines Antioxidants gehemmt werden kann.

Wenn die Zellen mit dem iNOS-Inhibitor Nox2ds während der Stickstoffexposition inkubiert oder direkt nach der N₂-Exposition UV-Licht ausgesetzt wurden, konnte keine Steigerung der iNOS-Aktivität beobachtet werden (Tabelle 3). Auch wenn die Zellen mit Cytochalasin D, chemischen Inhibitoren von Rac oder FAK oder mit siRNA hinsichtlich VASP oder FAK inkubiert wurden, konnte keine Aktivitätssteigerung der iNOS aufgrund der N₂-Exposition mehr festgestellt werden. Ebenso wurde diese Aktivitätssteigerung durch die Hemmung von Flippase, Floppase oder PDI verhindert.

NAPDH-Oxidase-Aktivierung

Der hemmende Effekt von Nos2ds bei der gesteigerten Bildung von MP durch erhöhte Gasdrücke sowie die iNOS-Aktivierung implizieren eine starke Rolle für die NOS in diesen Vorgängen. Um diese Vermutung weiter zu untersuchen, setzten wir die Zellen für 30 Minuten den Inertgasen mit einem Druck von 690kPa aus, dekomprimierten sie anschließend und maßen den Sauerstoffverbrauch. Abbildung 4 zeigt den Effekt bei 690kPa Helium, Argon oder Stickstoff versus normobarer Raumluft sowie den Einfluß von Zugabe von 10µM Nos2ds während der Stickstoffexposition. Die Analyse des linearen Abschnitts der Sauerstoffverbrauchskurve – angegeben als $\mu\text{mol O}_2 \times 10^{-3} /$

min / 1×10^6 Neutrophile – zeigte einen Verbrauch der Kontrollgruppe unter Raumluft von $1,37 \pm 0,14$ ($n=11$). Eine rein hydrostatische Druckerhöhung führte zu keiner Veränderung des O₂-Verbrauchs, hier ergab sich ein Wert von $1,38 \pm 0,15$ ($n=3$). Eine Exposition gegenüber Helium führte zu einem Wert von $1,79 \pm 0,13$ ($n=4$; $p<0,05$ vs. Kontrolle). Die

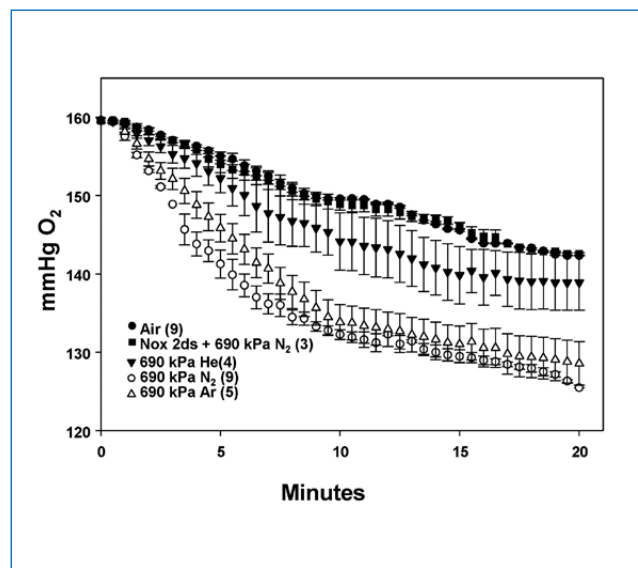


Abbildung 4
O₂-Verbrauch in murinen Neutrophilen nach 30minütiger Exposition gegenüber Luft (Kontrolle) oder Luft + 690kPa He, N₂ oder Ar. Die Daten zeigen die Veränderungen des O₂-Verbrauchs über 20 Minuten in einer Lösung mit $1,8 \times 10^5$ Neutrophilen direkt nach der Exposition gegenüber den verschiedenen Inertgasen als Durchschnitt $\pm$ Standardabweichung, die Probengröße ist jeweils angegeben (n). Zudem wird der Effekt einer Beimischung von 10µM Nox2ds während der Exposition mit Luft + 690kPa N₂ dargestellt. 10µM Nox2ds hatte zudem einen ähnlichen Effekt bei Exposition gegenüber Luft oder Luft + 690kPa He oder Ar und eliminierte hier dann fast den gesamten O₂-Konsum (nicht dargestellt).

Werte für N₂- und Argon-exponierte Zellen waren $5,00 \pm 0,36$ ($n=10$) und $5,83 \pm 0,35$ respektive ($n=5$; $p<0,05$ vs. Kontrolle und Helium; kein signifikanter Unterschied zwischen diesen beiden Inertgasen). Eine Gabe von 10µM Scrb-Nos2ds unter 690kPa N₂ führte zu einem O₂-Verbrauch von $4,98 \pm 0,24$ ($n=3$; $p<0,05$ vs. Kontrolle, ns vs. N₂). Eine Gabe von 10µM Nos2ds unter demselben Partialdruck führte hingegen zu einem Wert von $1,30 \pm 0,08$ ($n=3$; ns vs. Raumluft). Genau wie bei den Untersuchungen der

MP-Bildung und der iNOS-Aktivität konnte auch eine NOX-Aktivierungszunahme unter steigenden Partialdrücken beobachtet werden (Tabelle 2, dritte Reihe).

Da für die Messung des O_2 -Verbrauchs keine Vorbehandlung mit OG notwendig war, konnte ein eventueller Einfluß der OG-Behandlung auf eine druckinduzierte NOX-Aktivierung untersucht werden. In vier Untersuchungsreihen wurden die Zellen entweder Raumluft oder Luft + 690kPa N_2 für 30 Minuten ausgesetzt. Der O_2 -Verbrauch betrug $98 \pm 2\%$ des Konsums der Zellen, die nicht einer OG-Behandlung unterzogen wurden ($n=4$, ns).

Abbildung 2 stellt dar, wie die MP-Bildung nach der Exposition gegenüber hohen Partialdrücken noch für Stunden anhält. Ebenso zeigte sich eine weiterhin bestehende iNOS-Aktivierung für mindestens 4 Stunden nach der Gasexposition. Daher untersuchten wir die NOX-Aktivität in festgelegten Intervallen nach einer 30minütigen Exposition mit hohen Inertgas-Drücken. Auch hier zeigte sich eine Persistenz der Aktivitätssteigerung in den nachfolgenden 4 Stunden. Beispielsweise zeigten Zellen nach der Exposition gegenüber 690kPa N_2 für 30 Minuten mit nachfolgender Belassung bei normobarer Raumluft nach 4 Stunden einen O_2 -Konsum von $3,25 \pm 0,24 \times 10^{-3} \mu\text{mol/min}/1 \times 10^6$ Neutrophile ($n=6$; $p<0,05$ vs. Kontrolle). Dies entspricht einer Abnahme von ca. 35% gegenüber des Verbrauchs von Zellen, die direkt nach der Dekompression untersucht wurden.

NOX-Aktivität konnte nicht während der Gasexposition untersucht werden, da die Meßelektrode durch die Dekompression zerstört worden wäre. Daher wurde ein anderer Ansatz ausgewählt, um die Produktion von freien Radikalen zu untersuchen.

Generierung von freien Radikalen

Zu den murinen Zellsuspensionen wurde membranpermeables DCF-DA zugesetzt und die Zellen direkt danach einem Druck von 690kPa N_2 ausgesetzt. Abbildung 5 zeigt die Fluoreszenz-Untersuchungen während der Dekompression. Hierbei gab es einen rapiden Anstieg der Fluoreszenz, die nach ca. 10 Minuten ein Plateau bei 12126 ± 563 Einheiten erreichte ($n=12$). Die Erhöhung der DCF-Oxidation durch N_2 -Exposition konnte um 90% verringert werden, wenn die Zellen mit Nox2ds vorbehandelt wurden (Tabelle 3).

Im Vergleich zu dieser markanten Erhöhung der Fluoreszenz in Zellen unter Luft + 690kPa N_2 zeigte eine

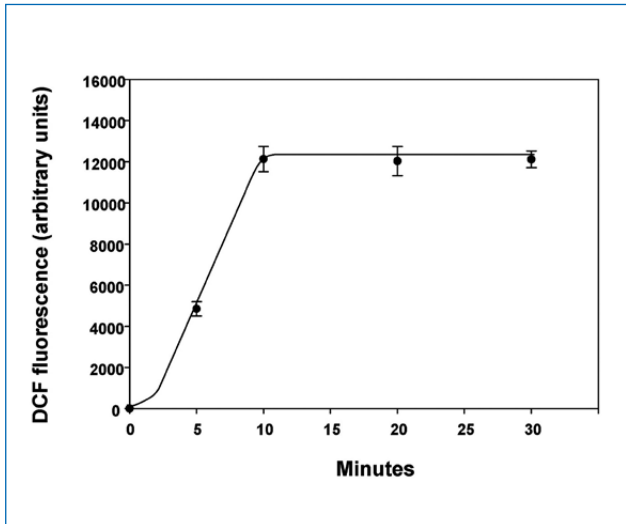
Kontrollgruppe unter Raumluft zwar ebenfalls einen Anstieg der DCF-DA vermittelten Fluoreszenz, dies führte aber nur zu einem Plateau bei $7,2 \pm 0,9$ Einheiten nach 10 Minuten ($n=11$; s. Abbildung 6; signifikanter Unterschied gegenüber der Exposition von 690kPa N_2). Bei den Zellreihen unter 690kPa Helium zeigte die Zugabe von DCF-DA einen Anstieg der Floreszenz auf ein Plateau von 3647 ± 345 Einheiten ($n=3$; $p<0,05$ vs. Kontrolle und vs. 690kPa N_2). Die gleiche Untersuchung mit 690kPa Argon zeigte ein Plateau von 14238 ± 589 Einheiten ($n=3$; $p<0,05$ vs. Kontrolle und He, ns vs. 690kPa N_2).

Zudem zeigten sich in der Zeit nach der Dekompression weiterhin bestehende erhöhte Fluoreszenzwerte, die jedoch deutlich geringer waren als die Werte während der Druckerhöhung (Abb. 6). Bei allen drei Gasen waren die Werte signifikant gegenüber der Raumluft-Kontrollgruppe erhöht. Zudem waren die Werte bei Stickstoff und Argon gegenüber Helium signifikant unterschiedlich, nicht jedoch zwischen diesen beiden Gasen.

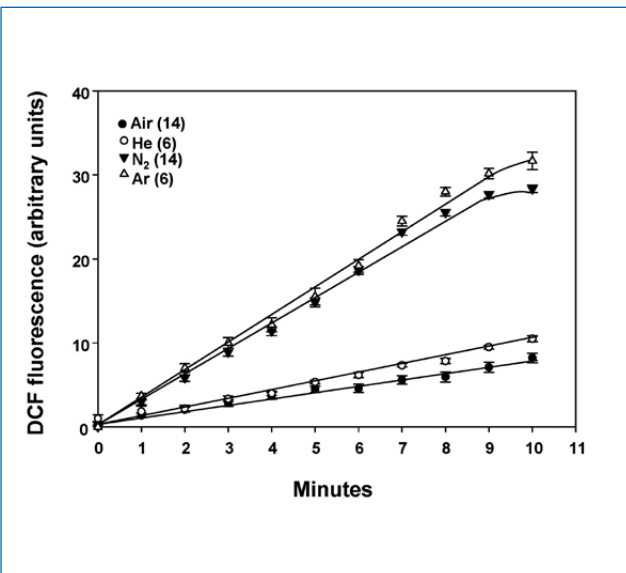
Diese Persistenz der Produktion von freien Radikalen konnte für mehrere Stunden nach der Dekompression nachgewiesen werden. Nachdem die neutrophilen Zellen für 30 Minuten unter erhöhten Gasdruck gesetzt wurden und nach der Dekompression für bis zu 4 Stunden in normobarer Raumluft gelassen wurden, konnte nach Zugabe von DCF-DA dieselben Werte für die DCF-Fluoreszenz nachgewiesen werden wie in Abbildung 6 gezeigt. Beispielsweise lagen die Werte für Zellen nach der Exposition gegenüber 690kPa N_2 während der Exposition bei einer erhöhten Rate von $3,69 \pm 0,18$ pro Minute, während die Zellen nach Dekompression und 4stündiger Ruhe eine Erhöhung der Rate von $3,87 \pm 0,46$ Einheiten / Minute zeigten ($n=5$; $p<0,05$ vs. Luft sowie ns vs. Zellen direkt nach der N_2 -Exposition).

Das Plateau der Fluoreszenz nach ca. 10minütiger Inkubationszeit während der Kompressionsphase (s. Abb. 5) lag nicht an einer unzureichenden Konzentration des DCF-DA da eine Verdopplung der Konzentration keinerlei Erhöhung der Werte zeigte (Daten nicht dargestellt). Zudem konnte in der Zell-Kontrollgruppe ein Überschuß an nicht-oxidiertem DCF-DA nachgewiesen werden. Wenn zudem nach der 10minütigen Inkubationszeit 0,5mM H_2O_2 zugesetzt wurde, nahm die Fluoreszenz auf $72,0 \pm 2,2\%$ zu ($n=4$).

Da die Studien mit DCF-DA keine Vorbehandlung mit OG benötigten, konnte zudem untersucht werden,

**Abbildung 5**

Western Blot mit biotinylierten Proteinen. Zellysate mit murinen Neutrophilen wurde gegenüber Luft oder Luft + 690kPa N₂ für 30min exponiert und dann entsprechend dem Biotin-switch-Assay vorbereitet. Das gesamte Gel wird hier gezeigt.

**Abbildung 6**

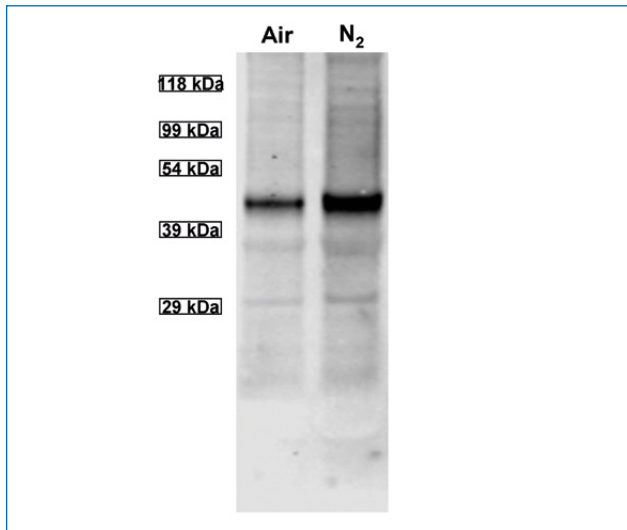
DCF-Fluoreszenz in murinen Neutrophilen nach Exposition gegenüber 690kPa N₂. 10μM DCF-DA wurden den Suspensionen mit je 1,8x10⁵ Neutrophilen zugesetzt und diese danach 690kPa N₂ ausgesetzt. Die jeweiligen Zeiträume sind auf der Abszisse angegeben. Die Fluoreszenz wurde direkt nach der Dekompression der Zellen gemessen. Die Daten sind als Durchschnittswerte ± Standardabweichung angegeben, n = 3-12 für jeden Wert.

ob die OG-Zugabe einen Einfluß auf die Produktion von freien Radikalen bei erhöhten Partialdrücken von Inertgasen hat. Es wurden Zellen mit der OG-Behandlung denjenigen ohne diese Behandlung gegenübergestellt (im folgenden als normal bezeichnet). Ausgedrückt als OG/Normal DCF-Fluoreszenz bestanden nach 10minütiger Inkubation keine statistisch signifikanten Unterschiede der ermittelten Werte. Ebenso nicht in den nachfolgenden Stunden. Beispielsweise betrugen die Durchschnittswerte nach 10minütiger Inkubation in der Raumluft-Kontrollgruppe 108±6%, nach 10minütiger Exposition gegenüber 690kPa Helium 98±8%, nach 690kPa N₂ 99±3% und nach 690kPa Argon 102±6%.

Wir evaluierten zudem den Einfluß einer Reihe von Manipulationen auf die DCA-DA Fluoreszenz unter der Referenz-Gasexposition von 690kPa N₂ (Tabelle 3). Nach Exposition gegenüber UV-Licht direkt nach der Dekompression war die DCF-Fluoreszenz stark vermindert. Ähnlich stellten sich die Ergebnisse nach der Zugabe von 1400W, Ebselen, Cytochalasin D, RAC- und FAK-Inhibitoren sowie der Zugabe von siRNA gegen VASP und FAK dar. Die N₂-induzierte Zunahme von freien Radikalen wurde um ca. 90% verringert. Das gleiche Ergebnis konnte durch die Hemmung oder Elimination der Flippase, Floppase oder der PDI erreicht werden.

Aktin-S-Nitrosylierung in N₂-exponierten Zellen

Die Identifizierung der Rolle von iNOS und NOX hinsichtlich der MP-Produktion suggeriert, daß hierfür die Bildung von freien Radikalen durch eine Interaktion von NO und ROS notwendig ist. Viele der hochreaktiven freien Radikale können eine Protein-S-Nitrosylierung verursachen. S-Nitrosylierung von Proteinen in murinen Neutrophilen wurde durch den „Biotin-Switch-Assay“ untersucht, bei dem Biotin per Disulfid-Brücke an die instabile Stelle der S-Nitrosylierung der Proteine gebunden wurde. Diese Untersuchung wurde an Zellen durchgeführt, die entweder gegenüber normobarer Raumluft (Kontrollgruppe) oder gegenüber Luft + 690kPa N₂ für 30 Minuten exponiert wurden. Abbildung 7 zeigt einen Western Blot, der mit biotinhaltenen Proteinen dieser beiden Gruppen durchgeführt wurde. In einer anderen Untersuchung wurde die prominente Bande bei ca. 42kDa aus dem Nitrozellulosepapier ausgeschnitten und einer Aminosäuresequenzierung unterzogen. Sie wurde hierbei als Aktin identifiziert. Wenn der Western Blot an Zellen durchgeführt wurde, die vorher einer Behandlung mit N-[6-(biotinamido)hexyl]-3`-(2`-pyridyldithio)-propionamid-Biotin oder

**Abbildung 7**

DCF-Fluoreszenz in murinen Neutrophilen nach der 30minütigen Exposition gegenüber Luft oder Luft + 690kPa He, N₂ oder Ar. Suspensionen mit $1,8 \times 10^5$ Neutrophilen und $10 \mu\text{M}$ DCF-DA wurden den angegebenen Gasen für je 30 Minuten ausgesetzt, dekompriert und die Fluoreszenz für 10 Minuten gemessen, während die Zellen in normobarer Raumluft belassen wurden. Die Werte zeigen die Fluoreszenz abzüglich der Werte, die direkt nach der Dekompression ermittelt wurden (z.B. wurden die Werte für N₂ jeweils um 12 126 reduziert wie in Abb. 6 angegeben). Die Daten sind als Durchschnittswerte $\pm$ Standardabweichung angegeben, die Probengröße wie angegeben (n).

mit Ascorbat unterzogen wurden (aber nicht mit beiden Substanzen simultan), oder denen 1mM HgCl_2 zugesetzt worden war, konnte die Bande nicht hervorgerufen werden (Daten nicht dargestellt).

In mehreren Untersuchungen wurde die Größenordnung des SNO-Aktin durch Messung der Biotin-Band-Dichte evaluiert. Wie in Tabelle 4 dargestellt, kam es bei Zellen, die vor der Untersuchung UV-Licht ausgesetzt waren oder die während der N₂-Exposition 1400W , Nox2ds oder Cytochalasin D beigelegt bekamen, zu keinerlei Erhöhung des SNO-Aktingehalts.

Aktinpolymerisation in permeablen Neutrophilen

Die bisher eruierten Ergebnisse implizieren, dass die Inertgas-induzierte MP-Bildung auf einer komplexen Interaktion verschiedener Stoffe inklusive Aktinpolymerisation beruht, da dieser Prozeß durch Zytocalasin D oder die Hemmung von Proteinen wie VASP

inhibiert werden kann. Daher untersuchten wir, ob die Exposition gegenüber erhöhten Inertgaspartialdrücken die Dynamik der Aktinpolymerisation veränderte (hier als „free barbed end“-Formation, FBEs, untersucht). Diese Untersuchung wurde an murinen Neutrophilen durchgeführt, die mittels OG permeabel gemacht worden und anschließend mit Pyren-Aktin inkubiert wurden. Dies erfolgte nach einer 30minütigen Druckexposition gegenüber Raumluft (Kontrolle) oder Luft + 690kPa He, N₂ oder Ar.

Gemessen in Fluoreszenz-Erhöhung/Minute in Relation zur Kontrollgruppe waren die Werte bei Helium-exponierten Zellen $7,1 \pm 1,2$ -fach erhöht ($n=4$; $p<0,05$ vs. Kontrolle), bei N₂-exponierten Zellen $18,6 \pm 2,4$ -fach erhöht ($n=12$, $p<0,05$ vs. Kontrolle und vs. He) und bei Ar-exponierten Zellen $18,3 \pm 2,7$ -fach erhöht ($n=4$, $p<0,05$ vs. Kontrolle und vs. He; ns vs. N₂).

Auch in dieser Untersuchungsreihe wurde die Auswirkung von verschiedenen Manipulationen auf die Rate der Aktinpolymerisation bei Raumluft und unter 690kPa N₂ evaluiert (Tabelle 3). Wenn die Zellen mit 1400W , Ebselen oder Nox2ds während der N₂-Exposition versetzt oder direkt danach UV-Licht ausgesetzt wurden, blieb die Rate der Aktinpolymerisation auf dem Niveau der Kontrollgruppe. Dies galt ebenso für den Zusatz von chemischen Inhibitoren gegenüber Rac oder FAK sowie der Hemmung von VASP oder FAK mittels siRNA. Ebenso konnte die erhöhte Polymerisationsrate durch Hemmung von Flippase, Floppase oder PDI verhindert werden.

Die Daten der Abb. 2 zeigen, daß die Bildung von MP für über 4 Stunden nach der N₂-Exposition anhält. Wenn OG-vorbehandelte Zellen für 30 Minuten unter Luft + 690kPa N₂ komprimiert wurden und nach der Dekompression für vier Stunden unter normobarer Raumluft belassen wurden bevor Pyren-Aktin zugesetzt wurde, dann war die Rate der Fluoreszenz-Erhöhung $7,89 \pm 0,66 \times 10^3$ Einheiten pro Minute ($n=3$). Diese Erhöhung war derjenigen vergleichbar, die direkt nach der Stickstoffexposition auftrat (Tab. 3).

Proteinquervernetzung und Immunoprecipitation

Die Proteinhemmung und -depletion durch chemische Inhibitoren oder siRNA ist in Tabelle 3 dargestellt. Der Biotin-Switch-Assay, der zur Messung der S-Nitrosylierung des Aktins benutzt wurde (Abb. 7) sowie die Veränderungen im FBE-Gehalt implizieren, daß Aktin und sein Umsatz essentiell für die MP-Bildung ist. Daher untersuchten wir die

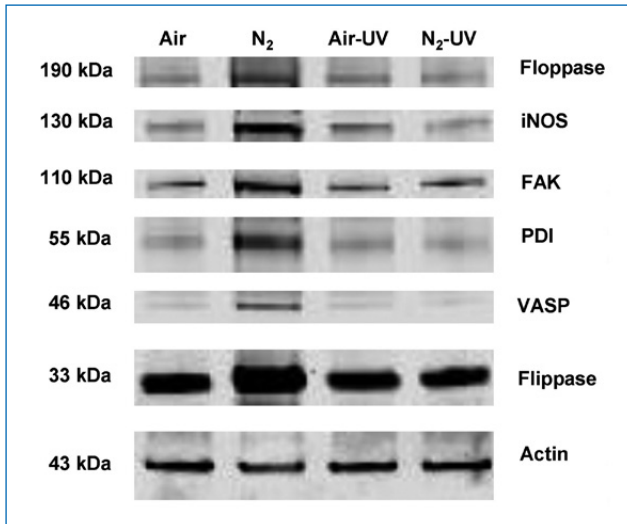


Abbildung 8
Proteinverbindungen in der tritonlöslichen kurzen-F-Aktin-Fraktion. Murine Neutrophile wurden gegenüber Luft (Kontrolle) oder 690kPa N₂ für 30 Minuten exponiert. Wo angegeben wurden die Proben dann für 5 Minuten UV-Licht ausgesetzt. Allen Proben wurden dann DTSP zur Quervernetzung der Proteine zugefügt und danach hinsichtlich der Tritonlöslichkeit fraktioniert (s. Material und Methoden) und per Western Blot untersucht. Hier wird ein repräsentativer Blot aus einer insgesamt fünffachen wiederholten Untersuchung gezeigt. Die hieraus ermittelten Daten werden in Tabelle 4 dargestellt.

Wechselwirkung zwischen zytoplasmatischem Aktin und Proteinen, die ebenfalls eine Rolle in der Entstehung der Mikropartikel zu haben scheinen. Nachdem die Zellen für 30 Minuten gegenüber Raumluft (Kontrolle) oder Luft + 690kPa N₂ exponiert wurden, wurden sie mit dem membranpermeablen Proteinvernetzer DTSP versetzt und nach weiteren 30 Minuten lysiert. Die Zellysate wurden dann in tritonlösliche, tritonunlösliche und kurz-Filament-(sF)-Fraktionen separiert. Nachfolgende Western Blots wurden auf verschiedene Banddichten in Relation zu Aktin hin analysiert. Zudem wurde geprüft, ob eine Bestrahlung mit UV-Licht für 5 Minuten vor der Zugabe von DTSP einen Unterschied machte. Ein repräsentativer Western Blot ist in Abb. 8 dargestellt; die quantitativen Ergebnisse in Tabelle 5. Es konnte eine Erhöhung in der sF-Aktin-Relation in den N₂-exponierten Zellen festgestellt werden. Dahingegen konnten in den Untersuchungen bezüglich Tritonlöslichkeit und -unlöslichkeit keine Erhöhung, sondern sogar eine Erniedrigung der Werte in Zellen nach Stickstoffexposition beobachtet werden. Diese Veränderungen

wurden in den Zellen, die UV-Licht ausgesetzt waren, nicht beobachtet (Tab. 5).

In einer weiteren Untersuchung wurde die sF-Aktin-Zellreihe einer Immunoprecipitation mittels Anti-Aktin-Antikörper unterzogen. Wie in Tab. 6 dargestellt triggerte die N₂-Exposition mehrere der Interaktionen mit zytoplasmatischem Aktin, die zuvor durch die DTSP-Quervernetzung identifiziert worden war.

Singulett-O₂-Detektion

Der auslösende Mechanismus des oxidativen Stress im Rahmen der Inertgasexposition von neutrophilen Zellen bleibt unklar. Da eine Interaktion zwischen Inertgasen und O₂ zur Bildung von Singulett-O₂-Molekülen führen kann suchten wir nach Hinweisen hierfür in den Neutrophilen-Suspensionen (15,16). Tabelle 7 zeigt die Fluoreszenz, die nach einer Behandlung der Zellen mit Singulett-Oxygen-Sensor-Green (SOSG) und nachfolgender Druckgasexposition entstanden ist. Diese Daten demonstrieren die Effekte nach einer 5minütigen Druckerhöhung. Diese Exposition zeigte hierbei dieselben Größenordnungen der Fluoreszenzerhöhung wie eine 30minütige Druckexposition der Zellen. Diese Steigerung konnte in der raumluftexponierten Kontrollgruppe nicht nachgewiesen werden.

Es konnte in diesen Versuchsreihen eine dosisabhängige Korrelation gegenüber der Exposition mit Stickstoff festgestellt werden (Tab. 7). Die Höhe der Singulett-O₂-Entstehung hängt von einer Reihe von Variablen ab (16). Um Unterschiede zwischen der Potenz der Gase auszuschließen wurde diese Untersuchung mit den verschiedenen Inertgasen durchgeführt. Die Erhöhung der Fluoreszenz war bei Argon ungefähr gleich der bei Stickstoff und beide waren höher wie bei Helium. N₂O und SF₆ generierten hingegen nur vereinzelte Singulett-O₂-Moleküle.

Wenn die Zellsuspensionen unter 690kPa N₂ druckexponiert wurden und hierbei 2mM Azid oder 1 mM Ascorbat beigefügt wurde (Substanzen die O₂-Singulett eradizieren), wurde die Entstehung der Fluoreszenz um 93,8±2,2% (n=3; p<0,05) respektive um 91,1±2,8% (n=6; p<0,05) vermindert (37,38). Eine gleichwertige Verminderung der Fluoreszenzentstehung konnte in Versuchsreihen mit Argon beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen ist die Tatsache, daß die Gabe von Aziden oder Ascorbat zu murinen neutrophilen Suspensionen vor der Kompression mit Luft + 690kPa N₂ für 30 Minuten zu keinerlei Erhöhung der Bildung von Mikropartikeln nach 4 Stunden

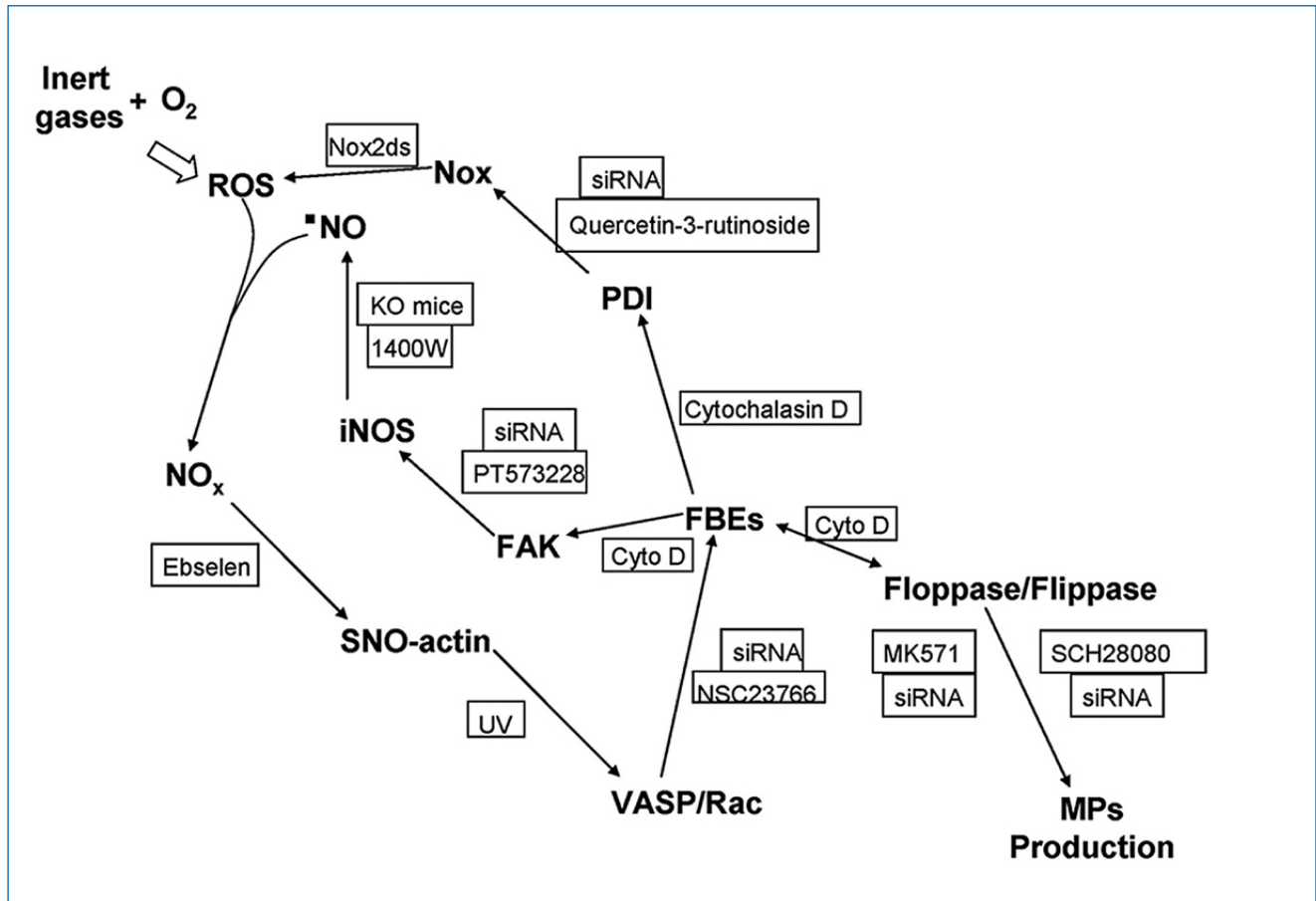


Abbildung 9

Schema des angenommenen Mechanismus der Gasinduzierten Mikropartikel-Bildung durch Neutrophile.

Siehe die Diskussion für eine detaillierte Erklärung. Die hier benutzten Abkürzungen sind: O₂ zeigt den O₂-Gehalt in luft-gesättigten Lösungen an; ROS: reaktive Sauerstoffspezies; NOx zeigt hochreaktive Stickstoffspezies wie N₂O₂ und Peroxynitrit an; SNO-Aktin: S-nitrosyliertes kurz-Filament-Aktin; VASP: vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein; Rac, Rac1 und 2: GTPasen; FBEs: freie gesplittete Aktinenden als Indikator eines Aktinumsatzes; FAK: fokale Adhäsionskinase; PDI: Proteindisulfid-Isomerase; NOX: NADPH-Oxidase. Die Untersuchungen der verschiedenen Proteine beinhalteten Neutrophile, die mit siRNA inkubiert wurden um den intrazellulären Gehalt des Proteins zu verringern das am nächsten zu den Pfeilen angegeben ist. KO-Mäuse (iNOS-knockout) und die eingeklammerten Substanzen sind Inhibitoren des jeweiligen Pfeiles im angezeigten Schema (Cyto D steht für Cytochalasin D).

den Ruhezeit im Vergleich zur Kontrollgruppe unter Raumluft führte. Der Gehalt an Mikropartikeln in Proben mit Ascorbat war nur $7,6 \pm 9,9\%$ höher wie in der Kontrollgruppe ($n=3$; ns) und in Proben mit Aziden betrug der Gehalt nur $13,7 \pm 8,8\%$ mehr wie in der Kontrollgruppe ($n=3$; ns). Wenn das Ascorbat jedoch erst nach der Exposition gegenüber Stickstoff beigefügt wurde, zeigte sich erwartungsgemäß keine Hemmung der MP-Produktion in den Zellsuspensionen während der 4stündigen Untersuchungsdauer (Daten nicht dargestellt).

N₂O und SF₆ stimulierten ebensowenig die Bildung von MP, wie sie eine Generierung von O₂-Singulets hervorriefen. Nach 4 Stunden nach Druckexposition gegenüber Luft + 690kPa N₂O für 30 Minuten war der MP-Gehalt nur um $0,8 \pm 2,3\%$ gegenüber der Kontrollgruppe erhöht ($n=8$; ns). Ebenso war der MP-Gehalt nach einer Exposition gegenüber SF₆ und der gleichen Druckexposition sogar um $17,8 \pm 6,3\%$ gegenüber der Kontrollgruppe erniedrigt ($n=8$; ns).

Diskussion

Die Studienergebnisse demonstrieren eine Entstehung von Mikropartikeln durch humane und murine Neutrophile durch die Exposition gegenüber hohen Drücken von Stickstoff oder Edelgasen. Ein überraschender Unterschied zwischen human und murinen Zellen ist die persistierende Bildung von MP für ein 4stündiges Intervall durch letztere, egal ob die Druckexposition nach 30 Minuten beendet wird oder nicht. Welche Mechanismen diese Persistenz in humanen Zellen verhindert ist nicht bekannt. Diese Veröffentlichung zeigt deutlich, daß die MP-Bildung viele Komponenten besitzt und daher eine Vielzahl von regulatorischen Kontrollmechanismen möglich ist.

Die MP-Bildung ist eine Antwort auf oxidativen Stress und benötigt eine Aktivierung von iNOS und NOX. Die Dosisabhängigkeit unter N_2 auf verschiedenen Partialdruckniveaus zeigt eine grobe Linearität für die Aktivitätssteigerung der beiden Enzyme (Tabelle 2). Die Reihe der inhibitorischen Interventionen, die in Tab. 3 dargestellt sind, suggeriert eine Abhängigkeit der verschiedenen intrazellulären Prozesse voneinander. Beispielsweise führt eine Exposition gegenüber 690kPa N_2 zu einer Erhöhung der Aktinpolymerisation und die Hemmung dieses Prozesses durch Cytochalasin D inhibiert gleichzeitig die Entstehung von Mikropartikeln sowie die Aktivierung von iNOS und führt zu einer Erhöhung der DCF-Fluoreszenz, die indirekt eine NOX-Aktivierung darstellt. Dieses Schema führt zu der Folgerung, daß die MP-Bildung durch einen autokatalytischen Zyklus geschieht. Abbildung 9 stellt ein Schema dieses Zyklus dar, das auf unseren Studienergebnissen basiert.

Das initiale Ereignis, das den oxidativen-Stress-Zyklus initiiert, ist in der oberen linken Ecke von Abb. 9 abgebildet. ROS werden durch die Kollision von Inertgasen mit Sauerstoff generiert. Diese Entstehung u.a. von O_2 -Singulett wird durch die Molekülgröße der beteiligten Gase und deren Polarisationspotential beeinflusst; hierbei ist Argon potenter als Stickstoff und dieses wiederum potenter als Helium (15,16).

Die physikalischen Eigenschaften der in dieser Untersuchung verwendeten Gase sind in Tabelle 8 dargestellt. Moleküle mit einem van-der-Waals-Volumen über 35 ml/mol sind weniger potent, daher wurden zusätzlich Untersuchungsreihen mit SF_6 durchgeführt (39). Der Entstehungsprozeß von ROS zeigt zudem eine starke Abhängigkeit von der Löslichkeit

der Gase und ist vermutlich größer in anhydratischen intrazellulären Räumen. Zudem besteht eine Abhängigkeit von der Mobilität der Elektronendensität der Gase sowie des orbitalen „Overlay“ mit O_2 (deutliche Unterschiede bestehen hierbei z.B. zwischen N_2 und N_2O) (15).

Die Rolle des O_2 -Singulett als der „initiale Funke“ im Schema der Abb. 9 wird durch die inhibitorischen Effekte von Azid und Ascorbat auf die N_2 -induzierte Entstehung von MP unterstützt.

Andere Untersuchungen haben bereits gezeigt, daß O_2 -Singulett eine Aminosäuren-Oxidation sowie eine Nitrosylierung (unter Zugabe von Nitrit) bewirken können, welche den Ablauf in Abb.9 initiieren könnten (40,41). Während sowohl Azid als auch Ascorbat wirkungsvoll O_2 -Singulett abfangen können, sind sie doch in den in dieser Studie benutzten Konzentrationen nur eingeschränkt in der Lage, hochreaktive ROS, $\cdot NO$ und andere Substanzen wie z.B. Peroxynitrit abzufangen (42,43). Dies stimmt mit den Ergebnissen unserer Untersuchung überein das Ascorbat kein effektiver Hemmstoff für die Bildung von MP war, wenn es erst nach der Exposition der murinen Neutrophilen gegenüber hohen Stickstoffpartialdrücken zugegeben wurde.

Die Ergebnisse zeigen zudem, das Neutrophile zu der Bildung von MP durch komprimierte Gase angeregt werden können, nicht aber durch rein hydrostatischen Druck. Die Potenzreihe $Ar \sim N_2 > He$ folgt der etablierten Meyer-Overton-Reihe. In dieser ist N_2 zwar kein Edelgas, wird aber trotzdem aufgrund seiner Molekülgröße und seines Öl-Gas-Verteilungskoeffizienten trotzdem hierunter eingeordnet. SF_6 zeigt eine größere narkotische Potenz (ca. 8,5fach stärker als N_2 ; im Vergleich ist N_2O ca. 39fach stärker) (44). Unsere Ergebnisse zeigen klar das oxidativer Stress und die Bildung von MP durch komprimierte Gase in Relation zu ihrer narkotischen Potenz entstehen.

Abbildung 9 zeigt einen Prozeß, der um die Aktinpolymerisation herum aufgebaut ist (als FBEs dargestellt) und den wir bereits in vorhergehenden Untersuchungen beschrieben haben. Hierbei führt die S-Nitrosylierung zu einem exzessiven Aktin-FBE-Umsatz (24,29). Exposition gegenüber hohen Drücken von N_2 oder Edelgasen verursacht eine erhöhte Produktion von $\cdot NO$ durch iNOs und von ROS durch NOX. Reaktive Stickstoffspezies wie NO_2 und Peroxynitrit entstehen und führen zu einer SNO-Aktin-Formation, wie es im Biotin-Switch-Assay dargestellt werden konnte (Abb. 7). In früheren Studien

Tabelle 4. SNO-Aktin / β -Aktin-Banddichte von Luft- und 690kPa-N₂-exponierten Neutrophilen.

Incubation/intervention	AIR	N ₂
PBS	1.00 ± 0.00 (5)	2.50 ± 0.34 (5) *
UV	1.03 ± 0.11 (3)	1.07 ± 0.17 (3)
Cytochalasin D	1.22 ± 0.04 (3)	1.10 ± 0.05 (3)
Nox 2ds	0.99 ± 0.09 (3)	1.08 ± 0.14 (3)
1400 W	1.04 ± 0.04 (3)	1.08 ± 0.09 (3)

Die Werte zeigen die Banddichte der Western Blots von Zelllysaten, die entweder gegenüber Luft oder Luft + 690kPa N₂ für 30 Minuten exponiert waren und danach einem Biotin-Switch-Assay unterzogen wurden. PBS: Zellen mit reiner Puffer-Inkubation während der Luft-/N₂-Exposition; UV: Exposition gegenüber 5 Minuten UV-Licht nach der Luft-/N₂-Exposition. Weitere dargestellte Interventionen waren 5 μ M Cytochalasin D, 1mM 1400W oder 10 μ M Nox2ds während der Luft-/N₂-Exposition. Alle Werte sind als Durchschnitt $\pm$ Standardabweichung dargestellt, n = Nummer der jeweiligen untersuchten Proben; * = p<0,05 vs. Kontrollgruppe.

Tabelle 5. Proteinverbindungen (durch DTSP-Quervernetzung) von sF-Aktin, G-Aktin und tritonunlöslicher Aktinfraktion in Neutrophilen unter Exposition gegenüber Luft (Kontrolle) oder 690kPa N₂ für 30 Minuten.

sF-actin	VASP/actin	FAK/actin	iNOS/actin	Flip/actin	Flop/actin	PDI/actin
690 kPa N ₂	4.68 ± 1.21*	2.91 ± 0.39*	2.79 ± 0.29*	2.48 ± 0.45*	3.28 ± 0.68*	4.03 ± 0.43*
Air + UV	1.10 ± 0.11	1.09 ± 0.08	1.22 ± 0.08	1.02 ± 0.07	1.19 ± 0.15	1.11 ± 0.04
N ₂ + UV	0.86 ± 0.11	0.96 ± 0.08	1.38 ± 0.37	1.01 ± 0.15	1.17 ± 0.26	0.88 ± 0.11-

G-actin	VASP/actin	FAK/actin	iNOS/actin	Flip/actin	Flop/actin	PDI/actin
690 kPa N ₂	0.12 ± 0.05*	0.19 ± 0.05*	0.27 ± 0.08*	0.17 ± 0.06*	0.45 ± 0.13*	0.36 ± 0.08*
Air + UV	0.92 ± 0.05	0.99 ± 0.09	1.58 ± 0.43	0.87 ± 0.02	1.03 ± 0.22	1.08 ± 0.13
N ₂ + UV	0.89 ± 0.16	1.13 ± 0.19	1.45 ± 0.29	0.81 ± 0.14	1.07 ± 0.15	1.33 ± 0.24

Triton-insoluble	VASP/actin	FAK/actin	iNOS/actin	Flip/actin	Flop/actin	PDI/actin
690 kPa N ₂	0.16 ± 0.06*	0.19 ± 0.06*	0.22 ± 0.10*	0.29 ± 0.09*	0.35 ± 0.13*	0.20 ± 0.03*
Air+ UV	1.15 ± 0.22	1.14 ± 0.10	1.46 ± 0.27	1.56 ± 0.30	0.97 ± 0.01	0.96 ± 0.06
N ₂ + UV	0.916 ± 0.20	0.93 ± 0.17	0.94 ± 0.18	1.32 ± 0.22	1.03 ± 0.15	0.75 ± 0.13

Die dargestellten Werte sind Relationen, die aufgrund der Banddichte der jeweiligen Proteine in Bezug auf die Aktin-Banddichte in der jeweiligen Probe ermittelt wurden. In jeder Tabelle sind die Werte gegenüber der Banddichte der luftexponierten Kontrollgruppe der jeweiligen Untersuchungsreihe standardisiert, d.h. ein Werte größer 1,0 zeigt eine Erhöhung der Proteinvernetzung mit Aktin an, während ein Wert unter 1 eine geringere Proteinvernetzung darstellt. Wenn angezeigt wurden die Zellen für 5 Minuten UV-Licht ausgesetzt bevor das STSP beigefügt wurde und danach hinsichtlich der Tritonlöslichkeit aufgeteilt (s. Methoden). Die Daten sind als Durchschnittswerte $\pm$ Standardabweichung dargestellt (n=5 bei allen Reihen), * zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied gegenüber der raumluftexponierten Kontrollgruppe an (p<0,05, ANOVA).

Tabelle 6. Immunoprecipitation der short-F-Aktin-Fraktion in murinen Neutrophil-Zelllysaten nach der Exposition gegenüber 690kPa N₂ für 30 Minuten versus der luftexponierten Lysaten (Kontrolle als Protein/Aktin-Ratio = 1 gesetzt).

	VASP/actin	FAK/actin	iNOS/actin	Flip/actin	Flop/actin	PDI/actin
690 kPa N₂	1.61 ± 0.24*	2.15 ± 0.20*	1.57 ± 0.34*	1.38 ± 0.21	1.36 ± 0.41	0.99 ± 0.11
N₂ + UV	0.88 ± 0.20	1.11 ± 0.14	1.19 ± 0.24	0.85 ± 0.20	1.49 ± 0.43	0.84 ± 0.09
Control/UV	1.17 ± 0.17	1.21 ± 0.19	1.13 ± 0.27	1.02 ± 0.11	0.96 ± 0.24	1.26 ± 0.11

Die short-F-Aktin-Fraktion wurde aus den Neutrophilen isoliert und mittels Aktin-Antikörpern einer Immunoprecipitation unterzogen. Wenn angezeigt wurden die Zellen nach der N₂- oder Luftexposition und vor der Lyse für 5 Minuten UV-Licht ausgesetzt. Western Blots wurden angelegt und die Werte als Verhältnis der Protein-Banddichte versus der Aktin-Banddichte angegeben. Diese wurden dann hinsichtlich der Werte der Kontrollgruppe als Verhältnis angegeben, d.h. der Wert der Kontrollgruppe (raumlufteponiert ohne UV-Licht) wurde als 1 gesetzt. Die Werte sind als Durchschnitt ± Standardabweichung angegeben (n=6), * = p<0,05 ANOVA.

Tabelle 7. Singlet-O₂-sensor-green (SOSG)-Fluoreszenz in Neutrophil-Suspensionen nach Gasexposition.

Air	Air +						
	186 kPa N ₂	345 kPa N ₂	690 kPa N ₂	690 kPa Ar	690 kPa He	690 kPa SF ₆	690 kPa N ₂ O
0 ± 0 (26)	441 ± 5 (3)*	4101 ± 260 (3)*	6237 ± 243 (11)*	5253 ± 259 (6)*	1309 ± 152 (6)*	27 ± 84 (6)	212 ± 97 (6)*

Zellen wurden für 30 Minuten mit SOSG inkubiert und danach gegenüber Luft + den angegebenen Gasen für 5 Minuten exponiert. Die Werte zeigen die Fluoreszenz nach der Gasexposition. Sie sind als Durchschnitt ± Standardabweichung angegeben, die Probengröße ist in der Tabelle gezeigt. * = p<0,05 vs. Luft (ANOVA); 690kPa N₂ und Ar-Werte sind statistisch signifikant unterschiedlich gegenüber den Werten bei 690kPa He, SF₆ und N₂O. Zudem sind alle N₂-Werte signifikant voneinander unterschiedlich (ANOVA).

Tabelle 8. Physikalische Eigenschaften der in dieser Studie benutzten Gase.

Gas	MW (g/mol)	Van der Waals volume (ml/mol)	Polarizability (10 ⁻²⁴ cm ³)	Oil:gas partition coefficient
He	4	11.9	0.21	0.016
N ₂	28	15,8	1,74	0,069
Ar	40	16.8	1.64	0.13
N ₂ O	44	18,9	3,03	1,4
SF ₆	146	46.8	6,54	0,293

Die Werte sind aus (39, 68, 69); MW = Molekulargewicht.

beschrieben wir, das VASP eine höhere Affinität gegenüber S-nitrosylierten short-Aktin-Filamenten zeigt und dies die Aktinpolymerisation beschleunigt (24,29). VASP verbindet zudem die Proteine Rac, PKA und PKG in unmittelbarer Nähe zu kurzen Aktinfilamenten und die daraufhin entstehende Rac-Aktivierung erhöhte die Formation von FBEs. Dieser Prozeß führt dann zu einer erhöhten Verbindung von FAK und short-Aktin-Filamenten. FAK unterstützt zudem die Verbindung von iNOS und Aktinfilamenten und nach der Bildung der Aktin-Dimerform wird die Enzymaktivität gesteigert.

Ein Paradigma für die Bildung von MP beinhaltet die Exposition von Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche als Konsequenz der Translokalisierung durch aktivierte Floppase(n) (45) sowie der Inhibition von Flippase(n) (46) und der Aktivierung von Scramblase durch einen Calciumeinfluß (47,48). Unsere Ergebnisse zeigen, daß Inhibition oder Depletion von Flippase und Floppase die MP-Generierung inhibieren. Die Störung dieser Enzyme behindert stark den Produktionsprozess. Überraschenderweise zeigte sich zudem, daß die Hemmung dieser Enzyme die Bildung von FBEs behindert und daß der aktinbasierte Zyklus die Entstehung von reaktiven Spezies involviert (Tab. 3). Daher wurde in Abb. 9 ein Doppelpfeil in diesem Abschnitt verwendet. Wie diese Enzyme zudem den Aktinumsatz beeinflussen muss in weiterführenden Studien untersucht werden.

Die Ergebnisse zeigen, daß Aktinfilamente für die Aktivierung der NOX benötigt werden, dies wurde auch in anderen Untersuchungen beschrieben (49). Die Persistenz der NOX-Aktivität und der Produktion von freien Radikalen – durch die DCF-Fluoreszenz dargestellt – führte zu der Untersuchung der Rolle der PDI in der Entstehung von MP. Die Daten in Tab. 3 deuten auf eine Verbindung zwischen Aktinumsatz (FBE-Bildung), FAK und der Produktion von reaktiven Spezies hin. Wie die NOX im Rahmen dieses laufenden Prozesses aktiviert werden kann ist unklar. Bei FAK ist eine Interaktion mit der NOX-Aktivität in mehreren Studien nachgewiesen worden, jedoch ist eine direkte Verbindung zwischen FAK und NOX noch unbekannt (50-52). Es gibt Hinweise für eine Störung des Zytoskeletts mit nachfolgender Modifizierung der PDI-Aktivität. Oxidierte PDI verstärkt zudem die Aktivität von NOS (53,54). Unsere Ergebnisse zeigen, daß der NOS-Enzymkomplex im 4stündigen Postdekompressionsintervall aktiviert – oder wiederholt reaktiviert – wird. Dies geschieht durch den Ablauf, der in Abbildung 9 dargestellt wird. Andere Untersucher haben zudem eine Verbindung zwischen PDI und ei-

nem Floppase/Flippase-getriggerten Phosphatidylinerumsatz beschrieben (55).

Die Komprimierung durch Luft mit nachfolgender Dekompression hat eine Aktivierung der Neutrophilen – als β_2 -Integrin-Expression und Degranulierung nachweisbar – zur Folge. Dieser Effekt ist jedoch im Vergleich zu traditionellen Zellaktivatoren wie Zymosan und Phorbol-12-myristat-13-acetat milde (3, 56, 57). In dieser Studie beträgt der durch NOX beeinflusste O_2 -Verbrauch in Zellen nach Exposition gegenüber hohen Inertgaspartialdrücken nur ungefähr 13% dessen, was durch die Gabe von Phorbol-12-myristat-13-acetat beschrieben wurde (57).

Obwohl die NOS-Aktivität geringfügig dem Gasdruck zuzuschreiben ist, ist die iNOS-Aktivität hiervon nicht beeinflusst. Zudem war die iNOS-Aktivität in murinen Zellen während der Druckexposition (Abb. 3) und in den 4 nachfolgenden Stunden gleich. Diese Ergebnisse der Enzymaktivität nimmt Einfluß für die Evaluierung der Bildung von freien Radikalen in der DCF-DA-Untersuchungsreihe.

Die Größenordnung der DCF-Fluoreszenz während der Inertgas-Druckexposition der Zellen (Abb. 5) war um das mehrfache höher wie nach der Dekompression (Abb. 6). Dieser Unterschied kann nicht durch eine Veränderung der Aktivität der iNOS erklärt werden. Die Aktivität der NOX konnte während der Kompression leider nicht gemessen werden, aber eine Erhöhung der Fluoreszenz-Rate um das 100fache im Vergleich zu den post-Dekompressionswerten scheint nicht physiologisch plausibel zu sein. Daher sehen wir eine Verstärkung durch Substanzen, die zur Oxidation von DCF während der Druckexposition fähig sind, als vernachlässigbar im Vergleich zur primären Produktion von ROS und $\cdot NO$ als Ursache für die Erhöhung der DCF-Fluoreszenz an. Eine Verstärkung der Superoxid-Produktion könnte jedoch in diesem Rahmen stattfinden, da die Inertgas- O_2 -Kollisionen im Beisein eines Elektronendonors dazu führen könnten, wie es in anderen Studien ex vivo beschrieben wurde (18). Diese so genannten 3-Körper-Reaktionen haben jedoch eine sehr konstante Rate hinsichtlich des Einfangens eines Elektrons im Vergleich zu O_2 aufgrund ihrer van-der-Waals-Molekülformation (15,17)

Die Aktivitäten von NOX und iNOS und die erhöhte DCF-Fluoreszenz in murinen Neutrophilen persistieren allesamt für 4 Stunden nach einer 30minütigen Exposition gegenüber hohen Drücken der Inertgase. Wir glauben, dass diese Persistenz aufgrund

eines aktiven Aktinumsatzes geschieht, wie es in der Untersuchung der FBE gezeigt wurde. Jedoch erklärt dies nicht wieso die gemessenen iNOS-Aktivität nach ca. 1 Stunde ein Plateau erreicht (Abb. 3), die NOX-Aktivität über ca. 10 Minuten verschwindet (Abb. 4) und die post-Dekompressions-Rate der DCF-Fluoreszenz ebenfalls nach ca. 10 Minuten eine Plateauphase zu erreichen scheint (Abb. 6).

Wir vermuten, daß diese zeitliche Begrenzung in Abhängigkeit des dynamischen Verlaufs des Aktinumsatzes einzuordnen ist. Eine Erklärung hierfür wäre, daß zu jedem Zeitpunkt während der post-Dekompressionsphase nur ein kleiner Bruchteil der Neutrophilen genug freie Radikale produziert, die die antioxidative Kapazität der Neutrophilen in der Lösung insgesamt soweit übersteigt, daß das SNO-Aktin komplett eradiziert wird.

In den Untersuchungen an isolierten Proteinen konnte eine Verbindung zwischen iNOS und den mit FAK-assoziierten Aktinfilamenten gezeigt werden. Eine Zunahme von komplexen Formationen wird jedoch verhindert, da das Aktin S-nitrosyliert wird (26). Die Aktivität der iNOS wird durch eine FAK-gesteuerte Verbindung mit Aktinfilamenten erhöht, aber die NO-Produktion war durch den Verbrauch aufgrund der S-Nitrosylierung des Aktins nur von zeitlich begrenzter Dauer (26). Daher stellen wir die Hypothese auf, daß sobald Zellen gegenüber N_2 oder Edelgasen exponiert wurden der in Abb. 9 gezeigte Ablauf durch Einfluß von SNO-Aktin und der Bildung von reaktiven Spezies in den benachbarten Zellen beeinflusst wird. Das Verschwinden der NOX-Aktivität nach ca. 10 Minuten nach der Dekompression könnte zudem aufgrund einer Aktinfilament-Bildung geschehen, die zu einer Auflösung des Enzymkomplexes führen kann (57).

Die DCF-Fluoreszenz ist sowohl mit der iNOS- als auch mit der NOX-Aktivierung vergesellschaftet und dies geschieht unter den in Tab. 3 beschriebenen verschiedenen Interventionen/Inhibitionen. Die Ergebnisse der Abb. 5 benötigen jedoch eine weitergehende Diskussion. Wir glauben, daß die 10 Minuten bis zum Erreichen des Plateaus der DCF-Fluoreszenz die Zeit darstellen, die die Zelle benötigt, um einen Steady State in der Aufnahme dieser Substanz zu erreichen. Eine gleiche zeitliche Dynamik mit einem Erreichen eines Plateaus nach ungefähr 10 Minuten wurde in Kardiomyozyten nach Gabe von DCF-DA berichtet (58). In dieser Studie konnte gezeigt werden, daß der Prozeß zum Erreichen der Durchlässigkeit der Zellen keine Leckage des DCF verursachte,

da dies in die Mitochondrien eingeschleust wurde. Ein ähnlicher Vorgang könnte erklären, warum die OG-Prozedur keinen signifikanten Effekt auf die DCF-Fluoreszenz in unserer Untersuchung hatte.

Die genaue Rolle der Modifikationen des Zytoskeletts in der Dynamik der MP-Bildung ist bisher nur wenig verstanden. Aber wie in der Einleitung beschrieben wurde führt eine Instabilität des Zytoskeletts zur Bildung von Mikropartikeln (14). Unsere Daten zeigen eine klare Notwendigkeit für eine Aktinpolymerisation und – wie in der Abb. 8 und der Tab. 4 dargestellt – eine Vielzahl von Proteinen gelangen durch die Druckexposition in die unmittelbare Nähe der kurzen Aktinfilamente. Die Immunoprecipitations-Untersuchung identifizierte statistisch signifikante Verbindungen zwischen den kurzen Aktinfilamenten, iNOS, FAK und VASP; jedoch nicht mit Flippase, Floppase und PDI. In der DTSP-Quervernetzungs-Untersuchungsreihe (die eine Nähe der Proteine zum Aktin von ungefähr $12 \text{ \AA}$ anzeigt (35)) waren diese letztgenannten Interaktionen höchstens schwach und kurzfristig. Es ist jedoch wahrscheinlicher daß keinerlei Verbindung dieser Proteine mit Aktinfilamenten entsteht.

Der Ablaufzyklus in Abb. 9 kann durchaus noch komplexer sein als gezeigt. Weitere Studien hierzu sind erforderlich. Es wurde z.B. eine Verbindung zwischen FAK, Aktinumsatz und der Thioredoxin-Reduktase (TrxR) beschrieben. TrxR kann die Aktivität von PDI verstärken (25,59). Eine intrazelluläre TrxR-Depletion hatte keinen dauerhaften Effekt auf die Inertgas-induzierte MP-Bildung (Daten nicht gezeigt), jedoch ist die Rolle dieses Enzyms noch unklar und es ist durchaus möglich, daß TrxR einen größeren Einfluß auf die Entfernung von SNO-Aktin besitzt als in bisherigen Studien beschrieben (25).

Das Vorkommen von SNO-Aktin in N_2 -exponierten Neutrophilen führt zu Fragen hinsichtlich einer Immunsystem-Reaktion. Die S-Nitrosylierung von Aktin-Cystein-Residuen behindert die Adhärenz des β_2 -Integrins (24,29). Eine Kompromittierung des Immunsystems ist im Rahmen des Tiefseetauchens bisher unbekannt, daher vermuten wir einen Unterschied in der Proteinmodifikation in dieser Studie im Vergleich zu den Modifikationen in Verbindung mit einer O_2 -Exposition unter hohen Drücken. Diese Vermutung könnte durch die eher normale Expression der NOX-Aktivierung unterstützt werden, die oben besprochen wurde. Trotzdem benötigt auch dieser Aspekt weiterführende Untersuchungen zur Klärung.

Diese Studie wurde durch die Beobachtung des Zusammenhangs zwischen der Bildung von MP und der DCS initiiert (3, 4, 6, 9). DCS entsteht durch das Auftreten von Gasblasen durch einen Exzeß an Inertgas an einer beliebigen Stelle des Körpers. Man weiß jedoch wenig über die Eigenschaften der Gase und hohen Partialdrücken in Geweben oder über den Entstehungsmechanismus selber. Studien an Mäusen suggerieren daß MPs als Nukleationsstellen für Gasblasen funktionieren können. Die hier beschriebene Erkenntnis, daß ein erhöhter Gasdruck zur Aktivierung der iNOS führt, unterstützt diese Vermutung (7). Humane Neutrophile, die einem Druck von ca. 186kPa oder mehr ausgesetzt waren, produzieren MPs. Dieser Wert ist bemerkenswert nah am Schwellenwert-Druck von 135kPa, bei dem endogene Blasen in Menschen nach Dekompression beobachtet werden können (60). In Einklang mit unseren Ergebnissen stehen außerdem die prädiktiven DCS-Kurven für Nagetiere, die ebenfalls eine unterschiedliche Potenz zwischen den Inertgasen aufweisen ($\text{Ar} > \text{N}_2 > \text{He}$) (61).

Humane Zellen bilden MPs in einer schnelleren Rate im Vergleich zu murinen Neutrophilen, zumindest bei einer 30minütigen Exposition. Genau wie der Unterschied in der Bildungsrate gibt es Differenzen in der Neigung zur DCS-Entwicklung. Es wurde vermutet, daß dies an einer unterschiedlichen Empfänglichkeit für die DCS liegt und nicht an einem fundamentalen Unterschied in der Pathophysiologie der DCS (62) in unterschiedlichen Organismen. Menschen sind sensibler als Mäuse. Die N_2 -„Dosis“, die notwendig ist, um bei 50% einer Studienpopulation von sieben verschiedenen Spezies eine DCS hervorzurufen, scheint vom Körpergewicht abzuhängen. Hierbei scheinen kleinere Tiere das exzessive Inertgas aufgrund der schnelleren Kreislaufzirkulationszeit und des schnelleren Metabolismus besser eliminieren zu können (63). Ob dieser Unterschied in der DCS-Anfälligkeit auch aufgrund einer unterschiedlichen MP-Bildungsrate besteht ist ein interessanter Ansatz für weitere Studien.

MP werden durch Neutrophile bei Inertgasdrücken gebildet, die häufig von menschlichen Tauchern erreicht werden. 186kPa ist einer Wassertiefe von 18,6m äquivalent. Daher sind die in dieser Studie gefundenen biochemischen Ergebnisse durchaus von praktischer Bedeutung. Ob auch andere Zelltypen als Neutrophile die gleichen Reaktionen aufgrund der Gasexposition zeigen, muß noch weiter erforscht werden.

Die Dynamik der Mikropartikel hängt zudem von der körperlichen Anstrengung und dem O_2 -Partialdruck der verwendeten Atemgasmischung ab. Dies erhöht natürlich die Komplexität der Interaktionen (3,4). Während die Verbindung zwischen MPs und DCS weiterhin unklar bleibt, bietet diese Studie eine Erklärung für die vermehrte Bildung von Mikropartikeln in neutrophilen Zellen in Mäusen und Menschen an, die hohen Drücken ausgesetzt worden waren (3,4,6). Die Kaskade der inflammatorischen Antworten auf die Bildung von MP und insbesondere die Aktivierung der iNOS könnte zudem erklären, wieso der Beginn von DCS-Symptomen erst nach einigen Stunden nach der Dekompression auftreten kann (7-9,64).

Des weiteren besteht immer noch ein schlechtes Verständnis für die Kapazität von Edelgasen, eine Antwort auf oxidativen Stress hervorzurufen, der in anderen Studien zu einer Zunahme der Toleranz gegenüber Ischämie geführt hat (65,66). Die Generierung von O_2 -Singulettts bietet einen allgemeinen Initiationspunkt für mehrere weiterführende Mechanismen an. Unsere Untersuchungsergebnisse lassen vermuten, daß Edelgase unter hohem Druck fähig sind, in Geweben die Bildung von O_2 -Singulettts hervorzurufen. Dies ist bisher nur durch die Gabe von Photosensitizern und sichtbarem Licht in der onkologischen Therapie von oberflächlichen Geweben erreicht worden. Weitere Untersuchungen hinsichtlich dieser Perspektive sollte durchgeführt werden.

Übersetzung

Dr. Simon Kalender •
 Facharzt für •
 Anästhesie/Intensivmedizin/ •
 Notfallmedizin/Taucherarzt •
 •
 St. -Marien-Hospital Klinikum •
 Lünen •



References

- Vince, R. V., McNaughton, L. R., Taylor, L., Midgley, A. W., Laden, G., and Madden, L. A. (2009) Release of VCAM-1 associated endothelial microparticles following simulated SCUBA dives. *Eur J Appl Physiol* **105**, 507-513
- Madden, L. A., Christmas, B. C., Mellor, D., Vince, R. V., Midgley, A. W., McNaughton, L. R., Atkins, S. L., and Laden, G. (2010) Endothelial function and stress response after simulated dives to 18 msw breathing air or oxygen. *Aviat Space Environ Med* **81**, 41-51
- Thom, S. R., Milovanova, T. N., Bogush, M., Bhopale, V. M., Yang, M., Bushmann, K., Pollock, N. W., Ljubkovic, M., Denoble, P., and Dujic, Z. (2012) Microparticle production, neutrophil activation and intravascular bubbles following open-water SCUBA diving. *J Appl Physiol* **112**, 1268-1278
- Thom, S. R., Milovanova, T. N., Bogush, M., Yang, M., Bhopale, V. M., Pollock, N. W., Ljubkovic, M., Denoble, P., Madden, D., Lozo, M., and Dujic, Z. (2013) Bubbles, microparticles and neutrophil activation: Changes with exercise level and breathing gas during open-water SCUBA diving. *J Appl Physiol* **114**, 1396-1405
- Pontier, J. M., Gempp, E., and Ignatescu, M. (2012) Blood platelet-derived microparticles release and bubble formation after an open-sea dive. *Appl Physiol Nutr Metab* **37**, 1-5
- Thom, S. R., Yang, M., Bhopale, V. M., Huang, S., and Milovanova, T. N. (2011) Microparticles initiate decompression-induced neutrophil activation and subsequent vascular injuries. *J Appl Physiol* **110**, 340-351
- Thom, S. R., Yang, M., Bhopale, V. M., Milovanova, T. N., Bogush, M., and Buerk, D. G. (2013) Intra-microparticle nitrogen dioxide is a bubble nucleation site leading to decompression-induced neutrophil activation and vascular injury. *J Appl Physiol* **114**, 550-558
- Yang, M., Milovanova, T. N., Bogush, M., Uzan, G., Bhopale, V. M., and Thom, S. R. (2012) Microparticle enlargement and altered surface proteins after air decompression are associated with inflammatory vascular injuries. *J Appl Physiol* **112**, 204-211
- Yang, M., Kosterin, P., Salzberg, B. M., Milovanova, T. N., Bhopale, V. M., and Thom, S. R. (2013) Microparticles generated by decompression stress cause central nervous system injury manifested as neurohypophyseal terminal action potential broadening. *J Appl Physiol* **115**, 1481-1486
- Enjeti, A. K., Lincz, L. F., and Seldon, M. (2008) Microparticles in health and disease. *Semin Thromb Hemost* **34**, 683-692
- Pirro, M., Schillaci, G., Bagaglia, F., Menecali, C., Paltriccina, R., Mannarino, M. R., Capanni, M., Velardi, A., and Mannarino, E. (2008) Microparticles derived from endothelial progenitor cells in patients at different cardiovascular risk. *Atherosclerosis* **197**, 757-767
- Morel, O., Jesel, L., Freyssinet, J. M., and Toti, F. (2011) Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **31**, 15-26
- Freyssinet, J. M., and Toti, F. (2010) Formation of procoagulant microparticles and properties. *Thromb Res* **125 (suppl 1)**, S46-S48
- Cauwenberghs, S., Feijge, M. A. H., Harper, A. G. S., Sage, S. O., Curvers, J., and Heemskerk, J. W. (2006) Shedding of procoagulant microparticles from unstimulated platelets by integrin-mediated destabilization of actin cytoskeleton. *FEBS Lett* **580**, 5313-5320
- Hild, M., and Schmidt, R. (1999) The mechanism of the collision-induced enhancement of the radiative transitions of oxygen. *J Phys Chem A* **103**, 6091-6096
- Minaev, B. F., and Kobzev, G. I. (2003) Response calculations of electronic and vibrational transitions in molecular oxygen induced by interaction with noble gases. *Spectrochimica Acta Part A* **59**, 3387-3410
- Shimamori, H., and Hotta, H. (1984) Mechanism of thermal electron attachment to O₂: isotope effect studies with ¹⁸O₂ in rare gases and some hydrocarbons. *J.Chem.Phys.* **81**, 1271-1276
- Thom, S. R. (1992) Inert gas enhancement of superoxide radical production. *Arch Biochem Biophys* **295**, 391-396
- Thom, S. R., and Marquis, R. E. (1984) Microbial Growth Modification by Compressed Gases and Hydrostatic Pressure. *Appl Environ Microbiol* **47**, 780-787
- Thom, S. R., and Marquis, R. E. (1987) Free radical reactions and the inhibitory and lethal actions of high-pressure gases. *Undersea Biomed Res* **14**, 485-501
- Bitterman, N., Laor, A., and Melamed, Y. (1987) CNS oxygen toxicity in oxygen-inert gas mixtures. *Undersea.Biomed.Res.* **14**, 477-483
- Brauer, R. W., and Beaver, R. W. (1982) Synergism of hyperoxia and high helium pressures in the causation of convulsions. *J.Appl.Physiol.* **53**, 192-202
- Arieli, R., Ertracht, O., Oster, I., Vitenstein, A., and Adir, Y. (2005) Effects of nitrogen and helium on CNS oxygen toxicity in the rat. *J Appl Physiol* **98**, 144-150
- Thom, S. R., Bhopale, V. M., Yang, M., Bogush, M., Huang, S., and Milovanova, T. (2011) Neutrophil Beta-2 integrin inhibition by enhanced interactions of vasodilator stimulated phosphoprotein with S-nitrosylated actin. *J Biol Chem* **286**, 32854-32865
- Thom, S. R., Bhopale, V. M., Milovanova, T. N., Yang, M., and Bogush, M. (2012) Thioredoxin reductase linked to cytoskeleton by focal adhesion kinase reverses actin S-nitrosylation and restores neutrophil beta-2 integrin function. *J Biol Chem* **287**, 30346-30357
- Thom, S. R., Bhopale, V. M., Milovanova, T. N., Yang, M., Bogush, M., and Buerk, D. G. (2013) Nitric oxide synthase-2 linkage to focal adhesion kinase in neutrophils influences enzyme activity and beta-2 integrin function. *J Biol Chem* **288**, 4810-4818
- Pagel, P. S., Krolikowski, J. G., Pratt, P. F., Shim, Y. H., Amour, J., Warltier, D. C., and Weihrauch, D. (2008) The mechanism of helium-induced preconditioning: A direct role for nitric oxide in rabbits. *Anesth Analg* **107**, 762-768
- Gharib, B., Hanna, S., Abdollahi, O. M. S., Lepidi, H.,

- Gardette, B., and DeReggi, M. (2001) Anti-inflammatory properties of molecular hydrogen: investigation on parasite-induced liver inflammation. *Life Sci* **324**, 719-724
29. Thom, S. R., Bhopale, V. M., Mancini, J. D., and Milovanova, T. M. (2008) Actin S-nitrosylation inhibits neutrophil beta-2 integrin function. *J Biol Chem* **283**, 10822-10834
 30. Csanyi, G., Cifuentes-Pagano, E., Ghouleh, I. A., Ranayhossaini, D. J., Egana, L., Lopes, L. R., Jackson, H. M., Kelley, E. E., and Pagano, P. J. (2011) Nox2 B-loop peptide, Noxds, specifically inhibits the NADPH oxidase Nox2. *Fr. Radic. Biol. Med.* **51**, 1116-1125
 31. Glogauer, M., Hartwig, J., and Stossel, T. P. (2000) Two pathways through Cdc42 couple the N-formyl receptor to actin nucleation in permeabilized human neutrophils. *J Cell Biol* **150**, 785-796
 32. Daniliuc, S., Bitterman, H., Rahat, M. A., Kinarty, A., Rosenzweig, D., and Nitza, L. (2003) Hypoxia inactivates inducible nitric oxide synthase in mouse macrophages by disrupting its interaction with alpha-actinin 4. *J Immunol* **171**, 3225-3232
 33. Klatt, P., Schmidt, K., Lehner, D., Glatzer, O., Bachinger, H. P., and Mayer, B. (1995) Structural analysis of porcine brain nitric oxide synthase reveals a role for tetrahydrobiopterin and L-arginine in the formation of an SDS-resistant dimer. *Embo J* **14**, 3687-3695
 34. Gollmer, A., Arnbjerg, J., Blaikie, F. H., Pedersen, B. W., Breitenbach, T., Daasbjerg, K., Glasius, M., and Ogilby, P. R. (2011) Singlet oxygen sensor green: Photochemical behavior in solution and in a mammalian cell. *Photochem. & Photobiol.* **87**, 671-679
 35. Huttelmaier, S., Mayboroda, O., Harbeck, B., Jarchau, T., Jockusch, B. M., and Rudiger, M. (1998) The interaction of the cell-contact proteins VASP and vinculin is regulated by phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Curr Biol* **8**, 479-488
 36. Marcus de A. Paes, A., Verissimo-Filho, S., Guimaraes, L. L., Carolina B. Silva, A., Takiuti, J. T., Santos, C. X. C., Janiszewski, M., Laurindo, F. R., and Lopes, L. R. (2011) Protein disulfide isomerase redox-dependent association with p47phox: evidence for an organizer role in leukocyte NADPH oxidase activation. *J Leukoc Biol* **90**, 799-810
 37. Li, M. Y., Cline, C. S., Koker, E. B., Carmichael, H. H., Chignell, C. F., and Bilski, P. (2001) Quenching of singlet molecular oxygen(¹O₂) by azide anion in solvent mixtures. *Photochem. & Photobiol.* **74**, 760-764
 38. Kramarenko, G. G., Hummel, S. G., Martin, S. M., and Buettner, G. R. (2006) Ascorbate reacts with singlet oxygen to produce hydrogen peroxide. *Photochem. & Photobiol.* **82**, 1634-1637
 39. Bondi, A. (1964) van der Waals volumes and radii. *J Phys Chem* **68**, 441-451
 40. Pecci, L., Montefoschi, G., Antonucci, A., Casta, M., Fontana, M., and Cavallini, D. (2001) Formation of nitrotyrosine by methylene blue photosensitized oxidation of tyrosine in the presence of nitrite. *Biochem Biophys Res Commun* **289**, 305-309
 41. von Montfort, C., Sharov, V. S., Metzger, S., Schoenich, C., Sies, H., and Klotz, L. O. (2006) Singlet oxygen inactivates protein tyrosine phosphatase-1B by oxidation of the active site cysteine. *Biol Chem* **387**, 1399-1404
 42. Jackson, T. S., Xu, A., Vita, J. A., and Keane, J. F. (1998) Ascorbate prevents the interaction of superoxide and nitric oxide only at very high physiological concentrations. *Circ Res* **83**, 916-922
 43. Di Mascio, P., Briviba, K., Sasaki, S. T., Catalani, L. H., Medeiros, M. H., Bechara, E. J., and Sies, H. (1997) The reaction of peroxynitrite with tert-butyl hydroperoxide produces singlet molecular oxygen. *Biol Chem* **378**, 1071-1074
 44. Ostlund, A., Linnarsson, D., Lind, F., and Sporrang, A. (1994) Relative narcotic potency and mode of action of sulfur hexafluoride and nitrogen in humans. *J Appl Physiol* **76**, 439-444
 45. Bell, R. M., Ballas, L. M., and Coleman, R. A. (1981) Lipid topogenesis. *J Lipid Res* **22**, 391-403
 46. Wehman, A. M., Poggioli, C., Schweinsberg, P., Grant, B. D., and Nance, J. (2011) The P4-ATPase TAT-5 inhibits the budding of extracellular vesicles in *C. elegans* embryos. *Curr Biol* **21**, 1951-1959
 47. Bevers, E. M., and Williamson, P. L. (2010) Phospholipid scramblase: an update. *FEBS Lett* **584**, 2724-2730
 48. Bevers, E. M., Comfurius, P., Dekkers, D. W., and Zwaal, R. F. (1999) Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells. *Biochem Biophys Acta* **1439**, 317-330
 49. Brandes, R. P., Weissmann, N., and Schroder, K. (2014) Nox family NADPH oxidases in mechanotransduction: Mechanisms and consequences. *Antioxid Redox Signal* **20**, 887-898
 50. Alfonso, P., Dolado, I., Swat, A., Nunez, A., Cuadrado, A., Nebreda, A. R., and Casal, J. I. (2006) Proteomic analysis of p38alpha mitogen-activated protein kinase-regulated changes in membrane fractions of RAS-transformed fibroblasts. *Proteomics* **6** (Suppl. 1), S262-S271
 51. Chapple, S. J., Cheng, X., and Mann, G. E. (2013) Effects of 4-hydroxynonenal on vascular endothelial and smooth muscle cell redox signaling and function in health and disease. *Redox Biol* **1**, 319-331
 52. Kasorn, A., Alcaide, P., Jia, Y., Subramanian, K. K., Sarraj, B., Li, Y., Loison, F., Hattori, H., Silberstein, L. E., Luscinskas, W. F., and Luo, H. R. (2009) Focal adhesion kinase regulated pathogen-killing capability and life span of neutrophils via mediating both adhesion-dependent and -independent cellular signals. *J Immunol* **183**, 1032-1043
 53. Pescatore, L. A., Bonatto, D., Forti, F. L., Sadok, A., Kovacic, H., and Laurindo, F. R. M. (2012) Protein disulfide isomerase is required for platelet-derived growth factor-induced vascular smooth muscle cell migration, Nox1 NADPH oxidase expression, and RhoGTPase activation. *J Biol Chem* **287**, 29290-29300
 54. Santos, C. X. C., Stolf, B. S., Takemoto, P. V. A., Amanso, A. M., Lopes, L. R., Souza, E. B., Goto, H., and Laurindo, F. R. M. (2009) Protein disulfide isomerase (PDI) associates with NADPH oxidase and is required for phagocytosis of *Leishmania chagasi* promastigotes by macrophages. *J Leukoc Biol* **86**, 989-998
 55. Popescu, N. I., Lupu, C., and Lupu, F. (2010) Extracellular protein disulfide isomerase regulates co-

agulation on endothelial cells through modulation of phosphatidylserine exposure. *Blood* **116**, 993-1001

56. Allen, D. B., Maguire, J. J., Mahdavian, M., Wicke, C., Marcocci, L., Scheuenstuhl, H., Chang, M., Le, A. X., Hopf, H., and Hunt, T. K. (1997) Wound hypoxia and acidosis limit neutrophil bacterial killing mechanisms. *Arch Surg* **132**, 482-489
57. Jandl, R. C., Andre-Schwartz, J., Borges-DuBois, L., Kipnes, R. S., McMurrich, B. J., and Babior, B. M. (1978) Termination of the respiratory burst in human neutrophils. *J Clin Invest* **61**, 1176-1185
58. Swift, L. M., and Sarvazyan, N. (2000) Localization of dichlorofluorescein in cardiac myocytes: implications for assessment of oxidative stress. *Am J Physiol. Heart Circ. Physiol.* **278**, H982- H990
59. Tomazzolli, R., Serra, M. D., Bellisola, G., Colombatti, M., and Guella, G. (2006) A fluorescence-based assay for reductase activity of protein disulfide isomerase. *Anal Biochem* **350**, 105-112
60. Eckenhoff, R. G., Olstad, C. S., and Carrod, G. (1990) Human dose-response relationship for decompression and endogenous bubble formation. *J.Appl.Physiol.* **69**, 914-918
61. Lillo, R., and Parker, E. (2000) Mixed gas model for predicting decompression sickness in rats. *J.Appl. Physiol.* **89**, 2107-2116
62. Flynn, E. T., and Lambertsen, C. J. (1971) Calibration of inert gas exchange in the mouse. In Proceedings of the Fourth Symposium on Underwater Physiology (C.J. Lambertsen, ed.) *New York: Academic Press*, 179-191
63. Berghage, T. E., and McCracken, T. M. (1979) Equivalent air depth: fact or fiction. *Undersea Biomed Res* **6**, 379-384
64. Vann, R. D., Butler, F. K., Mitchell, S. J., and Moon, R. E. (2011) Decompression illness. *Lancet* **377**, 153-164
65. Sanders, R. D., Ma, D., and Maze, M. (2010) Argon neuroprotection. *Critical Care* **14**, 117
66. David, H. N., Haelewyn, B., Rouillon, C., Lecoq, M., Chazalviel, L., Apiou, G., Risso, J. J., Lemaire, M., and Abirini, J. H. (2008) Neuroprotective effects of xenon: a therapeutic window of opportunity in rats subjected to transient cerebral ischemia. *FASEB J* **22**, 1275-1286
67. Agostinis, P., Berg, K., Cengel, K. A., Foster, T. H., Girotti, A. W., Gollnick, S. O., Hahn, S. M., Hamblin, M. R., Juzeniene, A., Kessel, D., Korbelik, M., Moan, J., Mroz, P., Nowis, D., Piette, J., Wilson, B. C., and Golab, J. (2011) Photodynamic therapy of cancer: An update. *CA Cancer J Clin* **61**, 250-281
68. CRC. (1989) Handbook of Chemistry and Physics, 70th edition, Lide, D.R. (Ed). *CRC Press, Boca Raton, FL*
69. Miller, S. L., Eger, E. I., and Lundgren, C. (1969) Anaesthetic potency of CF₄ and SF₆ in dogs. *Nature* **221**, 468-469



16. Tauchmedizinisches Seminar Mallorca

vom 23.10. bis 30.10. 2016



Ort:	Hotel Palmira Beach, Paguera; Tauchbasis ZOEa, Santa Ponsa
Lehrgangsleitung:	Dr. Wolfgang Hühn (Diving & Hyperbaric Medicine Consultant (GTÜM e.V.))
Nähere Auskünfte:	Gunter Schendel, seminar@tauchfreunde-lahndill.de Tel: +49 172 3838656
Zertifizierung:	16 GTÜM-Refresherpunkte, 71 CME- Punkte (LÄKH 2015)
Leistungspaket:	Lehrgangs- und Zertifizierungsgebühr (1200.-€) , Tauchen, Flug, Übernachtung/Frühstück, Mittagsverpflegung, Seminargetränke, Flughafentransfer, Inseltransfers (Gesamtkosten: 2570.-€)

Tauchen mit Luft oder Nitrox und das Gefühl der Erschöpfung

Warum haben manche Taucher den Eindruck, dass sie nach einem Nitrox-Tauchgang nicht so erschöpft sind?



Für die Autoren

Dr. Ulrich van Laak •
Flottenarzt •

Abteilungsleiter Maritime •
Medizin Schifffahrtmedizi- •
nisches Institut der Marine •
Medizinischer Direktor •
DAN Europe •
Deutschland und Österreich •

Email: •
uvanlaak@daneurope.org •

Von Dr. Matias Nochetto, M.D., bearbeitet durch Dr. Ulrich van Laak

Pressluft ist beim Sporttauchen seit Jahrzehnten das am weitesten verbreitete Atemgas – gleichsam der Standard. Atemgasgemische mit einem niedrigeren Stickstoff- und einem höheren Sauerstoffanteil (Nitrox) werden bei Tauchern zur Verlängerung der Grundzeiten oder zur Verringerung des Dekompressionsstresses bei Tauchgängen mit typischen Tauchzeiten zunehmend beliebter. Nach 25 Jahren Nitrox beim Sporttauchen haben Taucher und Tauchmediziner in der Praxis wertvolle Erfahrungen seiner Anwendung machen können. Einige Taucher haben Erfahrungen gesammelt, die sich des wissenschaftlichen Beweises entziehen. Sie haben den Eindruck, dass sie nach einem Nitrox-Tauchgang nicht so erschöpft sind.

Gibt es handfeste Beweise zur Untermauerung der Beobachtung, dass Nitrox nach dem Tauchen weniger müde macht? Welche mögliche Antwort gibt des

aus wissenschaftlicher Sicht für dieses Phänomen?

Müdigkeit oder körperliche Erschöpfung sind physiologische Folgen außergewöhnlicher körperlicher Aktivität. Charakteristisch dafür ist das subjektive Gefühl einer vorübergehend reduzierten Fähigkeit normale körperliche Aktivitäten durchzuführen. Oft steht es mit Schläfrigkeit und Lethargie in Zusammenhang und manchmal mit suboptimaler geistiger Leistungsfähigkeit. Erschöpfung ist zwar nach unauffälligen Tauchgängen ohne symptomatischen Dekompressionsunfall (DCI) zum einen nicht unüblich, wird aber zum anderen regelmäßig als typisches Symptom einer beginnenden DCI interpretiert.

Subjektive Berichte von Tauchern über Erschöpfung nach Nitrox-Tauchgängen werden indes kontrovers diskutiert. Den persönlichen Eindrücken der Taucher stehen objektive Studien gegenüber, die

keinen signifikanten Unterschied beim Erschöpfungszustand oder der geistigen Leistungsfähigkeit zwischen Luft- und Nitrox-Tauchgängen ausmachen konnten.

Bei derselben Tauchzeit und -tiefe gilt: je höher der Partialdruck des eingeatmeten Sauerstoffs (p_{O_2}) und je niedriger der Partialdruck des Inertgases (p_{N_2}), desto niedriger der Dekompressionsstress. Dabei ist die Annahme schon verlockend, dass ein niedrigerer Dekompressionsstress gleichzeitig mit der Empfindung eines Tauchers einhergeht „nachher“ weniger erschöpft zu sein. Ein höherer p_{O_2} führt jedoch zu mehr oxidativem Stress des Körpers; der p_{O_2} von Nitrox ist bei gleicher Tiefe höher als der von Luft.

Studien gehen davon aus, dass oxidativer Stress, der durch den höheren Nitrox- p_{O_2} entsteht, eine En-

dotheldysfunktion verursachen kann, die wiederum zu unspezifischen Symptomen führen könnte, die als Müdigkeit interpretiert werden könnten. Beobachtungen von klinisch tätigen Überdruckmedizinern, die von einem Zusammenhang zwischen größerem oxidativem Stress während einer hyperbaren Sauerstofftherapie und der stärkeren Ermüdung nach der Behandlung berichten, bestätigen dies.

Wir haben zwei Experten zu dem Thema hinzugezogen, die dabei helfen sollen, die persönlichen Eindrücke der Taucher bezüglich der günstigen Auswirkungen von Nitrox auf den Erschöpfungsgrad nach einem Tauchgang mit den kontroversen Ergebnissen der Studien zu diesem Phänomen unter einen Hut zu bringen.



Abbildung 1

Tauchgeräte-Füllungen mit Nitrox werden heute in vielen Tauch-Destinationen alternativ zu komprimierter Atemluft angeboten.

Was sind mögliche Ursachen für das Gefühl der Erschöpfung nach dem Tauchen?

Richard Harris: Das Gefühl der Erschöpfung nach dem Tauchen kann von vielen Faktoren herrühren. Einige davon können mit dem Tauchen zusammenhängen. Da ist vieles denkbar, auf das ich hinweisen möchte: thermischer Stress, Dekompressionsstress, Energieverbrauch, hohe Sauerstoffaufnahme über einen längeren Zeitraum hinweg, Angst und Seekrankheit. Aber es gibt noch viele andere möglicherweise nicht zusammenhängende Ursachen wie Schlafmangel im Urlaub, Alkohol, Jet Lag, usw.

Neal Pollock: Viele Menschen verstehen die physiologischen Auswirkungen des vollständigen Eintauchens ins Wasser nicht wirklich. Als sofortige Reaktion auf den hydrostatischen Druck wird eine erhebliche Menge des Bluts, das normalerweise in den Kapazitätsgefäßen (Venen) der Beine bleibt, zum zentralen Volumen (in die Brust) verlagert. Eine historische Untersuchung („Gauer-Henry-Reflex“) hat bereits ergeben, dass während der Ruhephase des Herzzyklus durchschnittlich 700ml Blut ins Herz gedrückt werden. Der Herzmuskel erfährt durch das erhöhte Blutvolumen eine Ausdehnung und reagiert darauf unmittelbar indem sich die Kontraktilität erhöht und es kurzfristig zu einer Hemmung des ADH kommt. Alles in allem eine schützende Reaktion auf den physiologischen Messwert eines zu hohen zentralen Flüssigkeitsvolumens. In der Praxis ist das der Grund dafür, warum man selbst nach sehr kurzen Aufhalten im Wasser den Drang verspürt, urinieren zu müssen.

Nach dem Verlassen des Wassers kann es bei dem Taucher zu einer unmittelbaren Reduzierung des Blutvolumens kommen, das zum Herzen zurückfließt. Ich sage hier gezielt "kann", denn ein engerer Nassanzug kann selbst schon ohne ein Eintauchen ins Wasser einen Teil des Blutes in die Brust leiten. Nach dem Tauchgang (oder nach dem Ausziehen des Nassanzugs) reduzieren sich bei dem Taucher das zentrale Blutvolumen und der Blutdruck. Die Wirkung geht über den einfachen Verlust von hydrostatischem Druck hinaus, da der Körper während des Tauchens (oder des Tragens des Nassanzugs) aktiv das Flüssigkeitsvolumen reduziert hat. Tatsächlich erklären diese Vorgänge höchstwahrscheinlich den größten Teil des normalen Erschöpfungszustands nach dem Tauchen. Am wichtigsten jedoch ist, dass die Erschöpfung aufgrund des Eintauchens ins Wasser auftritt und unabhängig von der Tiefe und von Dekompressionsstress ist.

Gibt es verlässliche Daten, die die Behauptung bestätigen, dass Nitrox nach dem Tauchen zu weniger Erschöpfung führt als Luft?

Harris: Nein. Ich bin jedoch nicht davon überzeugt, dass durch die jeweilige Trennschärfe und den jeweiligen Stichprobenumfang das Problem umfassend angegangen wurde. Experten-Beweise zum Thema Nitrox und Erschöpfung stehen aus.

Pollock: Die Daten, die diese Behauptungen unterstützen sollen, sind nicht schlüssig. Das ist keine Überraschung, denn der p_{O_2} steigt schon alleine mit der Tiefe. Es gibt keinen Grund dafür darüber zu diskutieren, ob sich jemand weniger erschöpft fühlt oder nicht. Studien zeigen, dass der Placebo-Effekt eine physiologische Auswirkung hat. Soll der Taucher dieses Gefühl also genießen. Am wichtigsten ist es für Taucher innerhalb der empfohlenen p_{O_2} -Grenzen zu bleiben, damit eine Sauerstofftoxizität vermieden wird.

Da der höhere Anteil Sauerstoff im Nitrox zu erhöhtem oxidativem Stress zu führen scheint, wie würden Sie diese scheinbar kontraproduktiven Wirkungen von Nitrox erklären?

Harris: Oxidativer Stress kann die neurale Aktivität ebenso behindern wie z.B. Alkohol. Das kann sich auf inhibitorische Neuronen auswirken und so (vorübergehend) das Arousal-Niveau erhöhen. Persönlich gesprochen fühlten meine Teammitglieder und ich uns nach 8 bis 17stündigen Höhlentauchgängen in 6 °C kaltem Wasser und bei maximalen Tiefen von über 200 Metern sehr gut. Wie ließe sich das in Anbetracht des Dekompressionsstresses und des thermischen, physikalischen, oxidativen und psychologischen Stresses, den wir bei diesen Tauchgängen erlebten, erklären? Vielleicht waren wir einfach nur froh am Leben zu sein? Ich habe mich aber auch schon nach sehr viel flacheren Tauchgängen mit niedrigeren O_2 -Aufnahmezeiten und kürzeren Aufhalten in wärmerem Wasser miserabel, müde und erkältet gefühlt. Es gibt ganz einfach zu viele andere Variablen um durchweg nur aufgrund eines einfachen Atemgaswechsels einen Unterschied festzustellen.

Pollock: Oxidativer Stress hat sicherlich das Potenzial problematisch zu werden, bei den typischerweise kurzen Aufnahmezeiten von Sporttauchgängen

vermutlich aber eher weniger. Zur Untersuchung der physiologischen Bedeutung bedarf es weiterer Studien.

Sind Ermüdung/Erschöpfung Ihrer Ansicht nach Anzeichen einer subklinischen DCI?

Harris: Ich denke Erschöpfung kann ein Symptom einer DCI sein, der Zustand muss jedoch schon herausragend sein um mich zu beeindrucken. Schwere Erschöpfung, also das Gefühl zu haben an einer Grippe zu leiden und nicht nur "ein bisschen müder als sonst nach dem Tauchen" zu sein, ist schon eine ernstere Sache. Statt den Ausdruck subklinische DCI zu verwenden, von dem ich kein Fan bin, würde ich einen Erschöpfungszustand nur dann „DCI“ assoziieren, wenn er Teil einer Konstellation von Symptomen ist.

Pollock: Normale Müdigkeitsmuster nach dem Tauchen würden hier also nicht zutreffen. Nur eine "ungewöhnliche Erschöpfung", die erheblich über dem typischen Niveau liegt, könnten ein Anzeichen oder, was wahrscheinlicher ist, ein Symptom sein. Es ist wichtig, den Taucher die Art und den Umfang der Wirkung beschreiben zu lassen um normal von außergewöhnlich zu unterscheiden.

Trotz des allgemeinen Eindrucks, dass ein Tauchgang mit Nitrox weniger müde macht als derselbe Tauchgang mit Atemluft, hat die Wissenschaft bislang noch keinen soliden Beweis zur Untermauerung dieser Annahme hervorgebracht. Der Placebo-Effekt sollte nicht unterschätzt werden und muss noch weiter untersucht werden.

Egal welche Fragen zukünftige Untersuchungen in diesem Bereich vielleicht noch beantworten: es ist immer noch korrekt für die überlegte Verwendung von mit Sauerstoff angereicherten Mischungen zu werben. Nicht unbedingt mit dem Ziel die Grundzeiten auszudehnen, sondern eher zur Unterstützung der Reduzierung von Dekompressionsstress. Wenn das Tauchen mit Nitrox dazu führt, dass man sich am Ende eines Tauchtages weniger müde fühlt, egal, ob es nun eine wissenschaftliche Erklärung dafür gibt oder nicht, empfehle ich zur Ausnutzung dieses Effekts - aber immer auf Nummer Sicher.

Ulrich van Laak

Die Experten

Richard Harris, BMBS, FANZCA, DipDHM, FFEWM ist ein australischer Narkosefacharzt, der in der Tauchmedizin und in der Luftfahrtmedizinischen Rettung arbeitet.

Dr. Neal W. Pollock, Ph.D. ist Forschungsleiter bei DAN und wissenschaftlicher Mitarbeiter am Center for Hyperbaric Medicine and Environmental Physiology des Duke University Medical Center in Durham, North Carolina, USA

Referenzen und weiterführende Literatur

Chapman SD, Plato PA. Measurement of fatigue following 18 msw open-water dives breathing air or EAN36. In: Brueggeman P, Pollock NW, eds. Diving for Science 2008. Proceedings of the American Academy of Underwater Sciences 27th Symposium, 2008; 1-11.

Harris RJD, Doolette DJ, Wilkinson DC, Williams DJ. Measurement of fatigue following 18 msw dry chamber dives breathing air on enriched air nitrox. Undersea Hyperb Med. 2003; 30(4): 285-91.

Lafère P, Balestra C, Hemelryck W, Donda N, Sakr A, Taher A, Marroni S, Germonpré P. Evaluation of critical flicker fusion frequency and perceived fatigue in divers after air and enriched air nitrox diving. Diving Hyperb Med. 2010 September; 40(3): 114-8.

Marinovic J, Ljubkovic M, Breskovic T, Gunjaca G, Obad A, Modun D, Bilopavlovic N, Tsikas D, Dujic Z. Effects of successive air and nitrox dives on human vascular function. Eur J Appl Physiol, 2012 June; 112(6): 2131-7.

Obad A, Palada I, Valic Z, Ivancev V, Bakavovic D, Wisløff U, Brubakk AO, Dujic Z. The effects of acute oral antioxidants on diving-induced alterations in human cardiovascular function. J Physiol. 2007; 578(3): 859-70.

PRO und CONTRA

A pro/con review comparing the use of mono- and multiplace hyperbaric chambers for critical care



Autor

Folke Lind
MD, PhD, FUHM

Physician emeritus in Hyperbaric Medicine, Department of Anaesthesiology, Surgical Services and Intensive Care, Karolinska Universityhospital, Assistant Professor, Section of Anesthesiology and Intensive Care, Department of Physiology and Pharmacology

Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden
Correspondence: folke.lind@ki.se

Diving and Hyperbaric Medicine

The Journal of the South Pacific Underwater Medicine Society and the European Underwater and Baromedical Society

SPUMS

Volume 45 No. 1 March 2015

EUBS



Intensive care in the hyperbaric chamber

Recognising hypercapnia in a rebreather is difficult
Dark chocolate before diving may be good for you
Some divers 'bubble' when flying after diving
Divers with a history of DCS are more likely to 'bubble'
HBOT increases insulin sensitivity in obese males

Print Post-Approved PP 200607412

ISSN 1833-3516, A0N 20 299 K23 713

Dieser Artikel wurde erstveröffentlicht in
Diving and Hyperbaric Medicine

Lind F. A pro/con review comparing the use of mono- and multiplace hyperbaric chambers for critical care. 2015 March;45(1):56-60.

Abdruck mit freundlicher Genehmigung der EUBS.



Als Mitglied der EUBS erhalten Sie "Diving and Hyperbaric Medicine" 4 Mal jährlich frei Haus.

Näheres unter
www.eubs.org/Applicat.htm



Abbildung 1

Intensiv-Therapie in einer großen Mehrplatz-Behandlungsdruckkammer (Karolinska, Stockholm, Schweden). Alle medizinisch-technischen Geräte (Ventilator, Perfusoren, Monitore, ICU-Bett, ...) müssen in der EU gemäß Medizinproduktegesetz (MPG) und MPG-Betreiberverordnung zum Betrieb in einer Behandlungsdruckkammer zugelassen und regelmäßig überprüft werden. Die Red. Foto: F. Lind, mit freundlicher Genehmigung.

Abstract

Hyperbaric oxygen treatment (HBOT) of critically ill patients requires special technology and appropriately trained medical team staffing for '24/7' emergency services. Regardless of the chamber system used it is essential that the attending nurse and critical care specialist understand the physics and physiology of hyperbaric oxygen for safe treatment and compression/decompression procedures. Mechanical ventilation through endotracheal tube or tracheotomy is hampered by the increased gas density and flow resistance with risks of hypoventilation, carbon dioxide retention and oxygen seizures. Ventilation should be controlled and arterial and end-tidal carbon dioxide levels monitored. Haemodynamically unstable patients require careful risk-benefit evaluation, invasive monitoring and close supervision of inotropes, vasopressors and sedative drug infusions to avoid blood pressure swings and risk of awareness. Two distinctly different chambers are used for critical care. Small cost-efficient and easy-to-install acrylic monoplace chambers require less staffing and no inside attendant. Major disadvantages include patient

Zusammenfassung

Die Hyperbare Sauerstoff-Therapie (HBO) von kritisch kranken Patienten erfordert spezielle Techniken und ein adäquates, geschultes Behandlungsteam für eine '24/7' Notfallbereitschaft. Unabhängig vom verwendeten Druckkammersystem ist dabei Grundvoraussetzung für eine sichere Therapie, Kompression und Dekompression, dass betreuendes Pflegepersonal und Intensivmediziner die Physik und Physiologie des hyperbaren Sauerstoffs verstehen. Eine mechanische Beatmung via Endotrachealtubus oder Tracheostoma wird durch erhöhte Gasdichte und Atemwiderstände behindert. Hier besteht das Risiko der Hypoventilation, der CO₂-Retention und von Sauerstoff-induzierten generalisierten Krampfanfällen. Die Beatmung sollte kontrolliert erfolgen, arterielle und endexpiratorische CO₂-Werte sollten überwacht werden. Häodynamisch instabile Patienten erfordern eine sorgfältige Risiko-Nutzen-Evaluation, invasives Monitoring und engmaschige Überwachung von inotropen, vasopressiven und sedativen Medikamenten-Infusionen, um Schwankungen des Blutdrucks und der Narkosetiefe zu verhindern. Für Intensiv-Patienten werden zwei

isolation with difficulties to maintain standard organ support and invasive monitoring. Monoplace ventilators are less advanced and require the use of muscle relaxants and excessive sedation. Intravenous lines must be changed to specially designed IV pumps located outside the chamber with chamber pass-through and risk of inaccurate drug delivery. The multiplace chamber is better suited for HBOT of critically ill patients with failing vital functions and organ systems, primarily because it permits appropriate ICU equipment to be used inside the chamber by accompanying staff. Normal 'hands-on' intensive care continues during HBOT with close attention to all aspects of critical patient care. A regional trauma hospital-based rectangular chamber system immediately bordering critical care and emergency ward facilities is the best solution for safe HBOT in the critically ill. Disadvantages include long-term commitment, larger space requirements and higher capitalization, technical and staffing costs.

Keywords

Hyperbaric oxygen therapy, intensive care medicine, pressure chambers, safety, review article

grundsätzlich verschiedene Druckkammersysteme verwendet. Kleine, kosteneffektive und einfach zu installierende Monoplace-Druckkammern aus Acryl benötigen weniger Personal und keine Begleiter in der Druckkammer. Hauptnachteil ist die Isolierung des Patienten und die damit schwierige Aufrechterhaltung einer standardisierten Intensiv-Überwachung und Unterstützung der Organfunktionen. Beatmungsgeräte für Monoplace-Druckkammern sind weniger modern und erfordern die Anwendung von Muskelrelaxantien in tiefer Sedierung. Intravenöse Zugänge müssen durch spezielle i.v.-Pumpen ausserhalb der Druckkammer und Kammerwand-Durchführungen geführt werden - mit dem Risiko inkorrekt dosierter Medikamenten-Dosierungen. Mehrplatz-Behandlungsdruckkammern sind für eine HBO-Therapie von Intensiv-Patienten mit kritischen Vital- und Organfunktionen besser geeignet, vor allem, da sie den Einsatz der üblichen ICU-Ausrüstung durch Begleitpersonal innerhalb der Druckkammer erlauben. Normale 'hands-on' Intensivpflege kann auch während der HBO-Therapie kontinuierlich fortgeführt werden, mit Wahrnehmung aller Aspekte der Intensivmedizin. Eine Mehrplatzdruckkammer im Rechteck-Design in einem regionalen Unfallkrankenhaus mit direkter Anbindung an Intensivstation und Notfallaufnahme ist die beste Lösung für eine sichere HBO-Therapie für Intensivpatienten. Nachteile beinhalten den hohen Zeitaufwand, größere Platzanforderungen, sowie höhere Anschaffungs-, Technik- und Personalkosten.

Schlüsselwörter

Hyperbare Sauerstoff-Therapie, Intensivmedizin, Druckkammern, Sicherheit, Review-Artikel

Introduction

This review is influenced by 25 years of clinical hyperbaric work by the author as a specialist in anaesthesia and intensive care medicine, with research and development of hyperbaric medicine in a hyperbaric oxygen treatment (HBOT) facility with multiplace ICU capability and 24-hour emergency services in the academic university trauma hospital setting. Since 2006, the Karolinska University Hospital has used a large four-lock rectangular chamber immediately bordering the ICU, staffed and equipped for simultaneous full intensive care of up to four critically ill adult or paediatric patients with failing vital functions.[1] In cooperation with manufacturers, Germanischer Lloyd and the Karolinska Biome-

dical Engineering Department, many of the medical devices like infusion pumps, patient monitors, the patient data management system, defibrillator and ventilator have received CE approval for use within the hyperbaric chamber.[2]

Since 1992, the Karolinska has also had monoplace chambers in daily clinical practice, introduced for daily elective treatments in spontaneously breathing patients.

Monoplace chambers have been found valuable for emergencies, traumatic ischaemic conditions, neurosurgical infections and also in spontaneously breathing intensive care patients. This experience of monoplace practice has been augmented by repeated visits to hyperbaric units in Salt Lake City, Long

Beach, San Pablo and other reputable American centres, generally run by specialists in pulmonary critical care or emergency medicine, where monoplace chambers are used extensively.



Abbildung 2

Fahrstand einer großen Mehrplatz-Behandlungsdruckkammer (Karolinska, Stockholm, Schweden). Foto F. Lind, mit freundlicher Genehmigung.

A large number of experienced and dedicated nurses, technicians and colleagues at the Karolinska have helped to develop our multiplace and monoplace programmes to ensure that HBOT can be performed safely in patients of all ages. With appropriate monoplace chamber pass-throughs and infusion pumps, drugs can be administered continuously intravenously and through an epidural catheter during HBOT. This makes it possible to combat pain, anxiety and nausea effectively. The mono place has also been used to treat many newly extubated intensive care patients, especially in small children who will not easily be persuaded to breathe through a mask or a hood in the multiplace chamber. An intensive care nurse can accompany the child in the monoplace chamber and deliver all drugs manually for

constant drug delivery and to keep lines from clotting. However, we have not used the monoplace in intubated patients nor in unstable patients or 'when in doubt', e.g., worries over pulmonary oedema or immediately after a central line has been inserted (with risk of pneumothorax), when we have taken the option to use the multiplace chamber.

With this background of personal experience and having never treated an intubated, unstable patient in a monoplace chamber, this pro/con review contrasts mono- and multiplace hyperbaric chambers for critical care. My views on how to design a new hospital-based hyperbaric facility with ICU capabilities were presented at the 2012 European Committee for Hyperbaric Medicine Consensus Conference in Belgrade; and again at the 2013 Conference on Diving Physiology and Hyperbaric Medicine in Japan.[3,4]

Background

HBOT has been used clinically for critically ill patients for over 60 years, [1,5-11] and the two distinctly different types of chambers contrasted in this review have also been available since the 1960s. In treating the critically ill patient safely with HBOT, like with many other medical interventions, it is important to do a risk/benefit assessment. This requires unique competence both in the complex pathophysiology of the conditions treated as well as knowledge of HBOT physics and physiology to avoid possible complications unique to HBOT exposure. Ventilation, whether spontaneous or ventilator-assisted, is hampered by the increased gas density at depth. This does not affect oxygen (O_2) uptake but can lead to hypoventilation. At 283 kPa pressure, the three-fold density causes a doubling of flow resistance with a need for change in ventilator settings to avoid harmful high pressure, hypoventilation and carbon dioxide (CO_2) retention which, in turn, increases cerebral blood flow and the risk of O_2 seizures. Ventilation should be well controlled including careful monitoring of arterial blood gases and end-tidal CO_2 . [12]

Haemodynamically unstable patients require careful risk-benefit evaluation and close supervision due to, for example, O_2 -induced systemic vasoconstriction with changes in preload and afterload. During HBOT, patients with hypervolaemia and/or reduced left ventricular function are in danger of acute cardiogenic pulmonary oedema, especially if treated supine. Patients in septic shock risk hypovolaemia after HBOT when vasoconstriction and thoracic blood

pooling cease. Short-term, reversible hypoxaemia is frequently seen immediately after HBOT due to atelectasis and changes in central haemodynamics.[13]

Time to treatment is crucial for acute HBOT indications, for example, cerebral arterial gas embolism in a comatose diver after free ascent or in the anaesthetized patient not waking up after open heart surgery; the burns victim with carbon monoxide (CO) and cyanide poisoning and inhalation injuries; the unstable, septic fasciitis patient with multi-organ failure or the motorcyclist with multiple trauma with crush injuries, arterial damage with ischaemia or with reperfusion injury after vascular reconstruction. In general, the earlier these patients are treated, the better the outcome.

Critical care HBOT 24/7 is often not available in hospital-based HBOT centres due to lack of funding, experience, specialized equipment, intensive care unit cooperation, trust between specialties, staffing, etc. The political and historical background of each hospital, region, country and continent has influenced the location and critical care capabilities of available HBOT facilities. The design of a HBOT facility often depends on the individual physician in charge, accepted indications and how sick the patients are, i.e.,



Abbildung 3

Vorbereitung eines Intensivpatienten zur Therapie in einer Monoplace-Behandlungsdruckkammer; Foto: Lindell K Weaver, mit freundlicher Genehmigung

whether emergency care is required. We therefore have a multitude of different solutions globally regarding the availability of HBOT and the use of mono- or multiplace hyperbaric chambers for critical care.

MULTIPLACE CHAMBERS

Multiplace steel chambers are designed with two or more independent compartments (locks) to accommodate patients and hyperbaric staff who may enter

and exit the chamber via an adjacent lock during therapy. The multi place chamber is compressed with air. Patients are provided with oxygen via an individualized built-in breathing system, usually a mask or head hood or by mechanical ventilation via an endotracheal or tracheostomy tube. Dedicated air compressors and large low- or high-pressure receivers provide the chamber air supply. A specialized fire suppression system with water tanks for each lock is necessary. A multiplace chamber allows appropriate ICU equipment to be used bedside/inside the chamber by the accompanying staff.

MONOPLACE CHAMBERS

Monoplace chambers are designed for single occupancy, usually constructed of see-through acrylic with a pressure capability of 304 kPa and pressurized with 100% O₂, which allows the patient to breathe comfortably without a mask or hood. The high-flow O₂ requirement is ideally supplied via a hospital's existing liquid O₂ system. Operators and medical staff maintain communication with the patient via intercom. Technical inventions and modifications of the medical equipment allow critically ill and ventilator-dependent patients to undergo HBOT without accompanying staff.

Multiplace chamber advantages

- Hands-on patient attendance and bedside medical and nursing supervision of all aspects of evaluation and treatment;
- Immediate medical interventions by the inside attendant, including endotracheal suctioning, resolving acute airway obstruction, defibrillation or a chest tube insertion; additional staff can be locked in during
- medical emergencies;
- Not having to change bed or monitoring in modern chambers with spacious design and wide doors;
- Uninterrupted mechanical ventilation via a battery-powered, modern, state-of-the-art ICU ventilator that does not have to be disconnected throughout transport and HBOT;
- Uninterrupted, continuous and reliable infusions via battery-powered infusion pumps approved for hyperbaric use that do not have to be disconnected during transport or HBOT; septic or otherwise haemodynamically unstable patients, in particular, require accurate haemodynamic monitoring, uninterrupted vasoactive drug infusions and continuous blood, fluid and electrolyte therapy during treatment; there is a particular need for close attention of inotrope and vasopressor infusions during pressurization of the chamber

when remaining gas in a syringe and/or tubing may reduce or even cease drug delivery which is not detected by the syringe pump but can be corrected manually by accompanying staff;[14]

- Less risk of barotrauma and iatrogenic air embolism during decompression than in a monoplace, as volume changes in an air-filled endotracheal cuff or in IV containers can be corrected immediately;
- Defibrillation if need be with battery-powered defibrillator;
- Catastrophes: a trauma centre will normally be best prepared and equipped to take care of several critically ill patients simultaneously, e.g., a family with CO poisoning and smoke inhalation injuries found comatose inside a burning apartment;
- There are more options regarding tables with choice of pressure and treatment gas; it is also possible to conduct a neurological examination to help guide treatment in severe cases of decompression illness.

Multiplace chamber disadvantages

- High capitalization, technical and staffing costs;
- Large space requirements, difficult to install close to the ICU in old hospitals, and a long-term commitment; once installed it is difficult and expensive to change facility and location due to weight, dimensions and associated compressor, fire extinguishing and other systems;
- Limited availability of multiplace HBOT facilities with ICU capability and 24-hour emergency services;
- Many multiplace chambers in use today are not located in regional centres; often they are in a less specialized hospital without intensive care resources and not accustomed to multidisciplinary treatment programmes; competence will limit referrals;
- Critical care and emergency patients 'disturb' regular planned HBOT practice in the multiplace; depending upon configuration and size there will be a conflict of interest to immediately prepare for an emergency treatment and stop an ongoing elective treatment;
- Risk of decompression sickness (DCS) in the attending staff; more staff are needed with repeat sessions with the risk of not having staff available;
- Risk of barotrauma and iatrogenic air embolism; e.g., during pressurization and decompression the endotracheal cuff can harm the trachea due to overpressure or leak; during decompression, expanding gas in a plastic or glass bottle can give rise to venous air embolism;
- Increased risk of nosocomial infection; special

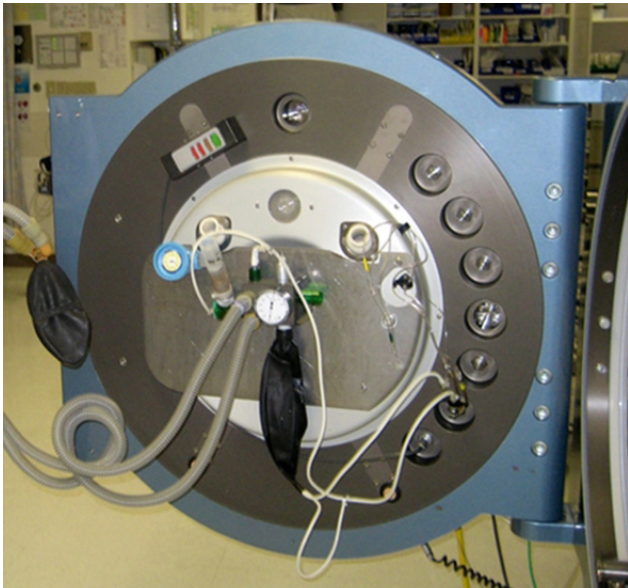
cleanliness considerations, hygiene procedures and technical solutions are needed.

Monoplace chamber advantages

- Cost-efficient delivery of HBOT (capitalization and operating costs) with less financial risk so that more hospitals in less densely populated areas can deliver HBOT in a timely fashion;
- Flexibility, they can be installed within an existing ICU if sufficient space is available;
- Require less staffing and no inside attendant, i.e., no risk for DCS;
- Better hygiene and less risk of nosocomial infection;
- Excellent delivery tool in awake spontaneously breathing children; after extubation, children can be treated together with accompanying nurse who can manually deliver most IV drugs, epidural pain relief, etc.

Monoplace chamber disadvantages

- Patient isolation
- Use of muscle relaxants and/or restraints to prevent the patient from pulling out tubes, lines, catheters, etc;
- Risk of awareness from inadequate sedation and analgesia whilst being unable to move or communicate their anxiety, pain and discomfort;
- Hypotension if too much sedation, especially in comatose patients from CO/cyanide poisoning or cerebral arterial gas embolism and in the unstable patient with necrotizing infection coming directly from the operating room;
- Pneumothorax is difficult to treat and diagnose; chest tubes with negative pleural suction or a one-way Heimlich valve can be used, but a pneumothorax under pressure becomes a tension pneumothorax and medical emergency during decompression with major impairment of respiration and/or blood circulation;
- Acute airway obstruction; the mechanically ventilated, intubated patient often requires frequent endotracheal suctioning which is very difficult in a monoplace;
- Difficult to monitor and correct the patient's vital functions throughout the HBOT session, e.g., diuresis, fluid and electrolyte status, arterial blood gases and end-tidal CO₂;
- Change of ICU bed to an uncomfortable mattress on stretcher with risk of pressure ulcers;
- Risk of acute cardiogenic pulmonary oedema, especially if treated supine;
- The oxygen environment and fire hazard limits the use of a variety of specialized critical care equipment inside the chamber;



Abbildungen 4 und 5

Intensivmedizin in einer Monoplace-Behandlungsdruckkammer erfordert ggf. zahlreiche Durchgänge für i.v.-Medikamente. Fotos: Lindell K Weaver, Salt Lake City, USA, mit freundlicher Genehmigung

- Mechanical monoplace ventilators located inside the chamber lack modern control, modes and settings;
- Infusion pumps are located outside the chamber; inaccurate drug delivery especially with low delivery rates becomes a real problem in unstable patients; tubing compliance during compression and decompression may affect fluid volumes delivered by the pump since it has to overcome the chamber overpressure;[15]
- Limited number of pass-through tubes for conveying IV fluid to a patient under pressure;
- Bolus doses of drugs are difficult unless the IV line is dedicated to that drug;
- Suction can only be accomplished by specially

adapting existing hospital equipment;[16,17]

- Time-consuming changes of lines before and after treatment, with consequent risk of contamination.

Discussion

Regardless of chamber system, HBOT of critically ill patients should be regionalized to maintain quality and cost effectiveness with good helicopter and other emergency transportation services.[3,4] Hyperbaric intensive care should be performed within a hospital and be supervised by properly trained and experienced medical staff with intensive care skills. Out-patient hyperbaric chambers are not recommended even though many emergencies are still being treated in such facilities because of lack of alternatives. The chamber should preferably be located in close proximity to the ICU to minimize the risk of transport-, equipment-, staff- or patient-related problems. It should be operated and maintained according to written guidelines and regulations. In Europe, a "European code of good practice for HBO therapy"[18] (to be revised 2015, <www.ECHM.org>) should be followed. If appropriate safety precautions are not strictly adhered to, catastrophic accidents may continue to occur regardless of chamber type!

A regional trauma hospital-based, large, three to four lock, multiplace, rectangular chamber immediately bordering the ICU, staffed and equipped for full intensive care is the ideal (see front cover photo of the Karolinska facility). In reality, this is uncommon and it is evident that appropriately medically-equipped monoplace and smaller multiplace chambers in less ideal locations are being used to treat critically ill and ventilator-dependent patients. Critically ill patients can be managed in many different settings providing the facility is staffed with physicians, nurses and therapists skilled in their care and possessing a thorough understanding of hyperbaric physiology and the medical techniques unique to HBOT. Several modifications of chamber and equipment have to be implemented, which requires technical competence.[16,17]

The monoplace chamber, although less well suited for intensive care can be used to treat critically ill patients and permit clinical research (Figure 1). The safe treatment of severe, traumatic brain injury patients, including monitoring of cardiovascular and ventilatory parameters as well as intracranial pressure, brain tissue oxygen levels, brain temperature and cerebral microdialysis, provides an example of what is possible using a monoplace chamber.[19] This re-

quired specially modified equipment for ventilation, monitoring and management of the patient. Ventilator-dependent neonatal patients with acute hypoxic ischaemic encephalopathy and necrotizing enterocolitis have also been treated in the monoplace chamber, given bag-valve-mask ventilation by an accompanying neonatologist during the treatment.[20]

A hyperbaric critical care patient data management system should be in place in order to provide continuous bedside and remote clinical patient documentation and Information.[2-4] At the Karolinska, data are fed into a central clinical information management system to monitor, display trends and record data of vital parameters, ventilator settings and drugs. This has improved the quality of care during HBOT and facilitated research and development in hyperbaric medicine.

Conclusion

The multiplace chamber is better suited than a monoplace chamber for HBOT of critically ill patients with failing vital functions and organ systems, primarily because it permits appropriate ICU equipment to be used inside the chamber by bedside staff accompanying the patient in the chamber.

References

1. Lind F, Ohlen G, Linden V, Eriksson B, Frostell C. *Treatment with hyperbaric oxygen (HBO) at the Karolinska University Hospital*; A Stockholm County Council report on the clinical practice and evidence basis of hyperbaric medicine. Stockholm: Stockholms Lans Landsting; 2011. Available from: <http://www.hyperbaricoxygen.se>
2. Kronlund P, Olsson D, Lind F. Hyperbaric critical care patient datamanagementsystem. *Diving Hyperb Med*, 2012;42:85-7.
3. Lind F. How I would design my HBO facility. In: The Proceedings Book of the 9th ECHM Consensus Conference on Organisation of a Clinical Hyperbaric Therapy Centre and Related Health Management Issues. Belgrade, Serbia: European Committee for Hyperbaric Medicine; 2012. p. 3-10.
4. Lind F. The design of a therapeutic hyperbaric facility for emergencies. In: Mano Y, editor. *Proceedings of the 4th Conference on Diving Physiology, Technology and Hyperbaric Medicine*. Tokyo: The Japanese Society of Hyperbaric and Undersea Medicine; 2013.
5. Brummelkamp WH, Hoogendijk J, Boerema I. Treatment of anaerobic infections (clostridial myositis) by drenching the tissues with oxygen under high atmospheric pressure. *Surgery*. 1961;49:299-302.
6. Keenan Hf, Bratton SL, Norkool DM, Brogan 1Y, Hampson NB. Delivery of hyperbaric oxygen therapy to critically ill, mechanically ventilated children. *J Crit Care*. 1998;13:7-12.
7. Marroni A, Mathieu D, Wattel F, editors. *ECHM 2004 Consensus Conference, Lille. The ECHM Collection*. Flagstaff, AZ: Best Publishing Company; 2007. Also available from: <http://www.echm.org>
8. Bitterman H. Bench-to-bedside review: oxygen as a drug. *Critical Care*. 2009;13:205-12.
9. Moon RE, Camporesi EM. Clinical care in extreme environments. In: Miller RD, Editor. *Miller's Anesthesia*, Philadelphia, PA: Saunders, 2015. p. 2674-704.
10. Weaver LK. Hyperbaric oxygen in the critically ill. *Crit Care Med*. 2011;39:1784-91.
11. Frawley G, Bennett M, Thistlethwaite K, Banham N. Australian paediatric hyperbaric oxygen therapy 1998-2011. *Anaesth Intensive Care*. 2013;41:74-81.
12. Handell S, Ansjon R, Castor R, Lind F. Respiratory CO₂ monitoring of the critically ill patient in the multiplace chamber. In: Schutz J and 'Aendling J editors. *Proceedings of the 18th Annual Meeting of the European Underwater and Baromedical Society*. Basel: European Underwater and Baromedical Society; 1992. p. 59-61.
13. Ratzenhofer-Komenda B, Offner A, Quehenberger F, Klemen. H, Berger J, Fadai JH, et al. Hemodynamic and oxygenation profiles in the early period after hyperbaric oxygen: an observational study of intensive-care patients. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2003;47:54-8.
14. Hopson ASM, Greenstein A. Intravenous infusions in hyperbaric chambers: effect of compression on syringe function. *Anaesthesia*. 2007; 62: 602-4.
15. Bell J, Weaver LK, Deru K. Performance of the Hospira Plum A+ (HB) hyperbaric infusion pump. *Undersea Hyperb Med*, 2014 ;41:235-43.
16. Weaver, LK. Monoplace hyperbaric chambers. In: Thom SR, Neuman T, editors. *The physiology and medicine of hyperbaric oxygen therapy*. Philadelphia: Saunders/Elsevier; 2008. p. 27-35.
17. Weaver, LK. Critical care of patients needing hyperbaric oxygen. In: Thom SR, Neuman T, editors. *The physiology and medicine of hyperbaric oxygen therapy*. Philadelphia: Saunders/Elsevier, 2008. p. 117-29.
18. Kot J, Desola J, Simao AG, Gough-Allen R, Houman R, Meliet JL, et al. A European code of good practice for hyperbaric oxygen therapy. *Int Marit Health*, 2004;55:121-30.
19. Gossett WA, Rockswold GL, Rockswold SB, Adkinson CD, Bergman TA, Quicquel RR. The safe treatment, monitoring and management of severe traumatic brain injury patients in a monoplace chamber. *Undersea Hyperb Med*. 2010;37 :35-48.
20. Sanchez EC. Use of hyperbaric oxygenation in neonatal patients: a pilot study of 8 patients. *Crit Care Nurs Q*. 2013;36:280-9.

Acknowledgement

I would like to thank Lindell K Weaver, Salt Lake City, for his support and critical reading of this paper.
Submitted: 09 November 2014; revised 31 January 2015
Accepted: 03 February 2015

HBO

beim diabetischen Fuß erneut falsch dargestellt



Autor

Dr. med.
Christian Oest
Vorsitzender des VDD e.V.

Vangerowstr. 18/1
69115 Heidelberg
Tel. 0662-602653
Fax. 0662-602655
E-mail:
info@vdd-hbo.de
www.vdd-hbo.de

Die Anerkennung der HBO-Wirksamkeit beim Diabetischen Fußsyndrom (DFS) hat sich in den letzten Jahren erfreulich entwickelt. Die Ergebnisse älterer, aus EBM-Sicht schwächerer Studien konnten durch neuere, hochwertige Studien untermauert werden. Insgesamt zeigen sich konsistente Ergebnisse für die HBO-Wirkung auf Wundheilung und Reduzierung von Major-Amputationen.

Dies führte 2008 zum positiven g-BA Beschluss zu HBO bei DFS [1], sowie zur guten Beurteilung der HBO bei DFS in der S3-Leitlinie der DGFW 2014 [2]. Aktuell untersucht das IQWiG (Institut für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen) im g-BA-Auftrag erneut die Studienlage zur HBO bei DFS. Laut IQWiG-Vorbericht ist für „Wundverschluss“ ein patientenrelevanter Nutzen der HBO bei DFS belegt [3].

Zum g-BA-Beschluss von 2008 [1] ist anzumerken, dass sich der g-BA bislang sicher nicht den Ruf

erarbeitet hat, neue Therapieverfahren leichtfertig zu Lasten des Gesundheitssystems zuzulassen. Eine vergleichbare Einschätzung gilt für das IQWiG [3]. Beide Institutionen sind aufgrund ihrer EBM-Standards als hohe Hürden für neue Therapieverfahren bekannt.

Das Bundessozialgericht beurteilte inzwischen die Einschränkung des g-BA-Beschlusses von 2008 auf stationäre Patienten als „rechtswidrige Beschränkung“ [4]. So können in Deutschland endlich auch ambulante DFS-Patienten ab Wagner Grad III zu Lasten der gesetzlichen Krankenkassen adjuvant mit HBO behandelt werden.

Die DGFW-Leitlinie von 2014 [2] zeigt, wie schlecht (im Vergleich zur HBO) die EBM-Datenlage für andere Verfahren zur Wundtherapie teilweise ist. Darunter zahlreiche Methoden, die in Deutschland tagtäglich angewandt werden. Die multidisziplinäre DGFW-Leitlinie von 2014 wird u.a. von der Deutschen Diabetes Gesellschaft (DDG) mitgetragen.

In dieser Situation verwundert ein aktueller Artikel „Hyperbare Sauerstofftherapie – Erneut kein Nutzen bei diabetischen Fußulzera“ mit einem Kommentar von Prof. Maximilian Spraul, in welchen er endet, dass aus seiner Sicht die HBO-Therapie nicht verwendet werden sollte, da kein Effektivitätsnachweis dieser teuren Therapie vorläge... [5]. Er stützt sich in diesem Artikel auf eine Publikations-Auswahl, die bei genauer Betrachtung dazu nicht geeignet sind.

In den Publikationen von Margolis et al. [6] und Fedorko et al. [7] sieht Prof. Spraul Anlass, die international akzeptierte Studienlage erneut anzuzweifeln. Beide Untersuchungen leiden aber vor Allem unter dem Mangel der international und auch in Deutschland festgeschriebenen Vorgabe „Wagner Stadium III“ zur Grundlage der Indikationsstellung zu machen. Außerdem fehlt in beiden Studien der

Nachweis, dass die Wunden hypoxisch waren und damit die HBO überhaupt indiziert war. So hilft auch das Konzept einer RCT-Studie nicht, weil die für eine erfolgreiche Anwendung der HBO erforderlichen Voraussetzungen nicht gegeben sind (Bias).

Wenn man in Prof. Spraul, langjähriger Vorsitzender der Arbeitsgemeinschaft „Diabetischer Fuß“ in der DDG, ein Sprachrohr der DDG sieht, ist es bedauerlich, dass er (erneut) den Versuch macht, geeigneten Patienten den rechtlich möglichen Zugang zu der Therapie mit Aussicht (nicht Garantie) auf Besserung dadurch zu erschweren, dass er dazu auffordert, die HBO nicht einzusetzen. Dazu führt er die Entlastungsmaßnahme „Total Contact Cast“ als therapeutische Alternative auf. Es wird dabei übersehen, dass HBO nur adjuvant unter Fortführung aller sonstigen Behandlungsmodalitäten eingesetzt werden soll, selbstverständlich zuvorderst auch mit Entlastungsmaßnahmen. Weitere Auffälligkeiten der von Prof. Spraul zitierten Studien:

Margolis et al. [6] kommen zu dem Schluss, dass der Einsatz der HBO weder die Wundheilung verbessert noch Amputationen verhindert. Dem ist entgegenzuhalten, dass diese retrospektive Arbeit (Evidenzklasse 3) die vorliegenden RCTs (Evidenzklasse 1b) nicht entkräften kann. Die Studie zeigt, dass das in den Zentren von Margolis et al. verwendete Behandlungskonzept dort nicht greift und an den international üblichen Standard (MediCare, UHMS, g-BA, S3-Leitlinie, ...) anzupassen wäre. Es wurden zu viele Fälle mit Wagner Grad II eingeschlossen (54,3%), die auch so hätten heilen können. Die in der Placebo-Gruppe heilenden Fälle zeigen das. Die ungleichen Gruppen erhielten zu wenige Behandlungssitzungen bei eher niedrigem Druck. Die höhergradigen Wagnerstadien heilten vermutlich wegen fehlender Eignung nicht wie in der sonstigen Literatur, das Vorliegen einer Hypoxie (tcpO₂) wurde nicht gemessen. Die Arbeit von Margolis et al. ist daher ein untaugliches Argument, um geeigneten DFS-Patienten die HBO vorzuenthalten.

Fedorko et al. [7] kommen zu dem gleichen Schluss wie Margolis et al. Die Studie leidet unter ähnlichen Mängeln und kann ebenfalls nicht zur Disqualifizierung der HBO beim DFS herangezogen werden. Folgende Mängel sind festzustellen: Eine große Anzahl Patienten hatte Wagner Grad II (44,6%). In der Bewertung aufgrund fotografischer Beurteilung ob „Kriterien für eine Amputation“ erfüllt sind, wird nicht klar, ob es hier Patienten gegeben hat, die dann

doch heilten. Die tatsächlichen Amputationsraten werden nicht erwähnt.

Weiter fällt in der Argumentation von Prof. Spraul auf, dass mit reinen Vermutungen argumentiert wird, warum wohl das immer überaus kritisch beurteilende IQWiG einen Vorteil der HBO bei der Wundheilung gesehen habe. Seine Vermutung, man habe wohl nur ältere Arbeiten berücksichtigt und nicht auch z.B. Löndahl et al. 2010 [8] u.a., ist nicht nachzuvollziehen. Unter den zahlreichen HTA-Berichten mit weltweit positiver Beurteilung der HBO beim DFS, darunter auch die oben genannten aus Deutschland, wählt der Autor mit NICE [9] ausgerechnet einen Bericht aus, der sich gegen die HBO stellt.

Christian Oest

Literatur

1. Gemeinsamer Bundesausschuss: Abschlussbericht: Hyperbare Sauerstoffbehandlung, Indikation Diabetisches Fußsyndrom 18.11.2008. <https://www.g-ba.de/downloads/40-268-748/2008-11-13-Abschluss-HBO-dia-Fusssyndrom.pdf>
2. S3-Leitlinie 091-001 „Lokaltherapie chronischer Wunden bei den Risiken CVI, PAVK und Diabetes mellitus“ http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/091-001_S3_Lokaltherapie_chronischer_Wunden_2012-06.pdf
3. IQWiG Vorbericht 18.12.2015 Hyperbare Sauerstofftherapie bei diabetischem Fußsyndrom. Auftrag: N15-02, Version: 1.0
4. Urteil des Bundessozialgerichtes vom 07.05.2013 (Az.: B 1 KR 44/12 R) festgestellt. <http://juris.bundessozialgericht.de/cgi-bin/rechtsprechung/>
5. Spraul M.: Erneut kein Nutzen der HBO bei diabetischen Fußulzera - kein Grundmehr, die hyperbare Sauerstofftherapie anzuwenden. Info Diabetologie 2016;10: 11-12
6. Margolis D, Gupta J, Hoffstad O, Papadopoulos M, Glick H, Thom S, and Mitra N. Lack of effectiveness of hyperbaric oxygen for the treatment of diabetic foot ulcer and the prevention of amputation. Diabetes Care published online February 19, 2013
7. Fedorko et al. Hyperbaric oxygen therapy does not reduce indications for amputation in patients with diabetes with nonhealing ulcers of the lower limb: a prospective, double-blind, randomized controlled clinical trial. Diabetes Care 2016;39: 392
8. Löndahl et al. Hyperbaric Oxygen Therapy Facilitates Healing of Chronic Foot Ulcers in Patients With Diabetes. Diabetes Care 2010;33:998-1003, 2010
9. NICE clinical guideline 119 Diabetic foot problems. HYPERLINK "<http://www.nice.org/guidance/CG119>" www.nice.org/guidance/CG119

Leserbriefe

zu PRO und CONTRA Tauchtauglichkeit bei
Kindern & Jugendlichen mit Diabetes Mellitus

Die Leserbriefe beziehen sich auf folgende Caisson-Artikel:

PRO: Karsten Theiss



Tauchtauglichkeit bei Kindern & Jugendlichen mit Diabetes Mellitus

Link und QR-Code: <http://www.gtuem.org/files/336/theiss-k-tauchtauglichkeit-bei-kindern-und-jugendlichen-caisson3-2015-s-58-59.pdf>

CONTRA: Roswitha Prohaska



Tauchtauglichkeit jugendlicher Diabetiker ist kritisch zu sehen!

Link und QR-Code: <http://www.gtuem.org/files/352/prohaska-r-tauchtauglichkeit-jugendlicher-diabetiker-ist-kritisch-zu-sehen-caisson1-2016-s-38-40.pdf>



Leserbrief

Dr. Benno Kretzschmar
Sprecher der Arbeitsgruppe
Kinder- & Jugendtauchen
in der Ges. f. Pädiatrische
Sportmedizin e.V.
FA für Kinder- & Jugendmedizin,
Taucherarzt GTÜM Klinik
für Kinder & Jugendmedizin,
Sankt Georg Klinikum Eisenach

kretzschmar@stgeorgklinikum.de
(gemeinsam verfasst mit
Karsten Theiss, s.u.)

Den Ausführungen von Frau Prohaska muss aus pädiatrischer Sicht widersprochen werden. Davon abgesehen, dass viele Ihrer Ausführungen sich allgemein auf Menschen mit Diabetes Mellitus beziehen und keinen speziellen Bezug zum Kindes- und Jugendalter haben, sind sie doch viel theoretischer Natur.

Wir müssen aufhören, nur aufgrund von theoretischen Überlegungen und hypothetischen Konstrukten Tauchverbote auszusprechen, sondern wir müssen an Hand der konkreten Lebensumstände und Situation konkreter Patienten eine - wie auch sonst in der Medizin übliche - individualisierte Beurteilung vornehmen. Dieses ist z.B. für die Hypertonie und die Herzinsuffizienz schon lange so in der Checkliste Tauchtauglichkeit verankert.

Viele Kinder und Jugendliche mit insulinpflichtigem Diabetes Mellitus sind sportlich sehr aktiv, zum Teil bis in den Leistungssport hinein. Es gibt somit überhaupt keinen Grund, warum man generell diese Menschen von der Ausübung des Tauchsportes ausschließen sollte. Genauso wenig im Umkehrschluss kann daraus gezogen werden, dass alle Kinder mit Diabetes Mellitus tauchen sollen!

Wie immer bei der Beurteilung der Tauchtauglichkeit eines Patienten hängt es von der Krankheit ab, der Anamnese, der klinischen Ausprägung und des umgebenden Settings (inwieweit sind Eltern,

Tauchlehrer, Tauchverein usw. involviert?). Die letztendliche Beurteilung, ob ein Kind oder Jugendlicher mit Diabetes Mellitus tauchtauglich ist oder nicht, sollte daher in enger Absprache von dem Taucherarzt, dem betreuenden Kinder- und Jugendarzt bzw. Kinder- und Jugenddiabetologen, den Eltern und vor allem des Tauchlehrers erfolgen. Auf genau diese individualisierte Betrachtungsweise der Patienten bei verschiedenen Erkrankungen zielt der von

unserer Fachgesellschaft herausgegebene Tauchtauglichkeitsuntersuchungsbogen für Kinder und Jugendliche ab.

Dr. Benno Kretzschmar & Karsten Theiss

Der Leserbrief von Karsten Theiss ist eine Ergänzung des obigen gemeinsam mit Dr. Benno Kretzschmar verfassten Leserbriefes. Da der Umfang mit über 4 Seiten den Rahmen an dieser Stelle sprengt, können sie den Leserbrief unter dem folgenden Link herunterladen: <http://www.gtuem.org/files/341/karsten-theiss-leserbrief-an-caisson-15-02-2016.pdf>



Leserbrief

Karsten Theiss
Facharzt für
Kinder- & Jugendmedizin
Diabetologe (DDG)
Taucherarzt (GTÜM)

Oststraße 68
66386 St. Ingbert
Email:
info@kinder-und-
jugendarzt-theiss.de



Als Tauchmediziner, aber vor allem als Diabetologe mit einer Diabetologischen Schwerpunktpraxis und mit über 10 Jahren Erfahrung beim Tauchen mit Diabetikern (auch Jugendliche) und in der Tauchausbildung von Diabetikern, habe ich die Diskussion mit großem Interesse verfolgt. Ich muss Frau Prohaska in allen dargestellten Punkten Recht geben.

Aber wo bleibt die Relevanz für das Kindertauchen. Das Unterzuckerungen die größte Gefahr beim Tauchen darstellen, mag richtig sein, aber das ist kaum kinderspezifisch. Zudem ist dieses häufig herausbeschworene Problem in der Praxis kaum relevant. Ca. 1-2% der Taucher sind insulinspritzende Diabetiker. Mir ist kein Fall eines Tauchunfalls bekannt, der mit dem Diabetes oder einer Unterzuckerung unter Wasser zusammen hängt. In über 100 Tauchgängen mit insulinspritzenden Diabetikern habe ich keine einzige Unterzuckerung erlebt, da alle Taucher entsprechend vorbereitet wurden.

Diabetiker mit häufigen, aber vor allem unbemerkten Hypoglycämien oder eingeschränkter Hypo-

Leserbrief

Dr. Hansjörg Mühlen
FA Innere Medizin
u. Allgemeinmedizin,
Diabetologe
Tauchtauglichkeits-
Diplom GTÜM, Duisburg

diabetologie@ruhrpraxen.de



Wahrnehmung gehören in allen Altersgruppen nicht unter Wasser.

Das körperliche Aktivität und versäumte Zwischenmahlzeiten die Gefahr von nächtlichen Hypos erhöht ist richtig, aber dies ist weder ein kinder- noch

ein tauchspezifisches Problem. Sollen wir aus Angst vor nächtlichen Hypos unseren diabetischen Kindern allgemein Sport verbieten? Unterkühlungen sollen immer bei Kindern vermieden werden. Bei richtiger Ausbildung der Kinder (und meist auch der Eltern) mit langsamer Gewöhnung an die Belastung und entsprechender Testung der Blutzucker-Reaktion auf körperliche Belastung ist die Insulindosierung sehr wohl abzuschätzen, aber eben individuell. Es gibt weder für das Tauchen noch für andere Sportarten belegte Algorithmen zur Insulineinstellung.

Das Risiko von schweren Unterzuckerungen ist bei Kindern und Jugendlichen aufgrund der psychischen Probleme im Rahmen der Pubertät erhöht. Aus dem gleichen Grund ist auch das gesundheitsbewußt Verhalten eingeschränkt. Aber hiervon gibt es zahlreiche Ausnahmen.

Die Datenlage reicht sicher nicht, das Kindertauchen allgemein zu empfehlen, aber auch nicht für ein generelles Verbot. Alle aufgeführten Argumente

sind allgemeine Akzeptanz, Compliance und Schulungsprobleme, die genauso für Erwachsene gelten, aber keinesfalls allen Kindern und Jugendlichen die Tauchtauglichkeit absprechen. Wir haben bisher 3 Jugendliche im Alter von 14-18 Jahren ausgebildet. Bei allen Drei hat die Tauchausbildung und die damit verbundene Diabetesschulung zu einem erheblichen Motivationsschub und zu einer Verbesserung der Stoffwechseleinstellung geführt. Jede generelle Erlaubnis oder generelles Verbot ist fehl am Platz. Der individuelle Einzelfall entscheidet. Die Tauchtauglichkeit ist abhängig vom einzelnen Kind oder Jugendlichen und nicht von der Studienlage. Die Tauchsicherheit ist abhängig von der Qualifikation des Ausbilders bzw. des Buddys. Wir sollten uns eher über Ausbildungsrichtlinien unterhalten als über die Datenlage.

Dr. Hansjörg Mühlen

VDD mit neuem Vorstand



Am 19.02.2016 wählte der Verband Deutscher Druckkammerzentren (VDD e.V.), dem aktuell 15 Druckkammern angehören, einen neuen Vorstand (<http://www.vdd-hbo.de/vorstand-ansprechpartner/>).

Zum ersten Vorsitzenden des VDD wurde Dr. med. Christian Oest gewählt. Er ist Facharzt für Allgemein Chirurgie, Notfallmedizin und leitender Arzt des Druckkammerzentrums in Heidelberg. Wir wünschen Christian Oest einen guten, erfolgreichen Start in das neue Amt und freuen uns auf eine weiterhin gute Zusammenarbeit.

Dr. Karin Hasmler, GTÜM-Präsidentin



Dr. Christian Oest
VDD-Vorsitzender

Veranstaltungen der Fachgesellschaften



10th ECHM Consensus Conference on Hyperbaric Medicine

Termin: 15. - 16. April 2016
Tagungsort: Lille, Frankreich

Nähere Auskünfte: www.echm-lille-consensus-2016.org

Anerkannt als Weiterbildung für GTÜM- und ÖGTH-Diplome IIb und III



SPUMS 45th ASM 2016

Termin: 15. - 21. Mai 2016
Tagungsort: Fiji

Nähere Auskünfte: <http://www.spums.org.au/event/2016-spums-asm-fiji>

Anerkannt mit 16 UE für GTÜM- und ÖGTH-Diplome I und IIa & als Kongress für Diplome IIb und III



UHMS Annual Scientific Meeting 2016

Termin: 09. - 11. Juni 2016
Tagungsort: Las Vegas, USA

Nähere Auskünfte: www.uhms.org/annual-scientific-meeting/registration.html

Anerkannt mit 16 UE für GTÜM- und ÖGTH-Diplome I und IIa & als Kongress für Diplome IIb und III



42nd Annual Scientific Meeting of the European Underwater and Baromedical Society (EUBS) Genf, Schweiz

Termin: 13. - 16. September 2016

Nähere Auskünfte: www.eubs2016.com
eubs2016@ch.kuoni.com

Anerkannt mit 16 UE für GTÜM- und ÖGTH-Diplome I und IIa & als Kongress für Diplome IIb und III

Veranstaltungen der Fachgesellschaften



GTÜM-Symposium und Jubiläumsveranstaltung 20 Jahre Druckkammerzentrum Traunstein

Termin: Samstag, 4. Juni 2016, 9h bis ca. 17h
Tagungsort: Traunstein, Landratsamt
Themenschwerpunkte: HBO-Behandlung von Knochenerkrankungen
Freie Vorträge
Neues aus der Tauchmedizin

Abstracts für Vorträge und Poster bitte frühzeitig einreichen.
Anmeldung ab sofort möglich. Teilnahmegebühr 50 Euro inklusive
Kaffeepausen und Mittagsimbiss.

Ansprechpartner: Frau Claudia Wölfle, Druckkammerzentrum Traunin,
hbo-traunstein@t-online.de

Anerkannt mit 8 ÄK-Punkten für ärztliche Weiterbildung
Anerkannt mit 8 UE als Refresher für GTÜM-Diplome I und IIa

Vorankündigungen



Symposium "Update Apnoetauchen: Medizin trifft Passion"

Termin: Samstag, 15.10.2016
Tagungsort: Bonn
Zielgruppe: Apnoisten, Tauchmediziner und Interessierte
Ansprechpartner: folgen in Kürze auf www.gtuem.org

Anerkannt mit 8 UE als Refresher für GTÜM-Diplome I und IIa

Kursangebote

Wenn auch Sie Ihre Institution und Seminare oder Kurse im caisson aufgeführt wissen wollen, senden Sie bitte Ihre Daten gemäß 'Hinweise für Autoren' an die Redaktion – bitte auf Datenträger oder via E-Mail: caisson@gmx.net. Wir können leider anderweitig eingereichte Daten nicht berücksichtigen und bitten in eigenem Interesse um Verständnis. Daten, die die Homepage der GTÜM (www.gtuem.org) betreffen, senden Sie bitte an: gtuem@gtuem.org.

Das aktuelle Angebot der uns gemeldeten Kurse gemäß GTÜM-Richtlinien finden Sie im Internet auf unserer Homepage www.gtuem.org unter 'Termine/Kurse'. Grundsätzlich können nur Kurse im caisson oder auf www.gtuem.org veröffentlicht werden, die von der GTÜM anerkannt wurden. Näheres finden Sie in der Weiterbildungsordnung der GTÜM. Die Red.

Universitätsklinikum Halle

Kontakt: Klinik für FA Anästhesie und operative Intensivmedizin
Hyperbare Oxygenation
Ernst-Grube-Str. 40, FG 15 U02
06110 Halle (Saale)
Ansprechpartner: Dr. C. Pohl
Tel.: 0345/5574350
Fax: 0345/5574352
hbo@uk-halle.de

Thema: GTÜM-Kurs I+IIa -
Tauchtauglichkeit+Taucherarzt
Termin: 21.05. - 29.05.2016
Ort: Halle (Saale)

DLRG Tauchturm Berlin

Kontakt: Dr. Wilhelm Welslau
Seeböckgasse 17/2
A-1160 Wien
Tel.: +43 (699) 18 44-23 90
taucherarzt.at@gmx.at
www.taucherarzt.at

Thema: GTÜM-Kurs I - Tauchtauglichkeit
Termin: 04.05. - 08.05.2016
Ort: Berlin

HBO Zentrum Euregio Aachen

Kontakt: Kackertstraße 11
52072 Aachen
Tel.: +49 (0)241 840 44
Fax +49 (0) 241 879 34 94
Mobil +49 (0) 157 501 805 84
j.glaetzer@hbo-aachen.de
www.hbo-aachen.de

Thema: GTÜM-Kurs I - Tauchtauglichkeit
Termin: 10.06. - 12.06.2016
Ort: Aachen

Druckkammerzentren Rhein-Main-Taunus

Kontakt: im AGZ Wiesbaden (1. OG)
Schiersteiner Straße 42
D-65187 Wiesbaden
Tel.: 06 11 / 84 72 71 70
info@hbo-rmt.de
www.hbo-rmt.de

Thema: GTÜM-Kurs IIa - Taucherarzt
Termin: 15.04. - 17.04.2016 (Teil 1)
22.04. - 24.04.2016 (Teil 2)
Ort: Wiesbaden

Thema: GTÜM-Kurs I - Tauchtauglichkeit
Termin: 05.11. - 07.11.2016
Ort: Wiesbaden

Thema: GTÜM-Kurs IIa - Taucherarzt
Termin: 08.11. - 13.11.2016
Ort: Wiesbaden

Universität Ulm

Kontakt: Akademie für Wissenschaft
Wirtschaft und Technik an der
Universität Ulm e. V.
Frau Viola Lehmann
Tel. +49 (0)731/50 25266
Fax: +49 (0)731/50 25265
www.uni-ulm.de/akademie

Thema: GTÜM-Kurs I - Tauchtauglichkeit
Termin: 25.11. - 27.11.2016
Ort: Ulm

Kursangebote

Druckkammerzentrum Murnau

Kontakt: BG-Unfallklinik Murnau
Sekretariat Druckkammerzentrum-HBO
Postfach 1431
D-82418 Murnau
Tel.: 0 88 41/48 27 09
hbo@bgu-murnau.de
www.bgu-murnau.de/behandlungsspektrum/anaesthesie-intensivmedizin-schmerzmedizin/druckkammer

Thema: GTÜM-Kurs IIb – Druckkammerarzt
Termin: 14.10. – 23.10.2016
Ort: Murnau

Caritas-Krh. St. Josef Regensburg

Kontakt: Caritas-Krankenhaus St. Josef
Klinik für Anästhesiologie, Intensiv- und
Notfallmedizin

Landshuter Str. 65
93053 Regensburg
Tel: 0941-782-3610
Fax: 0941-782-3615
anaesthesiologie@caritasstjosef.de
<http://hyperbarmedizin-regensburg.com>

Thema: GTÜM-Kurs I – Tauchtauglichkeit
Termin: 30.09. – 02.10.2016
Ort: Regensburg

Thema: GTÜM-Kurs IIa – Taucherarzt
Termin: 03.10. – 08.10.2016
Ort: Regensburg

taucherarzt.at – Wien

Kontakt: Dr. Wilhelm Welslau
Seeböckgasse 17/2
A-1160 Wien
Tel.: +43 (699) 18 44-23 90
taucherarzt.at@gmx.at
www.taucherarzt.at

Thema: Tauchmedizin-Workshop
(inkl. 16 UE für GTÜM-Diplome I und IIa)
Termin: 08.04. – 18.04. 2016
Ort: Malediven, M/S Nautilus Two

Thema: GTÜM-Kurs I – Tauchtauglichkeit
Termin: 25.05 – 29.05.2016
Ort: Wien

Thema: GTÜM-Kurs IIa – Taucherarzt
Termin: 01.09. – 04.09.2016 (Teil 1) und
08.12. – 11.12.2016 (Teil 2)
Ort: Weyregg am Attersee (Teil 1) + Wien (Teil 2)

Thema: Tauchmedizin-Workshop
(inkl. 16 UE für GTÜM-Diplome I und IIa)
Termin: 28.02. – 09.03.2017
Ort: Malediven, M/S Nautilus Two

Zertifizierte Veranstaltungen

Tauchertage 2016, Erding

Termin: 08. – 09. April 2016
Tagungsort: Erding
Veranstalter: Hubertus Bartmann
Nähere Auskünfte: tauch@t-online.de, www.tauch-unfall.de
anerkannt mit 11 UE für GTÜM-Diplome I und IIa

12. Intensivseminar Tauchunfall

Termin: 6. – 7. Mai 2016
Tagungsort: Regensburg
Veranstalter: Hubertus Bartmann
Nähere Auskünfte: tauch@t-online.de, www.tauch-unfall.de
anerkannt mit 16 UE für GTÜM-Diplome I und IIa

Tauchnotfalltage 2016 - Management des Tauchunfalls

Termin: 28. Juli - 01. August 2016
Tagungsort: Malta
Veranstalter: Euregio-Med und Verein zur Förderung des Rettungs- & Notarztdienstes Remscheid e.V.
Nähere Auskünfte: schlueper@euregio-med.de & tauchnotfalltage@vfrn.de
anerkannt mit 16 UE für GTÜM-Diplome I und IIa

Wasserrettung + Notfallmedizin

Termin: 27. August 2016
Tagungsort: Wesel
Veranstalter: Berufsfachschulen für den Rettungsdienst und Schule für Breitenausbildung im DRK, DRK-Landesverband Nordrhein e.V.
Nähere Auskünfte: lano@drk-nordrhein.net, www.drk-nordrhein.net, www.drk-lano.de
anerkannt mit 8 UE für GTÜM-Diplome I und IIa

12. Symposium für Tauchmedizin in Hannover

Termin: 29. Oktober 2016
Tagungsort: MHH, Carl-Neuberg-Str. 1, Hannover
Veranstalter: Förderverein AINSplus Hannover e.V., Dr. Björn Jüttner
Nähere Auskünfte: www.tauchmedizin-hannover.de
anerkannt für GTÜM-Diplome I und IIa (Punktzahl noch offen)

Kontaktadressen GTÜM

Stand 05.03.2016

Engerer Vorstand

Präsidentin

Dr. med. Karin Hasmler
Anästhesistin
BG – Unfallklinik Murnau
Prof. Küntscherstraße 8
D-82418 Murnau
Tel.: +49 (0)88 41-48 2709
k.hasmler@gtuem.org

Vize-Präsident

FLA Prof. Dr. Andreas Koch
Sektion Maritime Medizin am Inst.
für Experim. Medizin des UKSH
Christian-Albrechts-Univ. zu Kiel
c/o Schifffahrtmed. Inst. d. Marine
Kopperpähler Allee 120
D-24119 Kronshagen
Tel.: +49 (0)431-5409/1503
a.koch@gtuem.org

Sekretär

Prof. Dr. med. Kay Tetzlaff
Internist/Pneumologie
Medizinische Klinik,
Abteilung Sportmedizin
Universitätsklinikum Tübingen
Hoppe-Seyler-Straße 6
D-72076 Tübingen
Tel.: +49 (0)151-15 02 17 84
k.tetzlaff@gtuem.org

Schatzmeister

Dr. med. Lars Eichhorn
Klinik f. FA Anästhesie und
Operative Intensivmedizin
Universitätsklinikum Bonn
Sigmund-Freud-Straße 25
D-53127 Bonn
Tel.: +49 (0)171-233 6037
l.eichhorn@gtuem.org

Erweiterter Vorstand

Redakteur CAISSON

Dr. med. Wilhelm Welslau
Arbeitsmediziner
Seeböckgasse 17
A-1160 Wien
Tel.: +43 (699)18 44-23 90
Fax: +43 (1)944-23 90
caisson@gmx.net

Beisitzer

Dr. med. Christian Beyer
Facharzt f. Kinder-Jugendmedizin
Wandsbecker Marktstraße 69-71
D-22041 Hamburg
Tel.: +49 (0)40-682400
Fax: +49 (0)40-685520
c.beyer@gtuem.org

Dr. med. Andreas Fichtner, MME
Klinik f. Anästhesiologie u. Intensivtherapie
Klinikum Chemnitz gGmbH
Flemmingstraße 2
D-09116 Chemnitz
Tel.: +49 (0)3 71-33333 72
a.fichtner@gtuem.org

PD Dr. med. Björn Jüttner
Anästhesist
Medizinische Hochschule Hannover
Carl-Neuberg-Straße 1
D-30625 Hannover
Tel.: +49 (0)176-15 32 36 89
b.juettner@gtuem.org

Dr. med. Dirk Michaelis
Anästhesist/Betriebswirt
Druckkammerz. Rhein-Main-Taunus
Schiersteiner Straße 42
D-65187 Wiesbaden
Tel.: +49 (0)6 11-84 72 7170
d.michaelis@gtuem.org

Oliver Müller
Anästhesist
Vivantes Klinikum im Friedrichshain
Landsberger Allee 49
D-10249 Berlin
Tel.: +49 (0)30-130231570
o.mueller@gtuem.org

Prof. Dr. med. Claus-Martin Muth
Leiter der Sektion Notfallmedizin
Universitätsklinikum Ulm
Prittwitzstraße 43
D-89075 Ulm
Tel.: +49 (0)731-5006 0140
Fax: +49 (0)731-50 06 0142
c.muth@gtuem.org

Vorsitzender des VDD e.V.

Dr. med. Christian Oest
Leitender Arzt Druckkammerzentrum
Heidelberg
Vangerowstr. 18/1
69115 Heidelberg
Tel.: +49 (0)6221-602653
Fax: +49 (0)6221-602655
geschaefsstelle@vdd-hbo.de

Ansprechpartner

Geschäftsstelle GTÜM

Dunja Hausmann
BG-Unfallklinik Murnau
Prof. Küntscherstraße 8
D-82418 Murnau
Tel.: +49 (0)88 41-48 2167
Fax: +49 (0)88 41-48 2166
gtuem@gtuem.org

Druckkammer-Liste

Dr. med. Ulrich van Laak
DAN Europe Deutschland
Eichkoppelweg 70
D-24119 Kronshagen
Tel.: +49 (0)4 31-54 42 87
Fax: +49 (0)4 31-54 42 88
u.vanlaak@gtuem.org

Forschung

Prof. Dr. med. Andreas Koch (s.o.)

Leitlinien-Beauftragter

PD Dr. med. Björn Jüttner (s.o.)

Literatur-Datenbank

Prof. Dr. Jochen D Schipke
Wildenbruchstraße 10
D-40545 Düsseldorf
Tel.: +49 (0)211-579994
j.schipke@gmx.org

Recht

Benno Scharpenberg
Präsident des Finanzgerichts Köln
Brandenburger Straße 11
D-41539 Dormagen
Tel.: +49 (0)171-748 35 13
b.scharpenberg@gtuem.org

Taucherarzt-Liste

gtuem@gtuem.org

Tauchmedizin

Prof. Dr. med. Kay Tetzlaff (s.o.)
Dr. med. Christian Beyer (s.o.)
(Dr. Beyer nur für Kinder und Jugendliche)

Webmaster

Müller, Oliver (s.o.)

Weiterbildung

Dr. med. Andreas Fichtner (s.o.)
(Erstdiplome)
Dr. med. Dirk Michaelis (s.o.)
(Verlängerungen)
Prof. Dr. Claus-Martin Muth (s.o.)
(Veranstaltungen/Kurse)

HAUX-QUADRO Systems: Innovations for HBO Technology



HAUX-LIFE-SUPPORT GmbH
Auf der Hub 11-15
DE-76307 Karlsbad, Germany

Tel.: +49-(0)7248 9160-0
info@hauxlifesupport.de
www.hauxlifesupport.de



Ausbildung & Refresher-Kurse

Tauchmedizin-Ausbildung seit 2004 mit internationaler Anerkennung



Praxis Attersee (Kurs IIa)



Druckkammer (Refresher, Malediven)



Refresher, Nautilus Two, Notfallübung

unsere nächsten Termine

Kurs I Tauchtauglichkeits-Untersuchungen: Wien 25.-29.5.16
Kurs IIa Tauchmedizin - Teil 1: Weyregg am Attersee 1.-4.9.2016
Kurs IIa Tauchmedizin - Teil 2: Wien 8.-11.12.2016
Refresher (16 UE): Malediven, M/S Nautilus Two 28.2.-9.3.17

Einzelheiten & aktuelle Kurse: www.taucherarzt.at. Fragen bitte an: taucherarzt.at@gmx.at
Kursankündigungen auch auf: www.gtuem.org (GTÜM) und www.oegth.at (ÖGTH)

47 Kurse in den letzten 12 Jahren. Deutschland, Österreich, Thailand, Malediven > 800 Absolventen aus: Deutschland, Österreich, Schweiz, Italien, Luxemburg, Niederlande, GB, Malediven, Thailand...

Leitung: **Wilhelm Welslau**, Taucherarzt seit 1988, Tauchmedizin-Kurse seit 1992, Diving & Hyperbaric Medicine Consultant seit 2002, Member of EDTC/ECHM Joint Educational Committee seit 2009.

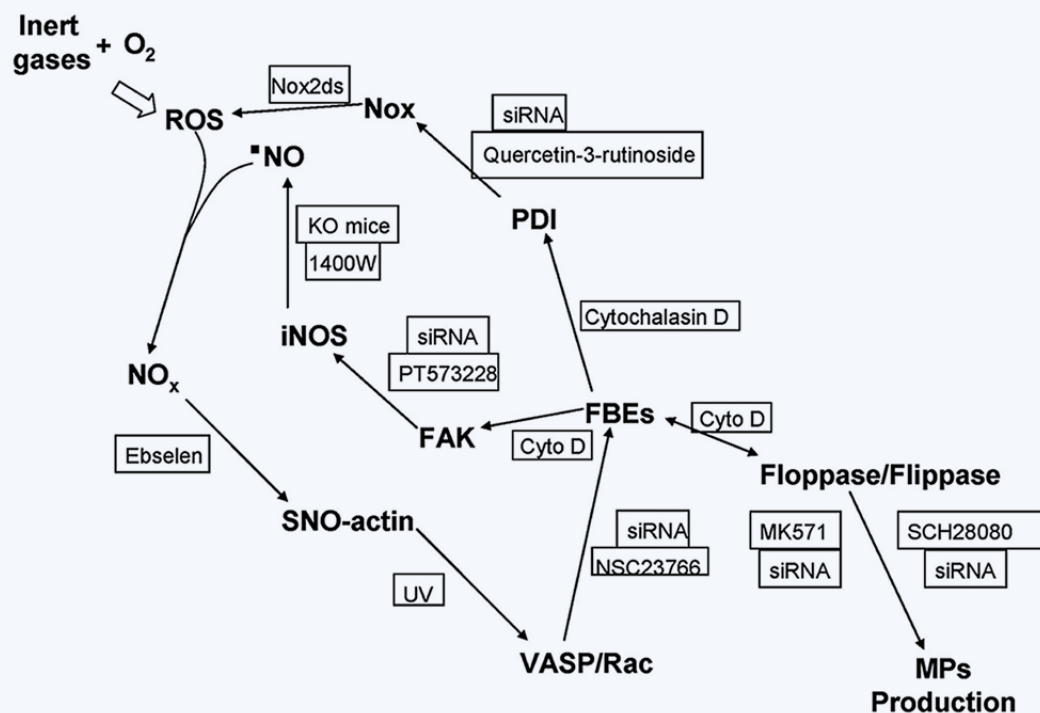
Referenten (v.l.n.r.): **Wilhelm Welslau**, **R. Prohaska** (ÖGTH-Präsidentin), **U. van Laak** (Direktor DAN Europe D, A und H), **J. Zimmermann** (ehem. Techn. Direktor von HAUX), **K.P. Faesecke** (Caisson-Experte - tunneldoc.de), **F. Hartig**, (TecDive-Experte, diving-concepts.at), **P. Kemetzhofner** (notfallmedizin.or.at), **A. Männer** (ehem. Berufstauchfirma Nautilus, www.nautilus-two.at)



Als Experten verfügen alle Referenten über **große praktische Erfahrung** in ihren Fachbereichen: Tauchtauglichkeit, Tauchen mit Handicap, Tauchunfall-Behandlung, Tec. Tauchen, Apnoe, Forschungstauchen, Berufstauchen, Druckluftarbeit, HBO-Therapie, Druckkammer-Technik und Notfallmedizin.
Zu Spezialthemen laden wir jeweils weitere Experten ein.



Blick in die Mehrplatz-Druckkammer der Karolinska-Universitätsklinik, Stockholm, während einer HBO-Therapie unter Intensivmedizin-Bedingungen mit Beatmungsgerät, Infusion und mehreren Perfusoren. Insbesondere im Hinblick auf Anforderungen der Intensivmedizin zeigen sich die Beschränkungen einer HBO-Therapie in Monoplace-Druckkammern (siehe S. 48-55). Foto: Folke Lind, mit freundlicher Genehmigung.



Schema des angenommenen Mechanismus der durch Gasblasen induzierten Mikropartikel-Bildung durch Neutrophile Granulozyten im Blut. Die bisherigen Erkenntnisse zur Rolle der „Microparticles“ werden im Artikel von Stephen Thom et al. ausführlich dargestellt (siehe S. 18-43). Abbildung aus J. Biol. Chem. 2014, mit freundlicher Genehmigung.