

Aus der Klinik für Unfall- und Handchirurgie der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf
Direktor: Univ.- Prof. Dr. med. J. Windolf

Untersuchungen zum Einfluss des Leukozyten-Inhibitions-Moduls auf die
posthämorrhagische Inflammation und Gewebehypoxie im Tiermodell

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Alberto Felipe Schek

Düsseldorf
2010

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf
Dekan

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf
Koreferent: Prof. Dr. med. Detlef Kindgen-Milles

Für meinen Onkel Pablo Ferrer
† 03.05.2008
Nunca olvidaré tu hermosa manera de ser.

Inhalt

Inhaltsverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	VI
1. Einleitung	1
1.1 Der hämorrhagische Schock	2
1.1.1 Definition	2
1.1.2 Pathogenese	2
1.1.3 Pathophysiologie	2
1.1.4 Ischämie/Reperfusionssyndrom	4
1.1.5 Rolle der neutrophilen Granulozyten	6
1.1.6 SIRS, MODS, MOV	8
1.1.7 Bedeutung der Hypoxie im Schock	9
1.1.7.1 Lipidperoxidation	9
1.1.7.2 Häm und HO-1	11
1.1.7.3 Der Hypoxie-induzierbare Faktor 1 α (HIF-1 α)	14
1.2 Das Leukozyten-Inhibitions-Modul (LIM)	17
1.2.1 Definition	17
1.2.2 Makroskopischer Aufbau	18
1.2.3 Mikroskopischer Aufbau	18
1.2.4 Funktionsprinzipien	19
2. Ziele der Arbeit	20
2.1 Aufbau und Etablierung eines hämorrhagischen Schockmodells im Schwein als Voraussetzung für die Überprüfung der posthämorrhagischen Immunantwort	20
2.2 Überprüfung der posthämorrhagischen Immunantwort anhand inflammatorisch/hypoxischer Parameter	20
2.3 Testung der LIM-Effektivität und Unbedenklichkeit	20
3. Material und Methoden	21
3.1 Material	22
3.1.1 Versuchstiere	22
3.1.2 Zugänge/Katheter	22
3.1.3 Medikamente/Infusionen	22
3.1.4 Geräte/Software	22
3.1.5 Chemikalien	23
3.1.6 Primer/Antikörper	25
3.2 Methoden	26
3.2.1 Experimentelles Modell	26
3.2.1.1 Die Versuchstiere	26
3.2.1.2 Vorbehandlung und Anästhesie	26
3.2.1.3 Katheteranlage	26
3.2.1.3.1 Blasen katheter	27
3.2.1.3.2 Arterieller Katheter	27
3.2.1.3.3 Sheldon-Katheter	27
3.2.1.3.4 Swan-Ganz Katheter	27

Inhalt

3.2.1.4	Versuchsablauf	28
3.2.1.5	Organentnahme und Histologie	29
3.2.1.6	Prädefinierte Blutabnahmen	29
3.3	Untersuchungsmethoden	30
3.3.1	Hämodynamik	30
3.3.1.1	Mittlerer arterieller Druck (MAP)	31
3.3.1.2	Herzfrequenz (HF)	32
3.3.1.3	Herzzeitvolumen (HZV)	33
3.3.1.4	Gemischtvenöse Sauerstoffsättigung (SvO ₂)	34
3.3.2	Laboranalysen	34
3.3.2.1	Leukozytenzahl	35
3.3.3	Proteinisolierung und –Bestimmung	36
3.3.4	RNA-Isolierung	36
3.3.5	Polymerase-Kettenreaktion	38
3.3.6	Western Blot	38
3.3.7	TBARS-Assay	39
3.3.8	Histologie	40
3.3.9	Statistik	41
4.	Ergebnisse	42
4.1	Hypoxieanalysen im Gewebe	42
4.1.1	Hypoxie-Induzierter Faktor 1 α (HIF-1 α)	42
4.1.1.1	Gen- und Proteinexpression nach 48 Stunden	42
4.1.1.2	Gen- und Proteinexpression nach 72 Stunden	44
4.1.2	Hämoxygenase-1 (HO-1)	45
4.1.2.1	Gen- und Proteinexpression nach 48 Stunden	45
4.1.2.2	Gen- und Proteinexpression nach 72 Stunden	47
4.1.3	Lipidperoxidation (Malondialdehyd-Assay)	49
5.	Diskussion	52
5.1	Das Fas/FasL-System als Zielobjekt bei hämorrhagischem Schock/Reperfusion	53
5.2	Einstellung und Etablierung eines hämorrhagischen Schockmodells im Schwein	54
5.3	Überprüfung der posthämorrhagischen Immunantwort anhand inflammatorisch/hypoxischer Parameter	55
5.4	Testung der LIM-Effektivität und Unbedenklichkeit	57
6.	Zusammenfassung	61
7.	Referenzen	62
8.	Danksagung	73

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

*LIM	LIM-Gruppe
μM	Mikromolar
ACCP	American College of Chest Physicians
ADH	Antidiuretisches Hormon
AhR	Aryl hydrocarbon receptor
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
bHLH	Basisches Helix-Loop-Helix-Protein
bpm	Beats per minute/Schläge pro Minute
BV	Biliverdin
C3a	Complement 3a
C5a	Complement 5a
C5b-9	Complement 5b-9
Ca^{2+}	Calcium Ion
CD95	Cluster of differentiation 95
CD95L	Cluster of differentiation 95-Ligand
cDNA	Complementäre-Desoxyribonukleinsäure
cGMP	Cyklisches Guanosinmonophosphat
CHE	Chloresterase
CK	Creatinkinase
CK-MB	Creatinkinase-MuscleBrain/Myokardspezifische Creatinkinase
CLOCK	Circadian locomoter output cycles kaput protein
CO	Kohlenmonoxid
CO_2	Kohlendioxid
COOH	Carboxylgruppe
CYCLE	Cyklisches Protein
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DREs	Dioxin response elements
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EIT	Extrakorporales Immuntherapeutikum
EPAS-1	Endotheliales PAS-Protein 1
EPO	Erythropoetin
FasL	Fas Ligand
Fe^{2+}	Eisen Ion
FePP-IX	Eisen-Protoporphyrin-IX, Ferroprotoporphyrin-IX
GAPDH	Glicerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
G-CSF	Granulozyten-Kolonienstimulierender Faktor
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten- Kolonienstimulierender Faktor
GOT	Glutamat-Oxalacetat Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat Transaminase
H_2O	Wasser
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
HE	Hämatoxylin-Eosin
HF	Herzfrequenz
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
HLF/HRF	HIF-like factor/HIF-related factor
HO	Hämoxygenase
HPF	High power fields
HPLC	High Pressure/Performance Liquid Chromatography
HRE	Hypoxie-responsive Elemente
HZV	Herzzeitvolumen
IAPs	Inhibitor of Apoptosis Proteins
ID	Inhibitorische Domäne
Ig	Immunglobuline
IL	Interleukin
kDa	KiloDalton
KG	Kontrollgruppe
kg	Kilogramm
Krea	Kreatinin

Abkürzungsverzeichnis

Lac	Lactat
LIM	Leukozyten Inhibitions Modul
MAP	Mean arterial pressure
MCL	Myeloid Cell Leukaemia
MDA	Malondialdehyd
Mg	Magnesium
MODS	Multiorgan dysfunktionssyndrom
MOV	Multiorganversagen
MPAP	Mittlerer pulmonal-arterieller Druck
NaCl	Natriumchlorid
NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat in reduzierter Form
NH	Nitrogenhydrid
ⁿ LIM	nonLIM-Gruppe
NLS	Nukleäre Lokalisationssequenz
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
NP40	Nonyl phenoxy polyethoxy ethanol
O ₂	Sauerstoff
OD	Optische Dichte
ODD	Oxygen dependent degradation domain
OH [•]	Hydroxylradikal
P _a CO ₂	Arterieller Kohlendioxid-Druck
PaO ₂	Arterieller Sauerstoff-Druck
PAS	PER -period clock protein, ARNT -aromatic hydrocarbon receptor nuclear translocator, SIM -single minded Protein
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PCWP	Pulmonocapillary Wedge Pressure/Pulmonokapillärer Verschlussdruck
PHDs	Prolyl-4-Hydroxylasen
PMN	Polymorphonukleäre Zellen
Pro	Prolin
pVHL	von Hippel-Lindau-Protein
RNA	Ribonukleinsäure
RR	Riva Rocci: Blutdruck
SCCM	Society of Critical Care Medicine
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SIRS	Systemic inflammatory response syndrome
SMC	Standard medical care
SOC	Standard of care
SvO ₂	Venöse Sauerstoffsättigung
TAD	Transaktivierungsdomänen
Taq	Thermus aquaticus
TBA	Thiobarbituric acid/Thiobarbitursäure
TBARS	Thiobarbituric acid reaktive Substanzen
TBS	Tromethamin buffered saline
TNF- α	Tumor-Nekrosefaktor alpha
Tropt	Troponin-T
UPM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett-Strahlung
VEGF	Vascular endothelial growth factor/Vaskulär-endothelialer Wachstumsfaktor
XOx	Xanthinoxidase
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZVD	Zentralvenöser Druck

1. Einleitung

Der hämorrhagische Schock ist trotz der ständigen medizinischen Fortschritte eine der führenden Komplikationen und Todesursachen nach Unfällen (Moore, McKinley et al. 2004). Hauptkomplikation nach hämorrhagischem Schock ist das Auftreten einer Ganzkörperentzündungsreaktion (Systemic Inflammatory Response Syndrome; SIRS), eines Multiorgan dysfunktionssyndrom (MODS) (Bone, Sibbald et al. 1992) sowie eines Multiorganversagens (MOV) (Eiseman, Beart et al. 1977; Baue, Durham et al. 1998). Die Pathophysiologie des hämorrhagischen Schocks ist derzeit immer noch nicht ausreichend erklärt. Die aktivierten neutrophilen Granulozyten, so genannte „Polymorphkernige Neutrophile (PMN)“, spielen eine wesentliche Rolle bei der Entstehung eines SIRS mit nachfolgendem MODS. Dies geschieht anfänglich durch die Freisetzung zahlreicher Mediatoren, wie z.B. Tumor-Nekrosefaktor- α (TNF- α), Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-8 (IL-8) (Rüter A. 2004). Diese inflammatorischen Reaktionen spielen sich hauptsächlich in Lunge, Leber und Herz ab (Lomas, Chung et al. 2003) (McCloskey, Kameneva et al. 2004) (Sato, Tanaka et al. 2007) (Toda, Takahashi et al. 2007) (Zakaria el, Campbell et al. 2007). Im Rahmen der vorliegenden Forschungsarbeit wird der Einfluss von neutrophilen Granulozyten auf Organebene im hämorrhagischen Schock untersucht und deren Inaktivierung anhand von membrangebundenen anti-Fas-Antikörper (anti-CD95) in einem extrakorporalen Kreislauf. Das Ziel ist somit eine Eindämmung der Schockfolgen zu erreichen. Vorherige Studien haben die Vorteile gezeigt, die die schnelle Inaktivierung von neutrophilen Granulozyten mit sich bringt (Abdel-Rahman, Margraf et al. 2007) (Scholz and Cinatl 2005) (Scholz, Cinatl et al. 2005) (Scholz, Simon et al. 2004). Kürzlich wurde eine extrakorporale Immuntherapie mittels anti-CD95 Antikörper getestet, die an Patienten während einer Herz-Bypass-Operation in den vorhandenen extrakorporalen Kreislauf geschaltet war (Leukozyten Inhibitions-Modul, LIM) beschrieben. Diese Methode erwies sich als hilfreich, da sie eine Neutrophilen-Hyperaktivierung dämpfte, eine überschüssige Immunantwort vorbeugte und die hämodynamischen Parameter der Patienten verbesserte (Scholz and Cinatl 2005) (Scholz, Cinatl et al. 2005) (Abdel-Rahman, Margraf et al. 2007). Aus diesen Erkenntnissen kann man postulieren, dass der Einsatz von LIM bei kritisch kranken Patienten vorteilhafte Effekte erzielen kann.

1.1 Der hämorrhagische Schock

1.1.1 Definition

Unter einem hämorrhagischen Schock versteht man einen Zustand unzureichender Durchblutung vitaler Organe mit konsekutivem Missverhältnis von Sauerstoff-Angebot und -Verbrauch infolge einer akuten Blutung mit oder ohne wesentlicher Gewebeschädigung, mit Volumenmangel und kritisch verminderter kardialer Vorlast (Rüter A. 2004).

1.1.2 Pathogenese

Ursachen des hämorrhagischen Schocks sind akute äußere oder innere Blutungen. Zu den äußeren Blutungen zählen z.B. Stich- bzw. Schussverletzungen; die inneren Blutungen werden häufig durch gastrointestinale Pathologien wie Ulcera ventriculi oder duodeni, Ösophagusvarizen, nichttraumatische Gefäßrupturen wie das Aortenaneurysma sowie gynäkologische Blutungsquellen wie die Extrauterin gravidität oder postpartale Blutungen verursacht. Darüber hinaus kommen nasopharyngeale Blutungen, Gefäßarrosionen bei Tumoren oder chronischen Entzündungen u.a. in Betracht.

Im engeren Sinne definiert man einen traumatisch-hämorrhagischen Schock als Folge von äußeren physikalischen oder chemischen Einwirkungen. Hierfür ist als Beispiel das Polytrauma zu erwähnen.

1.1.3 Pathophysiologie

Der menschliche Körper ist in der Lage, auf verschiedene Art und Weise einem akuten Blutverlust entgegen zu wirken. Der frühe kompensatorische Mechanismus nach Blutverlust besteht in einer progressiven Vasokonstriktion, vermittelt über sympatho-adrenerge Regulationsmechanismen, zur Erhöhung der Nachlast und Aufrechterhaltung einer ausreichenden Versorgung von lebenswichtigen Organen wie ZNS, Herz und Nieren. Diese Zentralisation des Kreislaufs führt v.a. zu einer Verminderung der Perfusion von Haut, Skelettmuskulatur und des splanchnischen Gefäßgebiets. Größere Blutverluste (>30%) führen primär zu einer Abnahme des Herzzeitvolumens (HZV), jedoch erst nach dessen erheblicher Reduktion (40-50%) zu einem messbaren Abfall des arteriellen Mitteldruckes (s. Tab. 1).

1 Einleitung

	Hämorrhagie			
	Grad I	Grad II	Grad III	Grad IV
Blutverlust (ml)	<750	750-1500	1500-2000	>2000
Blutverlust (in % des Gesamtvolumens)	<15	15-30	30-40	>40
Herzfrequenz (min)	<100	>100	>120	>140
Blutdruck	normal	normal	erniedrigt	erniedrigt
Atemfrequenz (min)	15-20	20-30	30-40	>40
Diurese (ml/h)	>30	20-30	<20	Anurie
ZNS, mentaler Status	unauffällig	aufgeregt	verwirrt	lethargisch

Tab.1 Organdysfunktionen in Abhängigkeit vom Schweregrad des Blutverlusts berechnet für einen 70kg schweren Erwachsenen (Rüter A. 2004).

Durch das Absinken des Herzzeitvolumens werden Barorezeptoren in Aortenbogen und Carotis-Sinus angeregt, die ihrerseits das Kreislaufzentrum in der Medulla oblongata stimulieren. Dadurch wird reflektorisch eine sympatho-adrenerge Reaktion ausgelöst, die zu einem erhöhten Sympathikotonus, einer vermehrten Freisetzung von Katecholaminen (Adrenalin, Noradrenalin) und Stresshormonen (Kortisol, Vasopressin/ADH u.a.) führt. Diese Effekte führen zu einem Anstieg der Herzfrequenz und der myokardialen Kontraktilität sowie des systemischen Gefäßwiderstandes durch periphere Vasokonstriktion.

Aufgrund dieser kompensatorischen Mechanismen treten die klinischen Zeichen eines hämorrhagischen Schocks (arterielle Hypotonie, Verwirrtheit, Oligurie) erst in der Spätphase bei einem Blutverlust >30% auf. Dies kann vor allem bei Jugendlichen und Kindern dazu führen, den Ernst der Lage zu unterschätzen.

Das Versagen der kompensatorischen Mechanismen mit Minderperfusion von Organen bringt eine Störung der Mikrozirkulation mit sich, die auch als „schockspezifische Mikrozirkulationsstörung“ bezeichnet wird (Morini, Yacoub et al. 2000). Diese ist charakterisiert durch eine bestehende lokale Stase mit Akkumulation von Leukozyten und Thrombozyten (sog. sludge) und andererseits durch eine zellarme Plasmaströmung in der Mikrozirkulation. Ein abfallender Perfusionsdruck kombiniert mit den veränderten Fließeigenschaften des Blutstroms führt zu einer verminderten Elimination von sauren Stoffwechselprodukten und Akkumulation dieser im hypoxischen Gewebe. Dies wird auch als „hidden acidosis“ bezeichnet (Bergentz, Carlsten et al. 1969). Durch die Hypoxie im ischämischen Gebiet wird insbesondere das Gerinnungs-, Fibrinolyse-, Komplement- und Kallikrein-Kinin-System aktiviert und führt zur Freisetzung multipler Mediatoren (Mutschler 2004). Beim hämorrhagischen Schock spielen die Arachidonsäure-Metabolite (Leukotriene,

1 Einleitung

Thromboxan) und bestimmte Zytokine wie $\text{TNF}\alpha$, IL-1, IL-6 und IL-8 eine besondere Rolle (Tamion, Richard et al. 2001). Direkte Folgen dieser Mediatorenfreisetzung sind Schäden des Kapillarendothels sowie inflammatorische Reaktionen mit konsekutiver Organdysfunktion, die unter dem Begriff SIRS zusammengefasst werden.

1.1.4 Ischämie/Reperfusionssyndrom

Folgende Mechanismen scheinen bei der Entstehung von Ischämie/Reperfusionsschäden von Bedeutung zu sein: die Bildung freier Sauerstoffradikale, Leukozytenaktivierung, Mikrozirkulationsstörung und Ca^{2+} - Einstrom in die Zelle.

Bei Energiemangel wie zum Beispiel in der Ischämiephase kommt es zu einer gesteigerten anaeroben Glykolyse und vermehrtem Abbau energiereicher Phosphate wie ATP. Da diese wegen des Energiemangels nicht rephosphoryliert werden können, akkumuliert AMP, welches durch die Xanthin-Oxidase (XOx) weiter zu Hypoxanthin und Xanthin abgebaut wird (Mutschler 2004). Bei diesen Reaktionen wird aus dem beteiligten molekularen Sauerstoff jeweils ein Superoxid-Radikal ($\bullet\text{O}_2^-$) freigesetzt. Körpereigene Kompensationsmechanismen bauen dieses unter normalen Bedingungen zum weniger reaktionsfreudigen Wasserstoff-Peroxid (H_2O_2) ab (de Groot 1994). Beim Wiedereinsetzen der Durchblutung in der Frühphase der Reperfusion treffen große Mengen Substrat (Zakaria el, Campbell et al. 2007) und aktivierte Enzyme (Xanthin-Oxidase) mit dem neu antransportierten Sauerstoff zusammen, so dass es zu einer überschießenden Bildung von Radikalen kommt, die der Körper nicht selbständig kompensieren kann (Frei, Stocker et al. 1988).

Sauerstoffradikale schädigen das Gewebe einerseits direkt durch Angriff auf Membranlipide und Zellorganellen sowie auf Nukleinsäuren, was zu einer Membrandesintegration, einem zellulären Ödem und zur Lyse der Zelle führt (Galli, Piroddi et al. 2005). Dieser Vorgang wird als Lipidperoxidation bezeichnet (Rose S 1994). Dies bewirkt eine Schädigung von Zellmembranen, was als Hauptursache für die Entwicklung generalisierter endothelialer Permeabilitätsstörungen (capillary leak) angesehen wird (Suematsu, Goda et al. 1995). Andererseits werden durch die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine aus geschädigten Zellen Leukozyten aus der Blutbahn rekrutiert (Kaminski, Bonda et al. 2002).

1 Einleitung

Calcium spielt insofern eine Rolle, da es bei Energiemangel in der Zelle kumuliert und zusätzlich durch geschädigte Membranen eindringen kann. Calcium ist ein osmotisch wirksames Elektrolyt und ist in der Lage, intrazelluläre Enzyme zu aktivieren (Rosario, Waldo et al. 2004), die ihrerseits die Membranen, das Zytoskelett und das Chromatin im Zellkern angreifen sowie die Xanthin-Oxidase aktivieren (Sakorafas, Tsiotos et al. 2000).

Die Vorgänge während der Ischämiephase bilden die Grundlage dafür, dass in der Reperfusion die eigentliche Schädigung des Gewebes stattfindet. Kommt es dann zum Wiedereinsetzen der Perfusion, z.B. nach erfolgter Schockbehandlung oder Reparatur einer Gefäßverletzung, werden die toxischen Metabolite in die Blutstrombahn ausgeschwemmt. Dies führt u.a. zur systemischen Aktivierung der Komplementkaskade mit Bildung der potenten inflammatorischen Anaphylatoxine C3a und C5a. Diese führen zu einer Rekrutierung und Aktivierung von neutrophilen Granulozyten und zur Freisetzung proteolytischer Enzyme, was schlussendlich zu einer erhöhten Membranpermeabilität, einem mikrovaskulären Schaden und sekundärem Zelltod führt (Cotran R. 1999).

Neben der erhöhten Gefäßpermeabilität kommt es zudem zur Auflösung der interstitiellen Matrix und zur Aktivierung einer Kaskade von Stoffwechselwegen, die in einer Produktion von Entzündungsmediatoren enden (Demling and LaLonde 1990). Die durch den Radikalen-Angriff veränderten Zellmembranen aktivieren Leukozyten, führen zu Mikrozirkulationsstörungen und verursachen somit multifaktoriell Zell- und Gewebeschäden (Granger 1988) (*Abb. 1*).

1 Einleitung

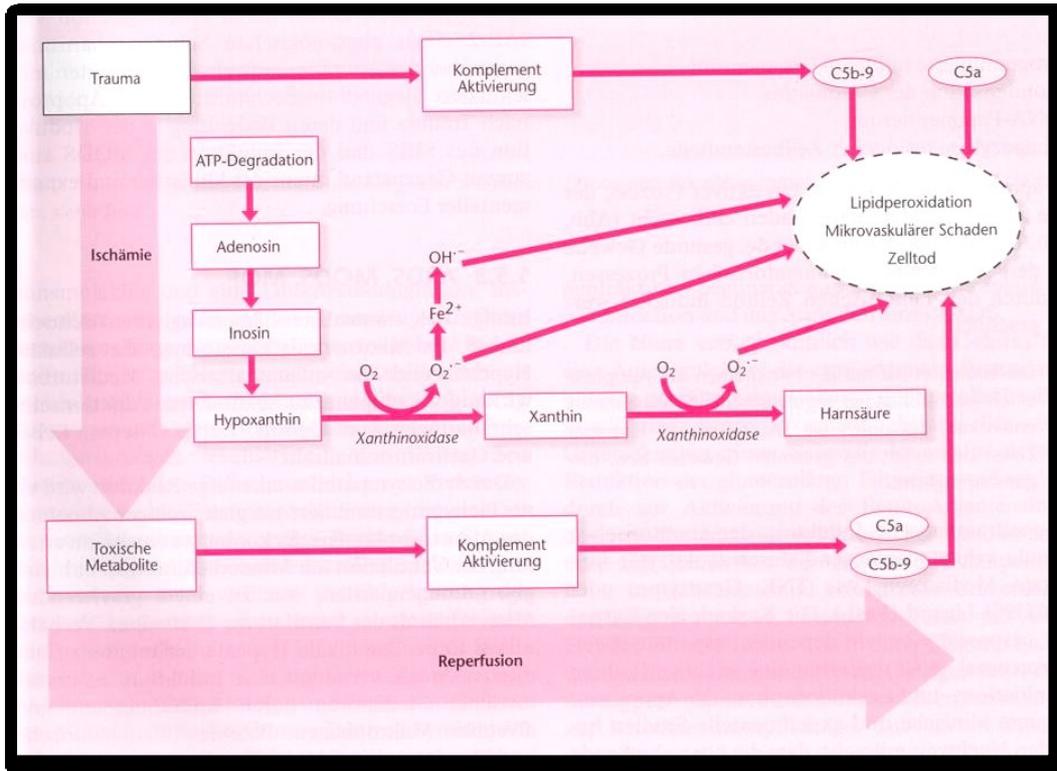


Abb. 1 Pathophysiologische Mechanismen des Ischämie-Reperfusionssyndroms (Rüter A. 2004).

1.1.5 Rolle der neutrophilen Granulozyten

Die neutrophilen Granulozyten gehören mit einem Anteil von 50–65 % zu den häufigsten Leukozyten. Als Phagozyten sind sie Teil der angeborenen Immunabwehr und dienen der Identifizierung und Zerstörung von Mikroorganismen. Neutrophile Granulozyten werden innerhalb von 14 Tagen im Knochenmark gebildet und bleiben in einem inaktiven Zustand, bevor sie in den Blutkreislauf gelangen. Einmal im Blutkreislauf zirkulierend, verbringen sie 12-14 Stunden teilweise im Hauptstrom und in einem marginalen Pool in Kontakt mit der Gefäßwand (Brown, Brain et al. 2006). Bei Abwesenheit von aktivierenden Stimuli wie Bakterien oder andere Antigene werden die neutrophilen in die Organe des retikuloendothelialen Systems, z.B Leber (Suratt, Young et al. 2001) oder sogar zurück ins Knochenmark (Martin, Burdon et al. 2003) zurücktransportiert und unterlaufen dort Apoptose (Hengartner 2000), ohne zellulären Schaden hervorzurufen.

Sobald ein lokaler Inflammationsstimulus im Organismus entsteht (Zellschaden), kommt es zu einer lokalen Freisetzung von verschiedenen chemotaktischen Faktoren, u.a. Complement 5a (C5a), Leukotrien-B₄, plättchen-aktivierender Faktor (PAF) und Interleukin-8 (IL-8).

1 Einleitung

Es wird neuerdings postuliert, dass eine körpereigene IgM-Subfamilie bei Ischämie ebenfalls als potenter Stimulus zur Freisetzung von chemotaktischen Faktoren, vor allem von Complement, führt (Hart, Ceonzo et al. 2005; Walsh, Mustafi et al. 2005; McMullen, Hart et al. 2006; Zhang, Takahashi et al. 2006).

Daraufhin wandern neutrophile Granulozyten aus Regionen niedriger Faktorenkonzentration (Hauptstrombahn, Gefäßwand) in die Region hoher Faktorenkonzentration (Entzündungsherd) und beginnen unmittelbar deren Aktivierung (Mollnes, Brekke et al. 2002).

Leukozyten verwenden Adhäsionsmoleküle (Selektine und Integrine) um sich an Endothel zu befestigen und eine Extravasation zu erleichtern. Die Selektine fördern das Verlangsamen der Neutrophilen und das Rollen entlang des Gefäßendothels. Die Integrine sorgen entsprechend für die definitive Adhäsion der neutrophilen Granulozyten (Gonzalez-Amaro and Sanchez-Madrid 1999). Integrine werden in zwei Subfamilien unterteilt ($\beta 1$ und $\beta 2$). Auf der Neutrophilenoberfläche befindet sich das L-Selektin, welches mit spezifischen Oligosacchariden der Endotheloberfläche interagiert. An Endothel gebundenes E-Selektin und P-Selektin erkennt entsprechende Kohlenhydrat-Motive auf der Neutrophilenoberfläche. Das transiente „Rollen“ der Neutrophilen Granulozyten am Gefäßendothel ermöglicht den Kontakt von Neutrophilen mit am Endothel haftenden Chemokine wie IL-8 und PAF. Diese Interaktion stimuliert die Neutrophilen und führt zur Hochregulation und Zunahme der $\beta 2$ -Integrinaktivität für das am Endothel befindliche Intrazelluläre Adhäsionsmolekül ICAM-1. Die endotheliale Expression von ICAM-1 wird durch den Einfluss u.a. von TNF- α , IL-1 und Lipopolysaccharid erhöht (Brown, Brain et al. 2006).

Die aktivierten und durch das Endothel gewanderten neutrophilen Granulozyten setzen daraufhin eine Reihe verschiedener Substanzen wie kationische Proteine, Elastase, Lysozym, lysosomale Enzyme und Myeloperoxidase. Zudem entstehen freie Sauerstoffradikale im Entzündungsort, welche zytolytisch wirken (Welbourn, Goldman et al. 1991; Carden, Xiao et al. 1998).

Die Aktivität und Lebenszeit neutrophiler Granulozyten wird von G-CSF und GM-CSF beeinflusst. Beide Faktoren sind in der Lage, die im Blut zirkulierende Neutrophilenfraktion zu erhöhen, die Reifung und Aktivierung zu fördern (Lieschke, Grail et al. 1994) sowie die Neutrophilen-Lebenszeit zu verlängern (Lee, Whyte et al. 1993). Gesunde Individuen weisen sehr niedrige G-CSF Konzentrationen auf. Im Falle einer akuten Entzündung steigt die G-CSF Konzentration um ein Vielfaches,

1 Einleitung

woraus eine deutliche Neutrophilen-Konzentrationserhöhung im Blut folgt (Tanaka, Ishikawa et al. 1996).

Wie bereits beschrieben (s.o.) wird zudem das Apoptoseverhalten der neutrophilen Granulozyten u.a. durch G-CSF beeinflusst (Lee, Whyte et al. 1993), sodass eine längere Aktivitätszeit resultiert und bei systemischer Inflammation eine überschießende Freisetzung von toxischen Metaboliten stattfindet (Quaid, Cave et al. 1999).

1.1.6 SIRS, MODS, MOV

Bei ausgeprägtem Gewebeschaden kommt es zu einer Überproduktion von Mediatoren im Organismus mit daraus folgender zusätzlicher Gewebeschädigung. Anhand von einfachen klinischen Kriterien wurde 1992 im Rahmen einer Konsensus-Konferenz des „American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine (ACCP/SCCM) das „systemic inflammatory response syndrome“ (SIRS) definiert, wobei mindestens zwei von vier der folgenden Kriterien erfüllt sein müssen (Mutschler 2004):

- Herzfrequenz >90 Schläge/min
- Atemfrequenz >20/min bzw. Abfall des P_aCO_2 unter 32 mmHg
- Körpertemperatur <36°C oder >38°C
- Leukozytenzahl >12000/mm³ oder <4000/mm³, oder mehr als 10% unreife Granulozyten im Differentialblutbild

Die klinische Manifestation dieser systemischen Entzündungsreaktion ist eine generalisierte Permeabilitätsstörung mit interstitiellem Ödem und multiplen Einschränkungen der Organfunktion, wobei in den meisten Fällen ein pulmonales Versagen beteiligt ist (Bone, Sibbald et al. 1992).

Sind gleichzeitig mehrere Organsysteme davon betroffen, spricht man von einem Multiorgandysfunktionssyndrom (MODS) (Marshall, Cook et al. 1995).

Bis zu 30% aller Traumapatienten entwickeln ein Multiorganversagen, welches trotz modernster therapeutischer Maßnahmen immer noch häufig letal endet.

Das MODS wird, abhängig vom Zeitintervall zwischen seiner Manifestation und der verursachenden Noxe unterteilt in das:

1 Einleitung

- primäre MODS, welches unmittelbar nach dem Organtrauma aufgrund der Hypoxie entsteht oder sich infolge zahlreicher Transfusionen als Gerinnungsstörung manifestiert, sowie in das
- sekundäre MODS, das sich erst 3 bis 14 Tage nach dem schädigenden Ereignis zeigt.

Charakteristisch für das MODS ist das Auftreten einer Dysfunktion von Organsystemen, die primär keinen Schaden erlitten haben sowie durch sein Auftreten Tage/Wochen nach dem initialen Trauma.

Als Multiorganversagen (MOV) wird das gleichzeitig oder rasch nacheinander auftretende Versagen von zwei oder mehr vital notwendigen Organsystemen bezeichnet (Baue 1975). Es wird zwischen einem frühen (primären) und einem späten (sekundären) Multiorganversagen unterschieden. Ein primäres MOV kann unmittelbar im Rahmen eines schweren Traumas, nach Operationen mit ausgedehnter Gewebeerstörung oder nach ausgeprägten Schockzuständen entstehen. Das sekundäre MOV entwickelt sich erst nach einer initial stabilen Phase durch einen zweiten Insult, wie z.B. einer bakteriellen Infektion, im Rahmen eines als Two-hit-Modells bekannten Pathomechanismus (Deitch 1992).

1.1.7 Bedeutung der Hypoxie im Schock

1.1.7.1 Lipidperoxidation

Oxidativer Stress im biologischen Organismus entsteht als Konsequenz eines Ungleichgewichts zwischen prooxidativen und antioxidativen Systemen zu Gunsten der Prooxidantien. Dies führt zu einer Schädigung von Biomolekülen wie Nukleinsäuren, Proteinen, strukturellen Kohlenhydraten oder Lipiden (Sies and Cadenas 1985). Insbesondere der Angriff auf Lipide führt zu einer vermehrten Freisetzung hochreaktiver Substanzen (Gutteridge 1995).

Die Schädigung von Lipiden durch freie Radikale, insbesondere der mehrfach ungesättigten Fettsäuren zellulärer Membranen, wird als Lipidperoxidation bezeichnet. Diese entsteht durch Einfluss von radikalischen Oxidantien, wie das Superoxidanionenradikal und das Hydroxylradikal. Diese Verbindungen verdanken ihre hohe Reaktivität einem ungepaarten, sog. freien Elektron. Aufgrund dieser hohen Reaktivität sind die freien Radikale in der Lage, ungesättigte Fettsäuren anzugreifen und die Lipidperoxidation in Gang zu setzen (*Abb. 2*).

1 Einleitung

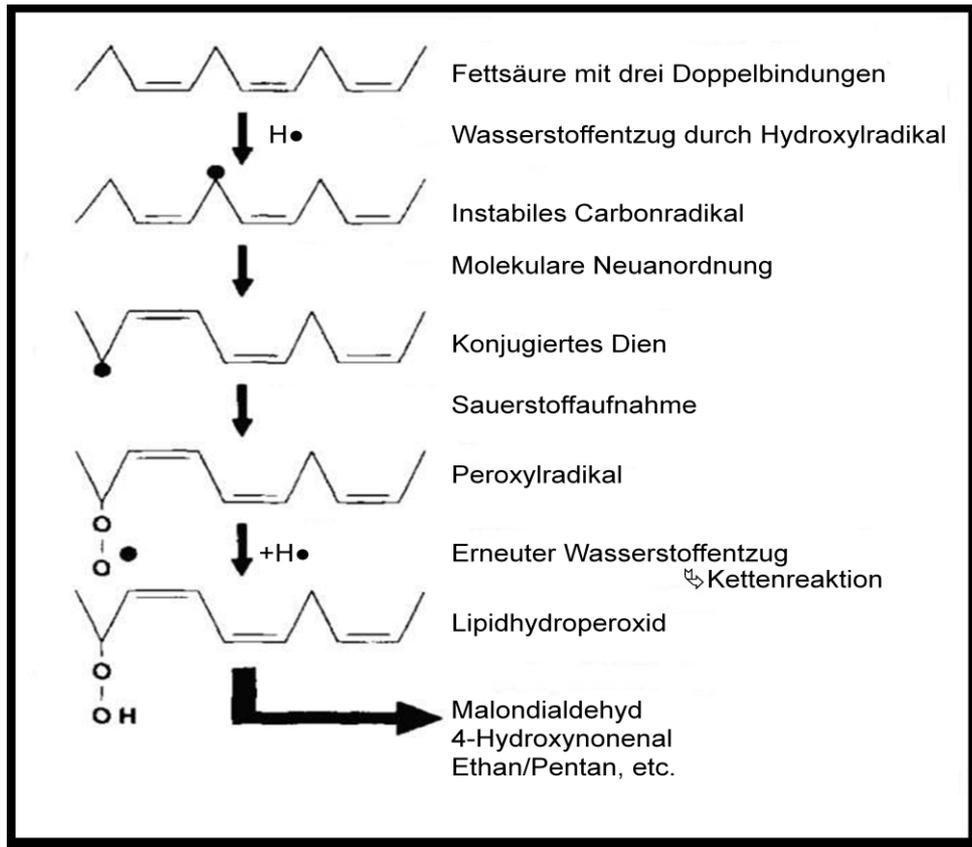


Abb. 2 Schematische Darstellung der Reaktionen bei der Lipidperoxidation (Young and McEneny 2001).

Die erste Reaktion bei der Lipidperoxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren besteht im Entzug eines Wasserstoffatoms aus einer Doppelbindung zwischen zwei Kohlenstoffatomen. Hierbei bleibt ein freies, ungepaartes Elektron an einem Kohlenstoffatom zurück. Diese Verbindung unterläuft dann eine Umlagerung in ein konjugiertes Dien, aus welchem unter Einfluss von Sauerstoff ein Peroxyradikal entsteht. Das entstandene Peroxyradikal entzieht wiederum ein Wasserstoffatom aus einer anderen mehrfach ungesättigten Fettsäure und somit wird die Kettenreaktion in Gang gesetzt (Catala 2006).

Zur Unterbindung dieser Kettenreaktion kommt es bei Reaktion zweier Radikale miteinander, Verbindung des Radikals mit einem Antioxidans wie z.B. Vitamin E (Buettner 1993), oder mit Hilfe körpereigener Enzyme wie Superoxid-Dismutase, Katalase, und Peroxidase.

Als Endprodukt der Reaktion eines Peroxyradikals mit einem Wasserstoffatom entstehen verschiedene Hydroperoxide und zyklische Peroxide. Durch Fragmentation entstehen Aldehyde, unter anderem Malondialdehyd, das als Marker für abgelaufene Peroxidationsprozesse im Gewebe nachgewiesen werden kann

1 Einleitung

(Armstrong and Browne 1994). Diesen Mechanismus hat man sich im Rahmen dieser Arbeit zu Nutze gemacht, um das Ausmaß des oxidativen Stresses auf zellulärer Ebene beim hämorrhagischen Schock zu untersuchen.

An biologischen Phospholipidmembranen verringern Lipidperoxidationsprozesse die Fluidität und Stabilität der Membran, führen zu einer erhöhten Permeabilität, alterieren den Ionentransport und inhibieren metabolische Prozesse (Nigam and Schewe 2000). Schließlich kommt es zum Abfall des Membranpotentials sowie zu Membraneinrissen mit Freisetzung intrazellulärer Zellbestandteile (Esterbauer, Schaur et al. 1991) mit zusätzlicher Schädigung der Mitochondrien und weiterer Radikalbildung (Green and Reed 1998).

Hinzu kommt es durch Freisetzung intrazellulärer Metallionen, v.a. von Eisen und Kupfer aus Zellspeichern, zur Verstärkung der Lipidperoxidation (Halliwell and Gutteridge 1984).

1.1.7.2 Häm und HO-1

Häm gehört in die Gruppe der Metalloporphyrine und besteht aus einem planaren Protoporphyrin-Ring, der aus vier durch Methin-Brücken miteinander verbundenen Pyrrol-Ringen mit unterschiedlichen Seitenketten aufgebaut ist. Die Substituenten sind für die Bindung an Proteine essentiell. Die zum Zentrum des Rings zeigenden Stickstoff-Atome sind in der Lage, Übergangsmetalle zu komplexieren. Im Falle des Häm ist ein zweiwertiges Eisen-Atom komplexiert, weshalb Häm auch als Eisen-Protoporphyrin-IX (FePP-IX, Ferroprotoporphyrin-IX) bezeichnet werden kann (Maines 1997).

Häm ist ein wesentlicher Bestandteil vieler Enzyme mit unterschiedlichen Funktionen:

- Sauerstoffbindung (Hämoglobin, Myoglobin)
- Sauerstoff-Metabolismus (Peroxidasen) und Elektronentransfer (Cytochrome), sowie
- Synthese von Signal-Molekülen wie NO-Synthase, Cyclooxygenase, Guanylat-Cyclase und Hydroxylasen (Ponka 1999; Wagner, Cadetg et al. 2003).

Es besitzt neben seinen nützlichen Eigenschaften allerdings auch solche, die schädigend auf den Organismus wirken können: Freies zelluläres Häm ist ein Pro-Oxidant, weshalb es vor allem in höheren Konzentrationen toxisch wirkt (Gutteridge

1 Einleitung

and Smith 1988; Balla, Vercellotti et al. 1991) und spielt eine Rolle bei der Entstehung von oxidativem Stress und Zellmembran-Schädigung (Beri and Chandra 1993; Jeney, Balla et al. 2002; Wagener, Volk et al. 2003).

Der Häm-Abbau kann beim Menschen auf enzymatischem und nicht-enzymatischem Wege erfolgen, wobei der erste der physiologisch bedeutsamere ist.

Die an mikrosomalen Membranen lokalisierte Hämoxxygenase katalysiert den initialen und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt im enzymatischen Häm-Abbau. Aus der von ihr katalysierten Reaktion gehen unter Verwendung von molekularem Sauerstoff (O_2) und NADPH äquimolare Mengen an Biliverdin (BV), Kohlenmonoxid (CO) und zweiwertigem Eisen (Fe^{2+}) hervor (Tenhunen, Marver et al. 1968; Tenhunen, Marver et al. 1969; Maines 1988) (Abb. 3).

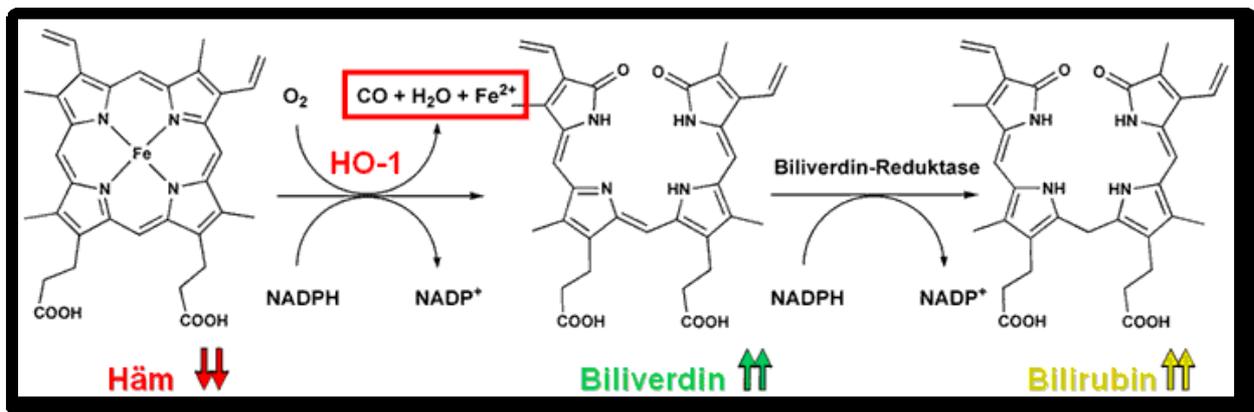


Abb. 3 Reaktionsweg der Hämoxxygenase 1 (Tenhunen, Marver et al. 1968).

Bis heute wurden drei Isoformen der Hämoxxygenase identifiziert, die dem Abbau von toxischem Häm im biologischen System dienen. Dazu gehören die durch oxidativen Stress induzierbare HO-1 aus der Familie der Hitze Schock Proteine (Choi and Alam 1996), die konstitutive HO-2 (Maines 1997) und die zuletzt identifizierte HO-3 (McCoubrey, Huang et al. 1997). Diese membrangebundenen Proteine sind Produkte unterschiedlicher Gene und sind in den Organen unterschiedlich verteilt (Maines 1988; Maines 1997). Die höchste Konzentration an HO-1 wurde in der Milz und in der Leber gemessen, während HO-2 im Gehirn und in den Testes die höchsten Konzentrationen aufwies (Maines 1997).

Neben den Hämoxxygenasen finden sich noch andere, weniger bedeutsame enzymatische Abbausysteme, unter anderem durch die Xanthin-Oxidase (Guengerich 1978; Maines 1988). In den letzten Jahren wurde berichtet, dass der

1 Einleitung

Hämoxygenase und ihren Produkten protektive Eigenschaften zugeschrieben werden können (Yachie, Niida et al. 1999; Kawashima, Oda et al. 2002).

Weiterhin konnte an verschiedenen Modellen von Zellschädigung der protektive Effekt der Hämoxygenase gezeigt werden (Tullius, Nieminen-Kelha et al. 2002; Schmidt, Hoetzel et al. 2004). Aus diesen Gründen wird postuliert, dass sie in verschiedenen Stoffwechselforgängen eine entscheidende regulatorische Rolle spielen.

Unter der Vielzahl der aktuell bekannten Stressproteine scheint die Hämoxygenase-1 von besonderem Interesse zur Reduktion eines durch Ischämie hervorgerufenen Gewebeschadens zu sein:

- Kohlenmonoxid (CO) soll wie Stickstoffmonoxid (NO) über die Aktivierung der löslichen Guanylat-Cyclase zu einer Zunahme des zyklischen 3' 5' Guanosinmonophosphat (cGMP) - Spiegels führen und dadurch eine Gefäßdilatation bewirken (Furchgott and Jothianandan 1991; Utz and Ullrich 1991; Verma, Hirsch et al. 1993; Morita, Perrella et al. 1995).
- Biliverdin wird durch die Biliverdin-Reduktase in Bilirubin, einem antioxidativ wirkenden Molekül (Stocker, Yamamoto et al. 1987), reduziert (Kutty and Maines 1981).
- Eisen wird nach Induktion der Ferritinexpression durch HO-Aktivitätszunahme an Ferritin gebunden und kann damit nicht mehr die Herstellung von Sauerstoffradikalen, wie z. B. OH⁻, katalysieren (Halliwell 1978).

Aufgrund dieser antioxidativen und gefäßdilatierenden Eigenschaften spielt die Hämoxygenase-1 eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase und kann dadurch möglicherweise einen ischämischen Schaden reduzieren. Aufgrund dieser Tatsachen spielt die HO-1 eine ausschlaggebende Rolle innerhalb des Hämoxygenasesystems im Zellschutz bei oxidativem Stress wie z.B. im Rahmen eines hämorrhagischen Schocks (Rensing, Bauer et al. 1999; Kubulus, Rensing et al. 2005).

Induktoren von HO-1

Wie kein anderes Enzym reagiert die HO-1 extrem empfindlich auf verschiedene Stressoren, wie z.B. Hyper- (Okinaga and Shibahara 1993) und Hypothermie (Kubulus, Roesken et al. 2004), Ischämie/Reperfusion (Kubulus, Roesken et al. 2004; Kubulus, Rensing et al. 2005) Hypoxie, Hyperoxie (Takahashi, Takahashi et al.

1 Einleitung

1999), inflammatorische Zytokine (Terry, Clikeman et al. 1998; Amon, Menger et al. 2003), Endotoxin (Camhi, Alam et al. 1995; Pellacani, Wiesel et al. 1998), Häm (Taylor, Carraway et al. 1998), Metalle (Immenschuh, Iwahara et al. 1995), sowie die portale Hypertension (Fernandez and Bonkovsky 1999).

Allen Induktoren gemeinsam ist, dass sie oxidativen Stress verursachen (Bauer and Bauer 2002). Trotz der vielfältigen Induktionsmöglichkeiten ist Häm, und damit auch Hämoglobin, der stärkste Induktor der HO-1, da dieses gleichzeitig das Substrat dieses Enzymes ist.

1.1.7.3 Der Hypoxie-induzierbare Faktor 1 α (HIF-1 α)

Der menschliche Körper ist auf eine ausreichende Zufuhr an Sauerstoff zum Überleben angewiesen und muss sich den Gegebenheiten anpassen. Ein Mangel an Sauerstoff treibt die verschiedensten Stoffwechselforgänge an, um den Organismus unter diesen Bedingungen leistungsfähig zu halten. Diese Anpassungsvorgänge bedürfen einer strikten Regulation sowohl der metabolischen, als auch der zellulären Mechanismen.

Die Hypoxie-induzierbaren Faktoren (HIF) spielen hier eine Schlüsselrolle (Semenza 2000). Sie regulieren auf transkriptioneller Ebene die wichtigsten Parameter, wie Durchblutung und ATP-Gewinnung zur Instandhaltung des Sauerstoff-Metabolismus.

Struktur

HIF-1 ist ein heterodimeres Protein, welches aus einer 120 kDa schweren α - und einer 91-94 kDa schweren β -Untereinheit besteht. Beide Untereinheiten gehören zur PAS-Superfamilie, einer Gruppe von Sensorproteinen, die v. a. auf Umwelt- und Entwicklungssignale spezialisiert sind und ihren Namen von den zuerst identifizierten Proteinen: Per (Period), ARNT (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator) und Sim (Single minded) erhalten haben (Taylor and Zhulin 1999). Weitere Mitglieder dieser Familie sind CLOCK und MOP3 (CYCLE), die in den zirkadianen Rhythmus regulierend einwirken (Gu, Hogenesch et al. 2000).

HIF-1 ist strukturell ein basisches Helix-Loop-Helix (bHLH)-Protein, das seine Zielsequenz in der großen Furche der DNA bindet (Murre, Bain et al. 1994; Kewley, Whitelaw et al. 2004).

Nur HIF-1 α wird Sauerstoff-abhängig reguliert. Diese Untereinheit wird konstitutiv transkribiert und translatiert, unter normoxischen Bedingungen aber nach einer

1 Einleitung

Ubiquitinierung durch das von Hippel-Lindau-Protein (pVHL) erkannt und im Proteasom degradiert (Maxwell, Wiesener et al. 1999; Hon, Wilson et al. 2002; Min, Yang et al. 2002).

HIF-1 β hingegen ist ein ubiquitäres, nicht Sauerstoff-reguliertes Protein, das als Heterodimerisierungspartner des Dioxin-Rezeptors (*aryl hydrocarbon receptor*, AhR) transkriptionsinitiierend an spezifischen *dioxin response elements* (DREs) agiert.

Neben HIF-1 α sind mittlerweile zwei weitere Mitglieder der HIF-Familie entdeckt worden, deren Funktion noch nicht vollkommen geklärt ist. Sie werden, anders als HIF-1 α , nicht ubiquitär exprimiert (Talks, Turley et al. 2000). HIF-2 α wurde initial als „endotheliales PAS-Protein“ (EPAS-1), HIF-like factor (HLF) oder auch HIF-related factor (HRF) beschrieben (Tian, McKnight et al. 1997). Der HIF-3 α wurde erstmals 1998 beschrieben (Gu, Moran et al. 1998).

HIF-1 α besitzt N- und C-terminal eine nukleäre Lokalisationssequenz (NLS) sowie zwei Transaktivierungsdomänen (Taylor, Carraway et al. 1998), die für die Interaktion mit Co-Aktivatoren zuständig sind. Die TA-Domänen werden von einer inhibitorischen Domäne (ID) getrennt, welche unter normoxischen Bedingungen die TAD-Aktivität unterdrückt. Die N-terminale TAD wird von einer sauerstoffabhängigen Degradationsdomäne (oxygen dependent degradation domain, ODD) überlagert, welche für die Instabilität von HIF-1 α unter normoxischen Bedingungen verantwortlich ist (Jiang, Zheng et al. 1997; Pugh, O'Rourke et al. 1997).

Regulation von HIF-1

Die HIF-1 Regulation erfolgt hauptsächlich auf post-translationeller Ebene anhand der α -Untereinheit, und zwar direkt sauerstoffabhängig. Unter Normoxie ist die α -Untereinheit instabil und wird schnell abgebaut (Wang, Jiang et al. 1995; Huang, Gu et al. 1998). Dies geschieht durch die O₂-abhängige Hydroxylierung an zwei Prolin-Resten (Pro-402 und Pro-564) in der ODD durch Prolyl-4-Hydroxylasen (PHDs), die molekularen Sauerstoff als limitierenden Faktor benötigen (Ivan, Kondo et al. 2001; Jaakkola, Mole et al. 2001; Masson and Ratcliffe 2003). Die PHDs gehören zur Enzymfamilie der 2-Oxoglutarat- und Eisen²⁺-abhängigen Dioxygenasen. Da das Vorhandensein von Sauerstoff für die Enzymaktivität der PHDs unabdingbar ist, werden sie auch als O₂-Sensoren beschrieben (Epstein, Gleadle et al. 2001).

Durch die entstandene Hydroxylierung wird das von-Hippel-Lindau Tumorsuppressorprotein (pVHL) aktiviert, welches seinerseits an Aminosäuren im

1 Einleitung

Bereich der ODD bindet, und als Substrat für die E3-Ubiquitinligase dient (Maxwell, Wiesener et al. 1999; Ohh, Park et al. 2000). Die E3-Ubiquitinligase markiert HIF-1 α durch Polyubiquitinylierung für den anschließenden proteasomalen Abbau (Salceda and Caro 1997; Huang, Gu et al. 1998).

Sauerstoffabhängige Wirkung von HIF-1 α

Unter hypoxischen Bedingungen, wie z.B. beim hämorrhagischen Schock, kommt es zur Akkumulierung von HIF-1 α im Zytosol. Dieses wird dann phosphoryliert und in den Zellkern transloziert. Dort wird es mit ARNT dimerisiert und kann dann als Transkriptionsfaktor an die Hypoxie-responsiven Elemente (HRE) der Promotor- oder Enhancerregion von sauerstoffabhängigen Genen binden (Semenza, Jiang et al. 1996; Camenisch, Stroka et al. 2001) (Abb. 4).

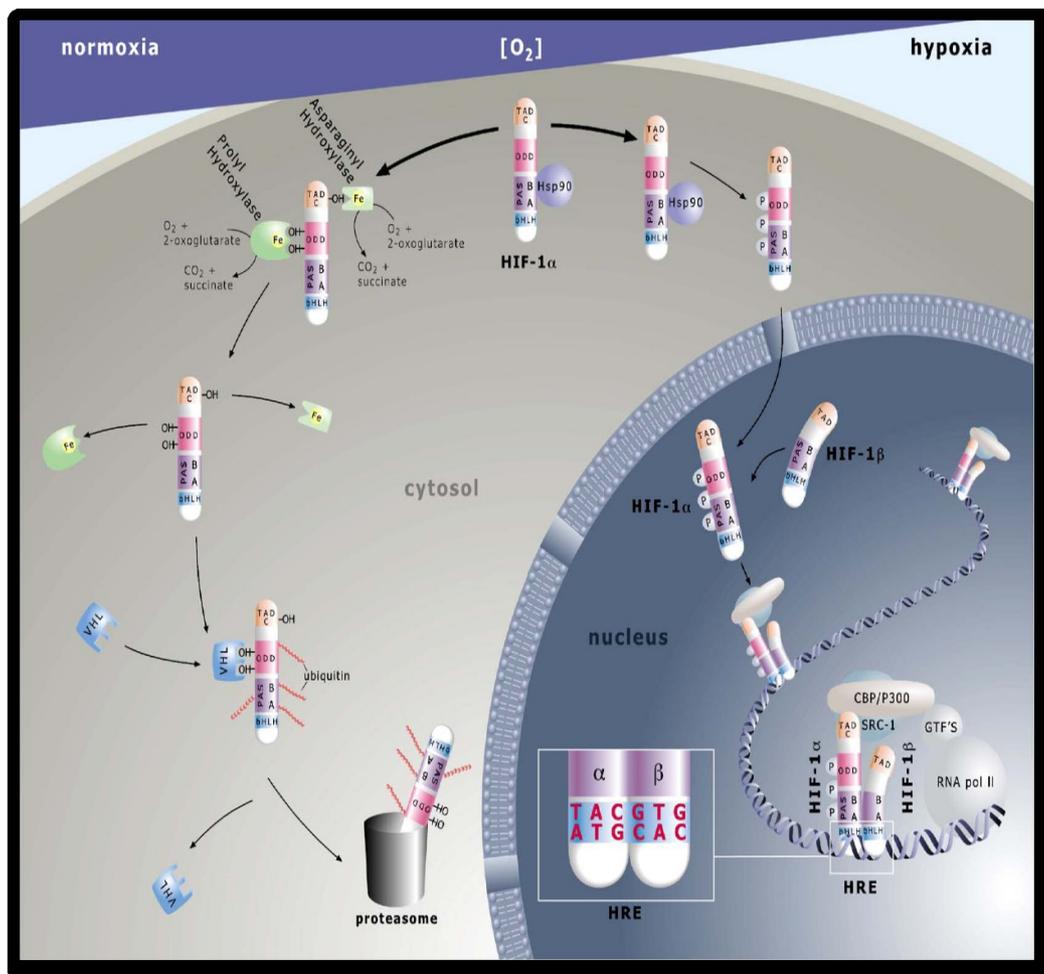


Abb. 4 Darstellung der Aktivitäts-Regulation von HIF-1 α (Fandrey, Gorr et al. 2006)

Unter diesen zahlreichen Genen, die durch HIF-1 α reguliert werden, befinden sich solche, die für die Erythropoese und den Eisentransport zuständig sind, wie z.B. das EPO- (Wang and Semenza 1993) und das Transferrin-Gen (Rolfs, Kvietikova et al.

1 Einleitung

1997). HIF-1 α moduliert ebenfalls die Angiogenese und die Gefäßtonusregulation durch Beeinflussung des VEGF (Forsythe, Jiang et al. 1996; Jubb, Pham et al. 2004), VEGF-Rezeptor-1 (Gerber, Kowalski et al. 2000), Plasminogen-Aktivator Inhibitor-1 (Issbrucker, Marti et al. 2003), der induzierbaren (Palmer, Semenza et al. 1998) und der endothelialen (Coulet, Nadaud et al. 2003) NO-Synthase und der im Rahmen dieser Arbeit näher untersuchten Hämoxxygenase-1 (Lee, Jiang et al. 1997). Hinzu kommt die Regulation mehrerer Gene in Rahmen des anaeroben Stoffwechsels (Glukoseaufnahme und Glykolyse), Zellmigration und -adhäsion (Metastasierung/Chemotaxis) und Wachstum/Apoptose (Tumorstadium und -progression).

Unter hämorrhagischen Bedingungen führen diese Regulationsvorgänge über die oben genannten Mechanismen zu einer Adaptation des Organismus, um eine Optimierung der Versorgung der Zelle mit Sauerstoff zu gewährleisten.

1.2 Das Leukozyten-Inhibitions-Modul (LIM)

1.2.1 Definition

Das LIM wurde entwickelt, um transient eine überschießende Immunreaktion mit pathophysiologischem Charakter zu inhibieren. Das LIM kann bei herzchirurgischen Patienten, die im Rahmen einer Operation ein SIRS entwickeln, aber auch bei Patienten mit autoimmunen Erkrankungen eingesetzt werden. Bei Patienten mit schwerem Trauma wurde das LIM noch nicht eingesetzt. Es soll langfristig geprüft werden, ob LIM vorteilhafte Effekte bei Intensivpatienten hat und möglicherweise die posttraumatische Entstehung von SIRS und Sepsis verhindert oder reduziert. Die in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen sind wichtige Vorarbeiten für einen klinischen Einsatz in naher Zukunft.

1.2.2 Makroskopischer Aufbau

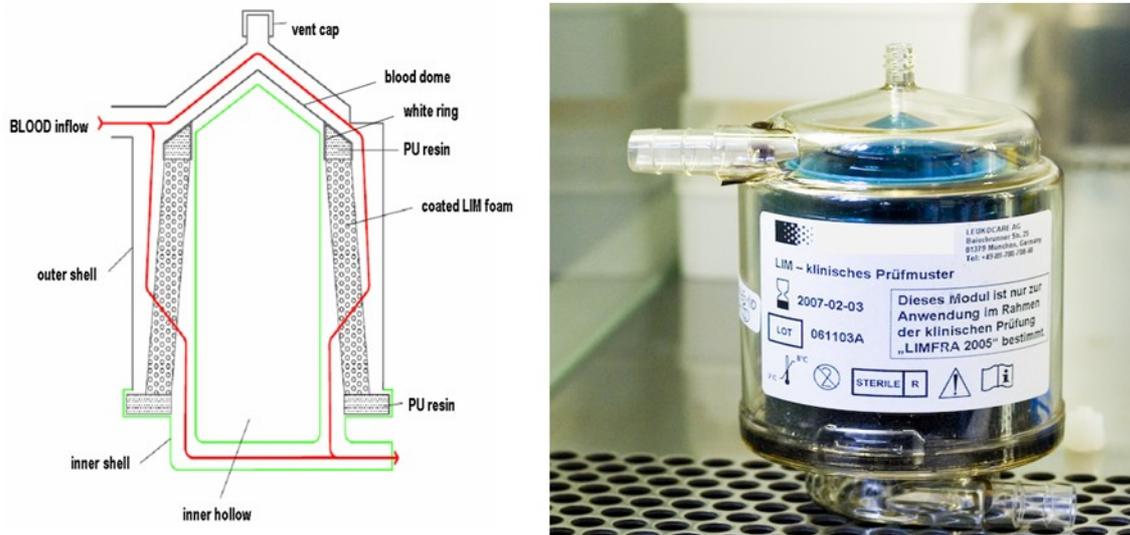


Abb. 5 Detaillierter makroskopischer Aufbau des Leukozyten-Inhibitions-Moduls

Das LIM (Abb. 5), wie es in der Herz-Lungen-Maschine derzeit in klinischen Studien eingesetzt wird, besteht aus einem Polykarbonat-Gehäuse mit Blutein- und -ausstrom. Im Gehäuse befindet sich ein offenporiger Polyurethanschaum, der mit einem anti-Fas IgM Antikörper beschichtet ist. Der Antikörper ist kovalent gebunden und wird durch eine speziell entwickelte Nachbeschichtung geschützt.

Das LIM hat gute rheologische Eigenschaften und erlaubt einen ausreichend intensiven Kontakt der zirkulierenden Neutrophilen mit der biofunktionellen Oberfläche. Es wurde bereits früher gezeigt, dass die Neutrophilen nach Kontakt mit dem Antikörper sich vom Schaum ablösen und die präapoptischen Neutrophilen offenbar von der Milz degradiert werden (Scholz and Cinatl 2005). Toxische Eigenschaften wurden bislang nicht entdeckt.

1.2.3 Mikroskopischer Aufbau

Die Beschichtung der Polyurethanoberfläche innerhalb des LIM wird in drei Schritten durchgeführt. Die kovalente Bindung des Antikörpers an den Kunststoff erfolgt mittels eines speziellen Silans. Zur Verhinderung der unspezifischen Ablösung unter Flussbedingungen im Blutstrom werden die kovalent gebundenen Antikörper mit einer Nachbeschichtung behandelt. Diese Nachbeschichtung erlaubt sogar eine Sterilisation der biofunktionellen Oberfläche ohne nennenswerten Funktionsverlust.

1 Einleitung

Dies ist besonders beachtlich, da es sich um einen komplexen IgM-Antikörper handelt, der in der Regel sehr instabil ist.

1.2.4 Funktionsprinzipien

Die funktionellen Einheiten des mit einer Nachbeschichtung überzogenen Antikörpers sind überraschenderweise auch unter Blutflussbedingungen funktionell aktiv. Die Neutrophilen, die kurzzeitig in Kontakt mit der biofunktionellen Beschichtung kommen, werden innerhalb von Minuten inaktiviert und gehen später in Apoptose (*Abb. 6*). Vermutlich wird ein großer Anteil sehr schnell vom phagozytären Immunsystem des Patienten abgeräumt und degradiert. Daher findet man während einer LIM-Behandlung eine geringere Zahl an zirkulierenden neutrophilen Granulozyten.

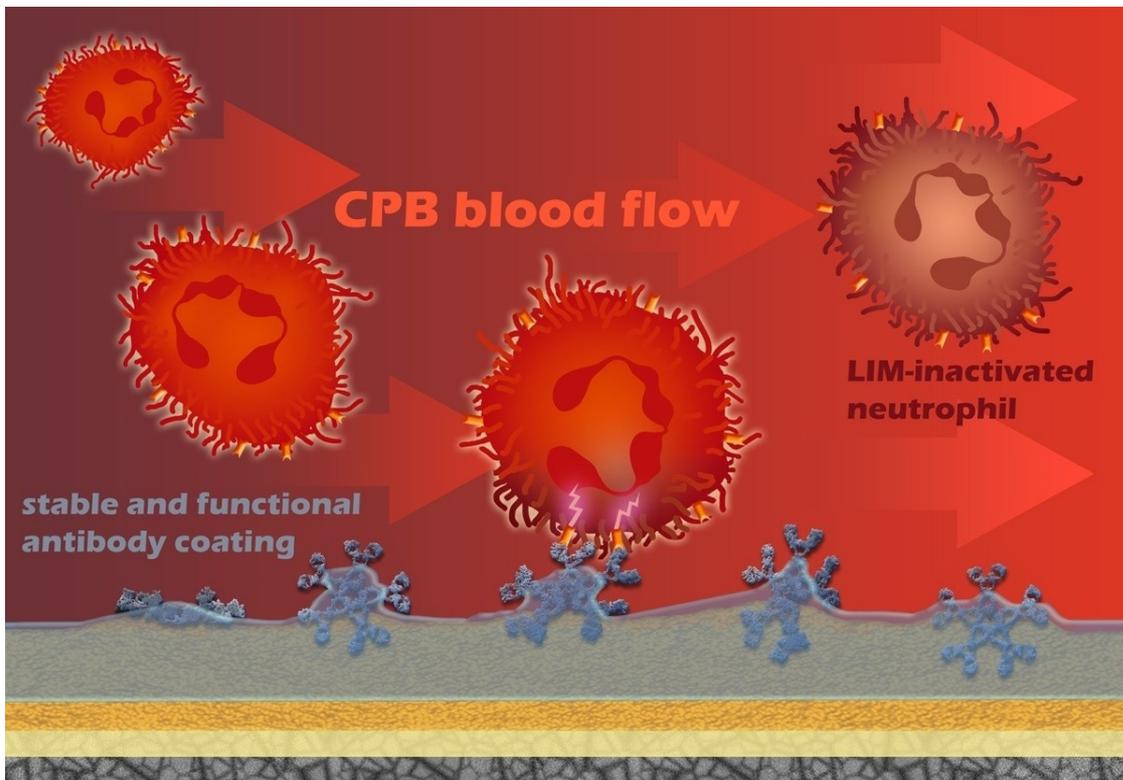


Abb. 6 Funktionsprinzip des Leukozyten-Inhibitions-Moduls

2. Ziele der Arbeit

2.1 Aufbau und Etablierung eines hämorrhagischen Schockmodells im Schwein als Voraussetzung für die Überprüfung der posthämorrhagischen Immunantwort

Ein geeignetes Großtiermodell (Schwein) zur Testung extrakorporaler Immuntherapie-Ansätze gab es bei Beginn der Arbeit nicht in der Heinrich-Heine Universität. Daher war es eine Voraussetzung für die Untersuchungen dieser Arbeit, ein entsprechendes Modell zu etablieren. Aufgrund des großen Umfangs der Studie wurde das hämorrhagische Schockmodell durch die gesamte LIM-Arbeitsgruppe der Klinik für Unfall- und Handchirurgie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf etabliert und verifiziert.

2.2 Überprüfung der posthämorrhagischen Immunantwort anhand inflammatorisch/hypoxischer Parameter

Nach Etablierung des Schockmodells wurden inflammatorische Parameter zur Quantifizierung eines entstandenen Schadens zur Evaluierung einer extrakorporalen Immuntherapie im Schweinemodell festgelegt. Die Parameter sollten der klinischen Realität so nah wie möglich sein. Die im Rahmen dieser Arbeit ausgesuchten Parameter zur Quantifizierung der posthämorrhagischen Immunantwort waren die Gen- und Proteinexpression von Hämoxxygenase-1 (HO-1) und vom Hypoxie-Induzierten Faktor-1 α (HIF-1 α) und die Konzentrationsbestimmung von Malondialdehyd-Addukte (MDA) in verschiedenen Organen.

2.3 Testung der LIM-Effektivität und Unbedenklichkeit

Die untersuchten Parameter MDA, HO-1 und HIF-1 α wurden zwischen den Untersuchungsgruppen ^{*}LIM und [^]LIM verglichen und zur Überprüfung der Effektivität des Einsatzes von LIM herangezogen.

3. Material und Methoden

Die Aufzeichnung der im Rahmen dieser Arbeit unter 3.2.1, 3.3.1, 3.3.2, 3.3.8 und 3.3.9 präsentierten Methoden wurden durch die LIM-Arbeitsgruppe der Klinik für Unfall- und Handchirurgie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt. Die Durchführung der operativen Eingriffe, Blutabnahmen sowie die Erfassung von Daten bzw. Laborparametern in der Tierversuchsalnag erfolgte durch die gesamte Arbeitsgruppe. Die Arbeitsgruppe bestand aus 5 Mitarbeitern, die von Dr. med. Tim Lögters betreut und von Prof. Dr. phil. nat. Martin Scholz geleitet wurde. Zudem erfolgten weiterführende Auswertungen und Untersuchungen im Labor der Klinik für Unfall- und Handchirurgie. Diese wurden durch die Mitarbeiter individuell durchgeführt und ausgewertet.

Mitarbeiter und deren Arbeitsschwerpunkte:

Annina Ott:	Einfluss des Leukozyten-Inhibitions-Moduls auf die posthämorrhagische Aktivierung von neutrophilen Granulozyten im Tiermodell
Sarah Sadek:	Einfluss des Leukozyten-Inhibitions-Moduls auf die posthämorrhagische Gewebeschädigung (Serologie/Histologie/Elektronenmikroskopie)
Jessica Baltes:	Untersuchungen zum Einfluss des Leukozyten-Inhibitions-Moduls auf die posthämorrhagische Apoptose im Gewebe (Bax, Bcl-2)
Ingo Witte:	Einfluss des Leukozyten-Inhibitions-Moduls auf die Hämodynamik im Tiermodell
Alberto Schek:	Untersuchungen zum Einfluss des Leukozyten-Inhibitions-Moduls auf die posthämorrhagische Inflammation und Gewebehypoxie im Tiermodell. Gen- und Proteinexpression von HIF-1 α und HO-1, Konzentration von MDA

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Versuchstiere

Münchner Miniaturschwein
Tierversuchsanlage Heinrich Heine
Universität Düsseldorf

3.1.2 Zugänge/Katheter

5Fr arterieller Katheter
Wygon, Ecouen, Frankreich
8Fr Einführungsschleuse
Arrow Deutschland, Erding
Blasenkatheter Cystofix
Braun, Melsungen
Dreilumiger 8Fr Sheldon-Katheter
Arrow Deutschland, Erding
Endotrachealer Tubus 6-7 mm
Malinckrodt, Athlone, Ireland
Periphervenöser Zugang
Braun, Melsungen
Swan-Ganz Katheter
Edwards Lifesciences, Irvine,
California, USA

3.1.3 Medikamente/Infusionen

Atropin
Braun, Melsungen
Azaperon
Janssen-Cilag GmbH, Neuss
Fentanyl
Janssen-Cilag GmbH, Neuss
Inzolen-Lösung
Dr. Franz Köhler Chemie, Bensheim
Isofluran (1%)
Actavis GmbH, Langenfeld
Kaliumchlorid
Braun, Melsungen
Ketamin
Pfizer, Berlin
Lachgas-Sauerstoff-Mischung
Linde AG, Pullach
Phenobarbital
Desitin Arzneimittel GmbH, Aachen
Piritramid
Janssen-Cilag GmbH, Neuss
Ringer-Lösung
Fresenius Kabi, Bad Homburg
Thiopental
Inresa Arzneimittel, Freiburg

3.1.4 Geräte/Software

ABL 700
Radiometer GmbH, Willich
Bio Photometer
Eppendorf, Hamburg

3 Material und Methoden

Criterion Blotter	BioRad, München
Geldokumentationseinheit Chemidoc	BioRad, München
GraphPad Prism ver. 5.1 for Windows	GraphPad Software, San Diego, USA
Kryostat 2700-Frigocut	Reichert Jung, Nußloch
Mikroskop JEM 2000 CX	JEOL, Arishima, Japan
Mini-PROTEAN Tetra Cell	BioRad, München
PCR-Gerät MyCycler	BioRad, München
Photometer Victor 3	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
PowerPac HC Power Supply	BioRad, München
Quantity One Software	BioRad, München
SAS/Stat for Windows software ver. 8	SAS Institute, Inc, Cary, USA
Sonifiziergerät Ultrasonic processor UP50H	Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow
SPSS ver. 15	SPSS, Inc, Chicago, USA
Ultraschall-Prozessor UP50H	Hielscher, Teltow
VET-abc	scil animal care Company, Viernheim
Vortexer IKA MS3 basic	IKA Works, Inc. Wilmington, USA
Zentrifuge Heraeus Fresco 17	Thermo Fisher Scientific, Bonn

3.1.5 Chemikalien

30 % Acrylamid/Bis Lösung 37,5 : 1	Roth, Karlsruhe
Agarosegel	Sigma, München
Ammonium Persulfat	Sigma, München
Bovines Serum-Albumin	PAA Labs GmbH, Marburg
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
Chem.lum.-Substrat SuperSignal West pico	Pierce, Bonn
Chloracetatesterase Färbung	Sigma, München
Chloroform	Sigma, München
Dc Protein Assay kit	BioRad, München
ECL Western Blotting Substrate	Pierce, Bonn
Epoxid-Resinat Durcupan-Epon	Fluka Chemie GmbH, Buchs
Ethanol	Merck, Darmstadt
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Glutaraldehyd	Merck, Darmstadt
Glycerol	Roth, Karlsruhe

3 Material und Methoden

Glycin	Roth, Karlsruhe
Hämatoxylin-Eosin	Sigma, München
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
Molekularbiologisch reines Wasser	Eppendorf, Hamburg
Natrium desoxycholat	Roth, Karlsruhe
Natrium dodecyl Sulfat (SDS)	Sigma, München
Nonidet-P40 (NP40)	Sigma, München
Paraffin	Sigma, München
PBS Duplecco w/o Mg/Ca	Biochrom, Berlin
Ponceau S Färbung	Serva, Heidelberg
Proteaseinhibitoren Complete Mini	Roche, Mannheim
Reverse Transkriptase Omniscript	Qiagen, Hilden
RIPA Puffer + 1% NP-40 (Nonidet-P40)	Biomol, Hamburg
Roti-Mark Western Set	Roth, Karlsruhe
Steriles RNase-freies Wasser (DEPC)	Invitrogen, Karlsruhe
Sybr Gold Färbung	Invitrogen, Karlsruhe
Taq PCR Core Kit	Qiagen, Hilden
TBARS Assay Kit	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
TBS mit 0.1 % Tween-20	Sigma, München
TEMED	Roth, Karlsruhe
Tris	Roth, Karlsruhe
Trizol-Reagenz	Sigma, München
Tween 20	Sigma, München

3 Material und Methoden

3.1.6 Primer/Antikörper

oligo (dT) 15 Primer Sigma, München

Gen-spezifische Primer-Sequenzen HO-1:

R:5'-CGTAGCGCTTGGTGGCCTGCG-3'; F:5'-CAGCCCAACAGCATGCCCCAG-3'

Genosys-Sigma, München

Gen-spezifische Primer-Sequenzen HIF-1 α :

R:5'-AGGGACTCTGGATTTGGTTC-3'; F:5'-TTTAGATTTGGCACAATGAC-3'

Genosys-Sigma, München

Gen-spezifische Primer für Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH):

R:5'-GAAGTCAGAGGAGACCACCA-3'; F:5'-CACCACCATGGAGAAGGCTG-3'

Genosys-Sigma, München

Primäre monoklonale Antikörper:

Anti-Pig-HO-1 Stressgen, Victoria, Canada

Anti-Pig-HIF-1 α Novus Biologicals, Littleton, USA

Rabbit anti-Beta-Actin Antikörper Stressgen, Victoria, Canada

Sekundäre polyklonale Antikörper:

Goat anti-mouse HRP Dako Cytomation, Glostrup, Denmark

Goat anti-rabbit HRP Dako Cytomation, Glostrup, Denmark

3.2 Methoden

3.2.1 Experimentelles Modell

3.2.1.1 Die Versuchstiere

Die zu Forschungszwecken speziell gezüchteten Schweine gehörten zur Rasse der Münchener Miniaturschweine, die durch Kreuzung des Hanford-Minischweins mit dem kolumbianischen Portionsschwein entstand. Die Tiere wurden in der Tierversuchsanlage Düsseldorf gezüchtet und gehalten. 24 Schweine wurden in zwei Gruppen unterteilt mit je 12 Schweinen pro Gruppe (n=12): ⁺LIM (Leukozyten Inhibitions Modul) und ⁿLIM (Standard medical care). Das Gewicht der verwendeten Tiere betrug im Durchschnitt $30,3 \pm 3,3$ kg. 24 Stunden vor dem Versuch wurde jedes Tier in einer einzelnen Box isoliert. Gleichzeitig wurde die Futterzufuhr bis Ende des Versuchs eingestellt. Wasser stand den Tieren ad libitum zur Verfügung.

3.2.1.2 Vorbehandlung und Anästhesie

Die Tiere wurden aus dem Stall geholt und mit einer Einzeldosis Ketamin intramuskulär betäubt. Nach Wirkungseintritt wurden die Schweine unter Spontanatmung in die OP-Schleuse transportiert. Dort wurde ein periphervenöser Zugang in die Ohrvene gelegt. Über diesen Zugang wurde die Narkose mit Stresnil, Thiopental und Atropin eingeleitet. Nach endotrachealer Intubation mit einem 6-7 mm Durchmesser Tubus wurden die Tiere nun in den OP-Bereich gebracht und in Rückenlage fixiert. Die Ventilation erfolgte mittels Isofluran (1%) und Lachgas-Sauerstoff-Mischung im Verhältnis 3:1 bei einem Tidalvolumen der an einem PaCO₂-Wert von 36-44 mmHg und einem PaO₂-Wert von 100-150 mmHg angepasst wurde. Beatmet wurden die Tiere mit einer Frequenz von 10-12/Minute, wobei das Atemzugvolumen bei 300-500ml lag. Die Beatmung wurde anhand des endexpiratorischen CO₂ Gehaltes reguliert. Zur zusätzlichen Analgesie wurde einmalig 1ml Piritramid verabreicht, was gegebenenfalls intraoperativ durch Fentanyl ergänzt wurde.

3.2.1.3 Katheteranlage

Alle operativen Maßnahmen wurden unter strenger Asepsis und Antisepsis durchgeführt.

3 Material und Methoden

3.2.1.3.1 Blasenkatheter

Als erstes wurde ein suprapubischer Blasenkatheter (Cystofix Blasenpunktionsset, Braun, Melsungen) in offener Technik gelegt und mittels Tabaksbeutelnaht und kutanen Einzelknopfnähten fixiert.

3.2.1.3.2 Arterieller Katheter

Nach Fixierung und Abdeckung des Blasenkatheters wurde ein medianer, ca. 15 cm langer Hautschnitt ventralseits am Hals der Schweine durchgeführt und die Arteria carotis aufgesucht, die dann in Seldinger Technik mit einem 5Fr arteriellen Katheter versehen wurde. Dieser Katheter diente zur kontinuierlichen real-time Überwachung der arteriellen Drücke und zur Entnahme arterieller Blutgasanalysen während des Versuchs.

3.2.1.3.3 Sheldon-Katheter

Als nächstes wurde nach Freipräparation ein dreilumiger 8Fr Sheldon-Katheter in die linke Vena jugularis externa ebenfalls in Seldinger Technik eingeführt, der sowohl zur kontrollierten Schockeinleitung und -Erhaltung diente, als auch zur extrakorporalen Zirkulation und Probeentnahmen seinen Einsatz fand.

3.2.1.3.4 Swan-Ganz Katheter

Zusätzlich zu den schon aufgeführten Kathetern wurde an der rechten Vena jugularis externa eine 8Fr Einführungsschleuse angelegt. Nun wurde ein Swan-Ganz Katheter (Edwards Lifesciences, Irvine, California) mit den entsprechenden Anschlüssen zur Druckmessung, Sauerstoffsättigung, und Herzminutenvolumenbestimmung verbunden. Diese wurden danach mit dem Monitor konnektiert, und der Katheter mit einem aufgeblasenen Ballon mit dem Blutstrom in die Pulmonalarterie eingeschwenkt. Die Lage des Katheters wurde durch Kontrolle der Druckkurven im rechten Vorhof, über dem rechten Ventrikel, bis in die Pulmonalarterie ermittelt. Nach Eichung und Funktionsprüfung des arteriellen- und Swan-Ganz Katheters erfolgte die subkutane Fixierung dieser.

3 Material und Methoden

3.2.1.4 Versuchsablauf

Alle Tiere wurden über 15 Minuten beobachtet bevor der Schock durch Blutentnahme aus dem Sheldon-Katheter eingeleitet wurde. Die Senkung des MAP auf 35 ± 5 mmHg erfolgte innerhalb von maximal 15 Minuten. Danach wurde der hämorrhagische Schock über 30 Minuten bei einem MAP von 35 ± 5 mmHg, und weitere 15 Minuten bei einem MAP von 40 ± 5 mmHg durch intermittierende Blutentnahmen aufrechterhalten.

Daraufhin wurde mit der Reperfusion der Tiere mit Hilfe von intravenös applizierter kristalloider (Ringer-) Lösung begonnen.

Mit Beginn der Reperfusionsmaßnahmen kam bei der ^{*}LIM-Gruppe (n=12) das LIM-System zum Einsatz, welches vorher mit NaCl-Lösung geflutet und danach mit heparinisierter Kochsalzlösung gefüllt wurde. Das LIM wurde mit einer Entlüftungskammer über zwei Schenkel des Sheldon-Katheters in den Blutkreislauf eingeschaltet, und bei einer extrakorporalen Flussgeschwindigkeit von 300 ml/min über 3 Stunden eingesetzt (Abb. 7).

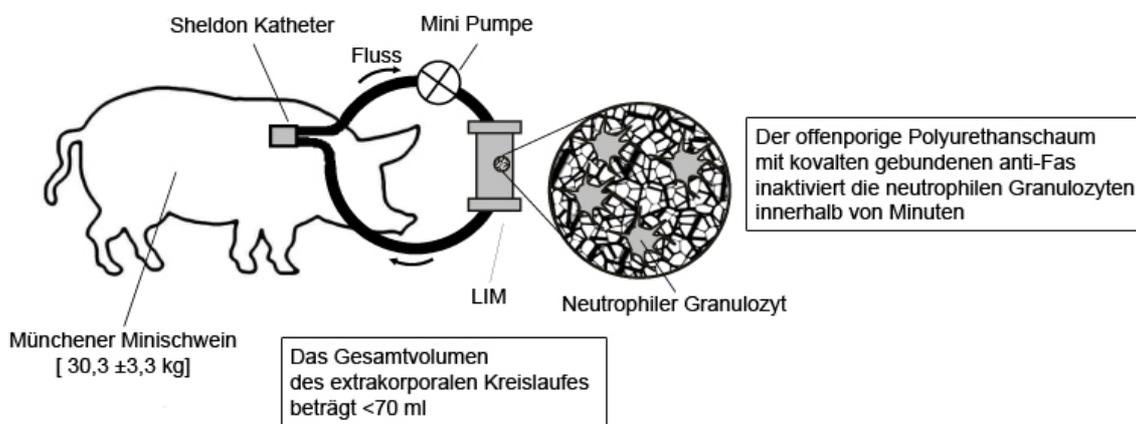


Abb. 7: Katheterlage und LIM-System im Überblick (Lögters 2010)

Bei der ⁿLIM-Gruppe fand kein extrakorporaler Kreislauf statt. Nach drei Stunden wurde das LIM erneut mit Kochsalzlösung geflutet und dann diskonnektiert. Im Anschluss wurden die Wunden verschlossen, die Narkose beendet und nach Extubation das erwachende Schwein in die Stallungen zurücktransportiert.

Alle Tiere wurden dann über 48 (n=12, sechs Schweine pro Gruppe) bzw. 72 Stunden (n=12, sechs Schweine pro Gruppe) in ihren Einzelboxen beobachtet. Den Versuchstieren wurde Blut über ein frei liegendes Sheldon-Katheterlumen zu den prädefinierten Zeitpunkten abgenommen.

3 Material und Methoden

Nach Ablauf der 48 bzw. 72 Stunden brachte man die Tiere wiederum analgosediert, intubiert und beatmet in den Operationssaal. Alle oben genannten Messinstrumente wurden wieder angeschlossen. Nach einem Steady-state von 30 Minuten maß man über 15 Minuten wiederholt die hämodynamischen Parameter und die letzten Blutentnahmen wurden durchgeführt. Der Tod der Tiere wurde durch Infusion einer letalen Dosis Kalium als Bolus i.v. herbeigeführt. Abschließend transportierte man die Körper in den Sektionssaal, wo letztendlich die Autopsie stattfand.

3.2.1.5 Organentnahme und Histologie

Nach der Tötung der Tiere wurden die Körper in den Sektionssaal gebracht und autopsiert. Verschiedene Organproben wurden entnommen und unmittelbar danach in Formaldehyd gelagert. Andere Proben wurden unmittelbar in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Alle Proben wurden nachträglich nach Bedarf weiterverarbeitet.

3.2.1.6 Prädefinierte Blutabnahmen

Die Blutentnahmezeitpunkte für die Labor- und Zellanalysen wurden zuvor standardisiert und festgelegt. „Präshock“ beschreibt den Zeitpunkt direkt vor Beginn des Schocks nach Anlage aller Katheter. Der nächste Zeitpunkt „Ende Blutung“ wurde 15 Minuten nach Beginn des Schocks abgenommen. Als nächstes wurde eine Blutentnahme 1 Stunde nach Schockbeginn, also am Ende des Schocks durchgeführt und als „Ende Schock“ bezeichnet. Unmittelbar nach diesem Zeitpunkt wurde das LIM-System mit anti-CD95 Beschichtung (⁺LIM, n = 12) und die Standardbehandlung ohne extrakorporalen Kreislauf (⁰LIM, n = 12) angeschlossen und die Reperfusion mit Ringer-Lösung begonnen. 15 Minuten nach Anschluss des LIM-Systems („15 Min. LIM“) fand die nächste Blutabnahme statt. Nach weiteren 10 Minuten schloss sich eine erneute Blutabnahme an („25 Min. LIM“). Es erfolgten dann nach 45, 75, 135 und zuletzt kurz vor Ende der OP bei 180 Minuten nach Anschluss des LIM-Systems weitere Blutentnahmen. Zu jedem dieser Zeitpunkte wurde ein EDTA-Röhrchen für ein unmittelbares Differentialblutbild angefertigt. Zusätzlich dazu wurden 2 Serum-Röhrchen abgenommen, die im klinikeigenen Labor zentrifugiert und zur späteren Weiterverarbeitung eingefroren wurden.

3.3 Untersuchungsmethoden

3.3.1 Hämodynamik

Um die posthämorrhagische Immunantwort zu untersuchen, musste ein Schockmodell am Schwein etabliert werden. Dies wurde im Rahmen des Tierexperiments durchgeführt. Hierzu wurden die hämodynamischen Parameter Herzfrequenz (HF), Blutdruck (RR), mittlerer arterieller Druck (MAP), zentralvenöser Druck (ZVD), Herzzeitvolumen (HZV), Sauerstoffpartialdruck (PO₂) Kohlendioxid-Partialdruck (PCO₂), gemischtvenöse Sauerstoffsättigung (SvO₂), mittlerer pulmonalarterieller Druck (MPAP), pulmonokapillärer Verschlussdruck (PCWP), Blutentnahme, Substitutionsmenge und Körperkerntemperatur alle 5 Minuten über den gesamten Versuch registriert. Alle 10 Minuten wurde eine arterielle Blutgasanalyse abgenommen und vor Ort sofort gemessen (*Tab.2*).

	0 h		48 h		72 h	
	SMC	LIM	SMC	LIM	SMC	LIM
MAP [mmHg]	75.7 ± 2.57	75.2 ± 3.11	44.9 ± 2.64 ^a	40.3 ± 4.86 ^a	43.8 ± 2.63 ^a	52.9 ± 2.54 ^{ab}
HR [beats/min]	86.7 ± 3.41	96.2 ± 4.37	91.9 ± 6.59	105.9 ± 6.63	95.6 ± 9.77	90.0 ± 5.00
CO [l/min]	3.0 ± 0.13	3.1 ± 0.12	2.3 ± 0.23	2.3 ± 0.30	2.2 ± 0.08 ^a	3.1 ± 0.24 ^b
CVP [mmHg]	3.3 ± 0.70	3.8 ± 0.55	1.1 ± 0.69	5.8 ± 2.19 ^b	3.4 ± 1.70	4.8 ± 1.24
svO ₂ [%]	86.9 ± 0.95	82.9 ± 2.69	56.0 ± 2.47 ^a	57.7 ± 6.44 ^a	49.1 ± 3.70 ^a	63.1 ± 5.77
PCWP [mmHg]	7.3 ± 1.23	8.2 ± 0.57	3.8 ± 0.88	5.2 ± 0.89	5.9 ± 1.43	5.9 ± 1.12
MPAP [mmHg]	14.8 ± 1.22	17.8 ± 1.49	7.3 ± 1.01 ^a	10.9 ± 1.10 ^{ab}	12.2 ± 2.10 ^a	13.7 ± 1.05 ^a

MAP: mean arterial pressure, HR: heart rate; CO: cardiac output; CVP: central venous pressure; svO₂: central venous oxygen saturation; PCWP: pulmonary capillary wedge pressure; MPAP: mean pulmonary arterial pressure; n=12 per group at time point 0; at 48h and 72h, n=6; Mean ± SEM. *a* – statistically significant ($p < 0.05$) over-time; *b* – statistically significant ($p < 0.05$) between SMC and LIM group.

Tab. 2 Hämodynamische Parameter
(Lögters 2010)

3.3.1.1 Mittlerer arterieller Druck (MAP)

Der mittlere arterielle Druck (MAP) war vor Versuchsbeginn in beiden Versuchsgruppen auf einem vergleichbaren Niveau ($75,7 \pm 2,57$ mmHg $^{\text{nLIM}}$; $75,2 \pm 3,11$ mmHg $^{\text{+LIM}}$). Nach 15 Minuten ab Blutungsbeginn betrug der MAP in den Gruppen $^{\text{+LIM}}$ und $^{\text{nLIM}}$ $34,0 \pm 1,3$ mmHg (*Tab. 2*). Im Verlauf weiterer 45 Minuten stieg der MAP langsam auf einen Wert von $41,0 \pm 2,6$ mmHg. Zu diesem Zeitpunkt war das Ende der Schockphase festgelegt. Der totale Blutverlust durch die kontrollierte Entblutung ergab 586 ± 22 ml. Dies ergibt bei einem mittleren Blutvolumen von ca. 65 ml/Kg Körpergewicht und einem mittleren Gewicht der eingesetzten Schweine von 30,3 kg, einen Verlust von ca. 30% des totalen zirkulierenden Blutvolumens.

Nachdem der MAP gegen Ende der Schockphase bei der $^{\text{nLIM}}$ -Gruppe $42,2 \pm 2,6$ mmHg und bei der $^{\text{+LIM}}$ -Gruppe bei $38,3 \pm 2,1$ mmHg lag, stieg dieser innerhalb der ersten 15 Minuten der Reperfusionphase auf einen Wert von $63,0 \pm 3,37$ mmHg bei der $^{\text{nLIM}}$ -Gruppe und $55,5 \pm 3,86$ mmHg bei der $^{\text{+LIM}}$ -Gruppe.

60 Minuten nach Reperfusionbeginn stellte sich der MAP allmählich in beiden Gruppen auf einen Wert von $57,92 \pm 1,47$ mmHg bei $^{\text{nLIM}}$ und $51,0 \pm 1,53$ mmHg bei $^{\text{+LIM}}$ ein. Im Verlauf der zweiten Stunde sank der MAP auf Werte von $55,58 \pm 1,69$ mmHg ($^{\text{nLIM}}$) und $51,41 \pm 2,16$ mmHg ($^{\text{+LIM}}$). Nach dreieinhalb Stunden wurde der letzte MAP-Wert registriert. Dieser betrug 71% des Ausgangs-MAP von der $^{\text{nLIM}}$ -Gruppe ($54,57 \pm 2,08$ mmHg) und bei der $^{\text{+LIM}}$ -Gruppe 72% des Ausgangs-MAP ($54,33 \pm 3,56$ mmHg) (*Abb. 8*).

Bei Beobachtung 48 h nach Reperfusion wurden keine signifikanten Steigerungen bezüglich des MAP bei der $^{\text{+LIM}}$ -Gruppe festgestellt ($40,3 \pm 4,86$ mmHg [$p < 0,05$]). Das MAP der $^{\text{nLIM}}$ -Gruppe erreichte Werte von $44,9 \pm 2,64$ mmHg [$p < 0,05$]. Bei Betrachtung des MAP nach 72 Stunden, erkennt man eine eindeutige Steigerung des Wertes in der $^{\text{+LIM}}$ -Gruppe ($52,9 \pm 2,54$ mmHg), wobei bei der $^{\text{nLIM}}$ -Gruppe lediglich ein Wert von $43,8 \pm 2,63$ mmHg zu verzeichnen war.

Abschließend ist zu erläutern, dass der MAP in beiden Versuchsgruppen innerhalb von 72 Stunden nicht annähernd zu dem oben genannten Ausgangswert gekommen ist (Witte 2010).

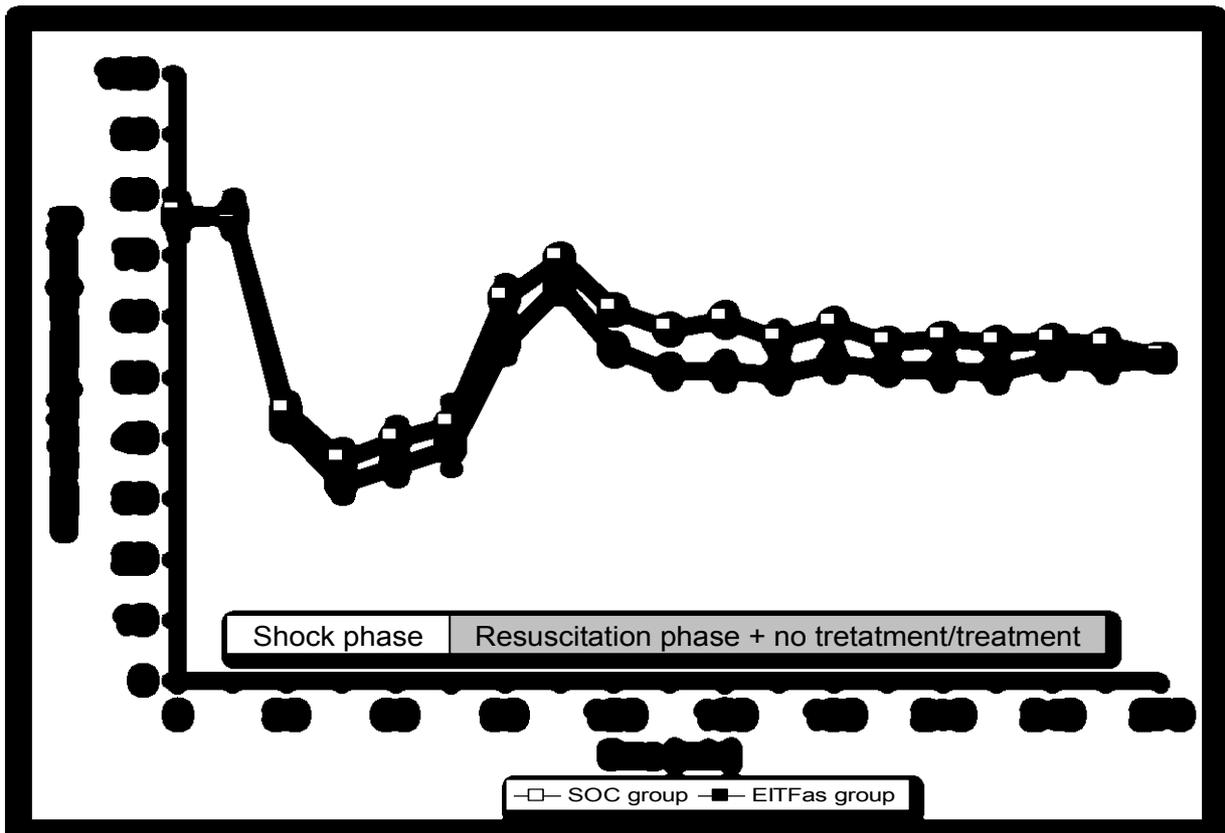


Abb. 8 MAP im Verlauf Schock-Reperfusion

3.3.1.2 Herzfrequenz (HF)

Die Herzfrequenz hatte in beiden Versuchsgruppen einen mittleren Ausgangswert von $96,2 \pm 4,37$ (^+LIM) und $86,7 \pm 3,41$ (nLIM) Schläge pro Minute (bpm). 15 Minuten nach Entblutungsbeginn stieg die HF um $32 \pm 8,89$ bpm. auf Werte von $122,6 \pm 7,0$ bpm. Nach weiteren 45 Minuten, am Ende der Schockphase, nahm die HF bei nLIM und ^+LIM bis auf einen Wert von $142 \pm 19,07$ bpm im Mittel zu. Hierbei tendierte die ^+LIM -Gruppe während der Schockphase zu höheren Herzfrequenzwerten, als dies der Fall bei nLIM war.

Nachdem bei der Schockphase die Herzfrequenz beider Gruppen hoch angestiegen war, ging die Differenz zwischen ^+LIM und nLIM bei der Herzfrequenz etwas auseinander.

Die ^+LIM -Gruppe steuerte nach 15 Minuten Reperfusion Werte von $136,9 \pm 8,3$ bpm an, wohingegen die nLIM -Gruppe bei einem Wert von $118,3 \pm 9,2$ bpm blieb. Diese Tendenz war nach 60 Minuten Reperfusion umso deutlicher. Die Werte der nLIM -Gruppe von $123,9 \pm 8,8$ bpm unterlagen denen von der ^+LIM -Gruppe mit einem Wert von $157,5 \pm 7,0$ bpm. Nach 2 Stunden Post-Reperfusion ging die Tendenz etwas zurück und zeigte Werte von $153,5 \pm 7,3$ bpm bei ^+LIM und $130,5 \pm 10,3$ bpm bei

3 Material und Methoden

ⁿLIM. Am letzten gemessenen Zeitpunkt nach 3 Stunden betrug die Herzfrequenz bei ⁿLIM $122,2 \pm 11,8$ bpm, und bei ⁺LIM $145,1 \pm 6,9$ bpm. In der Nachbeobachtungsphase entwickelte sich die Herzfrequenz bei der ⁿLIM-Gruppe von $91,9 \pm 6,59$ bpm nach 48 Stunden, bis auf $95,6 \pm 9,77$ bpm nach 72 Stunden.

Im Gegensatz dazu verlief die Herzfrequenz bei ⁺LIM von einem Wert nach 48 Stunden von $105,9 \pm 6,63$ bpm, bis zum Erreichen von $90,0 \pm 5,0$ bpm nach 72 Stunden (Witte 2010).

3.3.1.3 Herzzeitvolumen (HZV)

Das Herzzeitvolumen (HZV) betrug vor Schockbeginn in beiden Gruppen $3,1 \pm 0,12$ (⁺LIM) und $3,0 \pm 0,13$ (ⁿLIM) l/min. Im Laufe der ersten 15 Minuten nach Blutungseinleitung sank das Herzzeitvolumen kontinuierlich bis auf Werte von $1,71 \pm 0,14$ l/min. In den nachfolgenden 45 Minuten, also bis Ende der Schockphase, stellte sich das HZV auf einen Wert von $1,64 \pm 0,13$ l/min ein.

Unmittelbar nach Einleitung der Reperfusion und des LIM-Systems stieg das HZV kontinuierlich an, welches nach 15 Minuten Reperfusion bei der ⁿLIM-Gruppe schon $2,25 \pm 0,14$ l/min betrug. Analog dazu stieg auch bei der ⁺LIM-Gruppe das HZV, und zwar bis auf $2,04 \pm 0,14$ l/min. Nach einer knappen halben Stunde erreichte das HZV in der ⁿLIM Gruppe den höchsten Wert seit Beginn des Versuchs (ⁿLIM: $3,57 \pm 0,26$ l/m), und schoss sogar über den Ausgangswert hinaus ($2,95 \pm 0,13$ l/min). Bei der ⁺LIM-Gruppe war eine ähnliche Steigerung ($3,04 \pm 0,18$ l/min) zu verzeichnen.

nach 3 Stunden Post-Reperfusionsbeginn stellte sich ein HZV-Wert von $2,15 \pm 0,22$ l/min bei ⁿLIM und von $2,05 \pm 0,18$ bei ⁺LIM ein.

Im Nachbeobachtungszeitpunkt von 48 Stunden sah man keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen ⁺LIM ($2,3 \pm 0,30$ l/min) und ⁿLIM ($2,3 \pm 0,23$ l/min) im Vergleich zum letzten gemessenen Zeitpunkt während der Reperfusionsphase zwei Tage zuvor.

Hingegen nach 72 h Beobachtung erreichte das HZV der ⁺LIM-Gruppe einen Wert von $3,1 \pm 0,24$ l/min. Dieser Wert war mit dem Ausgangswert von $3,1 \pm 0,12$ l/min vergleichbar. Diese Aussage ließ sich bei der ⁿLIM-Gruppe nicht wiederholen. ⁿLIM konnte einen Wert von lediglich $2,2 \pm 0,08$ l/min aufweisen, der weit entfernt von dem Ausgangswert von $3,0 \pm 0,13$ l/min lag (Witte 2010).

3.3.1.4 Gemischtvenöse Sauerstoffsättigung (SvO₂)

Der mittlere Ausgangswert vor Schockeinleitung für die SvO₂ betrug $82,9 \pm 2,69$ % bei ⁺LIM und $86,9 \pm 0,95$ % bei ⁿLIM (Tab. 2). Dieser Wert fiel im Verlauf der ersten 15 Minuten nach Blutungsbeginn schnell auf 62 ± 6 %. Am Ende der 60 minütigen Schockphase hielt sich die SvO₂ um $61,6 \pm 8$ %.

Mit Beginn der Reperfusion fing auch die SvO₂ in beiden Gruppen allmählich an zu steigen. 30 Minuten nach Beginn der Reperfusion und Einsatz des LIM- Systems stieg die SvO₂ auf Werte von $81,7 \pm 5,23$ % bei der ⁿLIM-Gruppe, und $78,8 \pm 10,1$ bei der ⁺LIM-Gruppe.

Im Verlauf bis 60 Minuten post-Reperfusionbeginn fiel die SvO₂ langsam auf Werte von $79,6 \pm 4,70$ % bei ⁿLIM und $76,4 \pm 11,30$ % bei ⁺LIM. Hier fällt die deutliche Standardabweichung der Werte in der ⁺LIM-Gruppe auf.

2 Stunden nach Reperfusionbeginn glich sich die SvO₂ beider Versuchsgruppen an ($81,78 \pm 6,04$ % bei der ⁿLIM-Gruppe und $80,9 \pm 7,45$ % bei der ⁺LIM-Gruppe).

Nach 3 Stunden ab Reperfusionbeginn zeigten sich in beiden Gruppen erneut leicht fallende SvO₂-Werte (ⁿLIM: $78,56 \pm 3,97$ %; ⁺LIM: $76,6 \pm 10,23$ %). Auffallend ist hier erneut die große Standardabweichung der Werte von ⁺LIM.

Im Verlauf der Nachbeobachtung zeigte die SvO₂ zum Zeitpunkt von 48 Stunden einen Wert von $56,0 \pm 2,47$ % bei der ⁿLIM-Gruppe und einen leicht höheren Wert von $57,7 \pm 6,44$ % bei der ⁺LIM-Gruppe. Diese Tendenz zeigte sich erst recht nach 72 Stunden mit einer gemessenen SvO₂ von $63,1 \pm 5,77$ % bei ⁺LIM und einen im Vergleich zum letzten Zeitpunkt dieser Gruppe niedrigeren SvO₂ Wert von $49,1 \pm 3,70$ % bei ⁿLIM (Witte 2010).

3.3.2 Laboranalysen

Während des gesamten Experiments wurden in prädefinierten Abständen mehrere Blutproben entnommen. Diese Entnahmen dienten der Erfassung von Werten wie Blutgase, Differentialblutbild, Elektrolyte, Entzündungsparameter, Leberwerte, Retentionsparameter und Gerinnungsparameter im Verlauf. Die Blutgasanalysen sowie die Differentialblutbilder wurden sofort nach Entnahme in der Tierversuchsanlage gemessen (ABL 700, Radiometer GmbH, Willich; VET-abc, scil animal care Company, Viernheim). Die restlichen Parameter wurden im Zentrallabor

3 Material und Methoden

der Universitätsklinik Düsseldorf sowie im eigenen unfallchirurgischen Labor gemessen.

3.3.2.1 Leukozytenzahl

Die Analyse der Leukozyten wurde im Verlauf des gesamten Experiments durchgeführt. Die Ausgangswerte der ⁿLIM und ⁺LIM-Gruppen waren vergleichbar (im Mittel $10,349 \pm 0,731 \times 10^3/\text{mm}^3$). Unmittelbar nach Schockbeginn fiel die Leukozytenzahl drastisch ab auf einen Wert von $6,821 \pm 0,55 \times 10^3/\text{mm}^3$. Nach 60 Minuten Entblutung, am Ende der Schockphase, stieg die mittlere Leukozytenzahl und betrug zu diesem Zeitpunkt $7,575 \pm 0,739 \times 10^3/\text{mm}^3$.

Dieser Trend lässt sich im kompletten Verlauf der Reperfusionphase verfolgen. Anzumerken bleibt jedoch, dass es bei der ⁺LIM-Gruppe zu einer erneuten Senkung der Leukozyten im Verlauf der Reperfusion kam, die 90 Minuten nach Einsatz des LIM-Systems ihren Höhepunkt erreichte, mit einem Wert von $5,758 \pm 0,736 \times 10^3/\text{mm}^3$ im Vergleich zu $7,860 \pm 0,70 \times 10^3/\text{mm}^3$ von ⁿLIM. Diese Tendenz blieb über die nächsten 30 Minuten bestehen, wo man trotz Steigerung der Leukozyten einen parallelen Verlauf der Kurven beobachten konnte (⁺LIM: $6,440 \pm 0,995 \times 10^3/\text{mm}^3$; ⁿLIM: $8,958 \pm 0,637 \times 10^3/\text{mm}^3$). Diese Beziehung blieb bis Ende der Reperfusionphase nach 3 Stunden bestehen, wo folgende Werte gemessen wurden: ⁺LIM: $8,608 \pm 1,062 \times 10^3/\text{mm}^3$; ⁿLIM: $10,170 \pm 1,081 \times 10^3/\text{mm}^3$.

Bei den Messungen nach 24 Stunden (ⁿLIM: $10.9 \pm 0.6 \times 10^3/\text{mm}^3$; LIM: $11.7 \pm 0.8 \times 10^3/\text{mm}^3$), 48 Stunden (ⁿLIM: 9.2 ± 0.6 vs. LIM: 9.7 ± 0.8), und 72 Stunden (ⁿLIM: 9.3 ± 1.0 ; LIM: 11.5 ± 1.5) haben keine erwähnenswerten Unterschiede bezüglich der Neutrophilenanzahl zwischen den Gruppen stattgefunden. Auch bei der Lymphozytenanzahl war kein Unterschied innerhalb der entsprechenden Zeitpunkte zu verzeichnen (Ott 2010).

Durch die vorhergehenden Absätze 3.3.1 bis einschließlich 3.3.2 wurde gezeigt, dass die Voraussetzungen, also das Herbeiführen eines adäquaten Schadens, zur Überprüfung der posthämorrhagischen Immunantwort gegeben sind.

3 Material und Methoden

3.3.3 Proteinisolierung und -Bestimmung

Die in einem 1,5 ml großen Eppendorf-Gefäß befindlichen Gewebeproben wurden in PBS, 1% Nonidet-P40 (NP40), 0.5 mM Natrium desoxycholat, 0.1 % Natrium dodecyl Sulfat (SDS) suspendiert, und mit dem Protease-Inhibitor Complete- mini (Roche, Mannheim) versehen. Danach wurden die Proben mit Hilfe eines Pistills mechanisch homogenisiert, zusätzlich über Eis sonifiziert (Ultraschall-Prozessor UP50H, Hielscher, Teltow) und bei 4°C für 15 Minuten inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben bei 8,000 × g für 10 Minuten und 4°C zentrifugiert. Die Proteinkonzentrationsbestimmung wurde mit dem Dc Protein Assay kit (Bio-Rad, München) laut Herstellerangaben ermittelt.

3.3.4 RNA-Isolierung

Aus den bei -80°C gelagerten Gewebeproben wurden ca. 50 mg Gewebe gewonnen und in 1 ml Trizol-Reagenz (Sigma, München) in 1,5 ml großen Eppendorf-Gefäßen unter Benutzung eines Pistills homogenisiert. Das Homogenat wurde anschließend fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um eine vollständige Dissoziation des Nukleoproteinkomplexes zu erreichen.

Danach wurde die Phasenseparation durch Zugabe von 200 µl Chloroform (Sigma, München) eingeleitet, die Proben dann mit Hilfe eines Vortexers 15 Sekunden lang geschüttelt und nochmals fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Es folgte eine Zentrifugation der Proben für 15 Minuten bei 11200 UPM und 4°C. Nach der Zentrifugation trennt sich das Probengemisch in eine untere rötliche Phase, die aus Phenol-Chloroform besteht, in eine Interphase und in eine obere farblose wässrige Phase. Die RNA befindet sich in der oberen Phase.

Diese Phase wurde vorsichtig abpipetiert und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Zur RNA-Ausfällung wurden 500 µl Isopropanol zugegeben, mit einem Vortexer homogenisiert, 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 10 Minuten bei 11200 UPM und 4°C zentrifugiert. Es entstand dabei ein RNA-Präzipitat am Boden des Reaktionsgefäßes.

Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und das RNA-Plättchen mit 1 ml 75 % Ethanol versetzt, geschüttelt und anschließend mit 8800 UPM und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Waschgang mit Ethanol wurde noch einmal wiederholt. Am Ende des Verfahrens ließ man das RNA-Plättchen einige Minuten lufttrocknen und löste es anschließend in 20 µl sterilem RNase-freiem Wasser

3 Material und Methoden

(DEPC treated water, Invitrogen). 2 µl der Lösung wurden zur Bestimmung der Konzentration entnommen.

Die RNA-Konzentration wurde mittels Spektralphotometrie bestimmt, wobei die Probe im Verhältnis 1:40 mit DEPC-behandeltem Wasser verdünnt und die Absorption bei 260 und 280 nm gemessen wurde.

Die Konzentration wurde gemäß folgender Gleichung errechnet:

$$c = OD_{260} \times f \times n \text{ [mg/dl]}$$

c = Konzentration

OD = optische Dichte

f = Verdünnungsfaktor

n = 40 mg/dl für RNA

Die Reinheit der präparierten RNA wurde über das Verhältnis OD_{260} zu OD_{280} ermittelt.

3 Material und Methoden

3.3.5 Polymerase-Kettenreaktion

Die Total-RNA vom Gewebe wurde wie unter 3.3.3 beschrieben isoliert. 10 µl (=1µg) dieser RNA wurden mit Hilfe einer reversen Transkriptase (Omniscript Reverse Transcriptase, Qiagen, Hilden) und unter Benutzung von oligo (dT) 15 primer (Sigma, München) laut Herstellerangaben in cDNA transkribiert. Die PCR (MyCycler, Biorad, München) wurde mittels Gen-spezifische Primer-Sequenzen über 26 Zyklen für HO-1 (pHO-1-R: 5'-CGTAGCGCTTGGTGGCCTGCG-3'; -F: 5'-CAGCCCAACAGCATGCCCCAG-3', Genosys-Sigma, Munich, Germany) und 27 Zyklen für HIF-1α (pHIF-1α-R: 5'-AGGGACTCTGGATTTGGTTC-3'; -F: 5'-TTTAGATTTGGCACAATGAC-3', Genosys-Sigma, München) durchgeführt. Primers für Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) (hGAPDH-R: 5'-GAAGTCAGAGGAGACCACCA-3'; -F: 5'-CACACCACATGGAGAAGGCTG-3', Genosys-Sigma, München) wurden zur Qualitätskontrolle der eingesetzten cDNA mit in die PCR eingeführt. 2.5 µl cDNA wurden unter Nutzung von Taq PCR Core Kit (Qiagen, Hilden) amplifiziert. Die Produkte wurden auf 1.8% Agarosegel aufgetragen und unter UV Licht nach Sybr Gold (Invitrogen, Karlsruhe) Färbung visualisiert (Geldokumentationseinheit Biorad, München) und verarbeitet (Quantity One Software, Biorad, München).

3.3.6 Western Blot

Je 30 µg Protein/Probe wurden mittels SDS Polyacrylamid Gel-Elektrophorese getrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen und mit Ponceau S Färbung versetzt, um die entstandenen Banden sichtbar zu machen.

Diese Membranen wurden dann für 60 Minuten bei Raumtemperatur zusammen mit TBS-Puffer inklusive 0.1 % Tween-20 und 5 % Milchpulver als blocking-Puffer inkubiert. Nachfolgend fand die Inkubation mit dem primären Antikörper in TBS mit 0.1 % Tween-20 und 5 % bovines Serum-Albumin statt. Die eingesetzten primären monoklonalen Antikörper gegen HO-1 und HIF-1α waren spezifisch gegen schweine-HO-1 (Stressgen, Victoria, Canada) und HIF-1α (Novus Biologicals, Littleton, USA). Nach drei Waschgängen in TBS + 0.1 % Tween-20 fand die Inkubation mit dem sekundären, diesmal polyklonalen Ziege anti-Maus Antikörper (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark), in einer Verdünnung von 1:1,000 in TBS + 0.1 % Tween-20 für 60 Minuten, und nachträglich ebenfalls drei Mal gewaschen. Schließlich wurden die entstandenen Banden mittels Chemilumineszenz visualisiert (SuperSignal West pico

3 Material und Methoden

Chemiluminescent Substrate, Pierce, Bonn, Germany). Nachträglich unterliefen die Membranen einem Stripping, d.h. einem Waschen der Membranen zur Lösung vom bereits vorhandenen Antikörper, um in einem nächsten Vorgang eine erneute Inkubation, diesmal mit einem polyklonalen Antikörper für Beta-Aktin (Santa Cruz, Heidelberg, Germany) zu ermöglichen. Die Menge des spezifischen Proteins wurde mittels Densitometrie quantifiziert (Quantity One, Bio-Rad, Munich, Germany).

3.3.7 TBARS-Assay

Die Messung von auf Thiobarbitursäure reaktive Substanzen (TBARS) ist eine etablierte und gut durchzuführende Methode zum Screening und Monitoring der Lipidperoxidation (Armstrong and Browne 1994; Yagi 1998). Lipidperoxide sind Abkömmlinge von mehrfach ungesättigten Fettsäuren. Diese sind instabil und degradieren zu verschiedenen komplexen Verbindungen, unter anderen die reaktiven Carbonylverbindungen wie das Malondialdehyd (MDA). Das MDA-TBA Addukt wird durch die Reaktion von MDA und TBA bei hohen Temperaturen (90-100°C) und saurem Milieu gebildet und wird kolorimetrisch bei 530-540 nm gemessen.

Das TBARS Assay Kit (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI) besteht aus 5 Gefäßen, die folgende Reagenzien beinhalten:

Thiobarbitursäure (TBA) – Farbreagenz

TBA Acetsäure - 1:4 verdünnt mit HPLC-Wasser für Farbreagenz

TBA Natriumhydroxid (10x) -1:10 verdünnt mit HPLC-Wasser für Farbreagenz

TBA Malondialdehyd (MDA) Standard

TBA SDS Lösung.

Das TBARS –Assay kann mit verschiedenen Probetypen versetzt werden, wie z.B. Serum, Plasma, Urin, Zell-Lysate und Gewebshomogenisaten. Im Rahmen dieser Studie wurden Gewebshomogenisate verwendet.

Ca. 25 mg bei -80°C gefrorenes Gewebe pro Probe wurden in 1.5ml Eppendorf-Gefäße überführt und mit 1ml RIPA Puffer, bestehend aus 1% NP-40 (Nonidet-P40, Biomol), 0,5g 0.5%iges Na-deoxycholat, 0.1% SDS (Sigma) ad 100ml PBS (Dublecco w/o Mg/Ca, Biochrom) mit Proteaseinhibitoren (Complete Mini, Roche) versetzt. Nachfolgend wurde die Mischung mittels Pistill homogenisiert und

3 Material und Methoden

anschließend mit Hilfe von Ultraschall (Ultrasonic processor UP50H, Hielscher) für 15 Sekunden auf Eis sonifiziert. Die Röhrchen kamen dann bei 1600 x g für 10 Minuten und 4°C in die Zentrifuge. Der Überstand des Zentrifugats wurde mittels Proteinkonzentrationsbestimmung (Dc Protein Assay, Biorad), auf 1mg Protein/ml Lösung standardisiert, und für das für das TBARS- Assay am selben Tag verwendet.

Alle Reagenzien, unter Ausschluss der Gewebeproben, wurden vor Assay-Beginn auf Raumtemperatur äquilibriert. Daraufhin verteilte man alle Proben und Standards nach vorgegebener Konzentration in Duplikat in eine 96-Loch-Platte.

Durchführung des TBARS-Assays

Alle 5 ml großen Proberöhrchen wurden nach Beschriftung mit 100 µl Gewebeprobe oder Standard versetzt. Hinzu kamen 100 µl SDS-Lösung und die Mischung wurde dann mit einem Vortexer homogenisiert. Anschließend fügte man 4 ml Farbreagenz in jedes Röhrchen.

Die fertigen Röhrchen unterliefen einer Wärmebehandlung von einer Stunde bei 100°C im Wasserbad. Nach der Wärmebehandlung stoppte man die Reaktion, indem man die behandelten Proben für 10 Minuten im Eisbad inkubierte. Nachträglich fand die erneute Zentrifugation bei 1600 x g und 4°C statt. 150µl aus jedem Röhrchen wurden dann in doppelter Ausführung in die 96-Loch-Platte hineinpipetiert. Abschließend maß man die Farbabsorption bei 530-540 nm kolorimetrisch (Victor 3, Perkin Elmer).

Die gemessenen Werte für MDA wurden für jede Probe nach Hersteller-Formel aus der Standardkurve berechnet. Der dynamische Messbereich des Assays beträgt 0-50 µM ($\mu\text{M} = \mu\text{mol/Liter} = \text{nmol/ml}$) MDA Äquivalenten.

3.3.8 Histologie

Alle untersuchten Tiere innerhalb der Studie sowie auch fünf gesunde Tiere, die ohne jegliche Therapie als Kontrollgruppe fungierten, wurden für die histologische Weiterverarbeitung euthanasiert. Die Gewebeproben wurden in 4% Formaldehyd fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Je 5 µm dicke Schnitte wurden mit Hämatoxylin-Eosin für die histopathologischen Untersuchungen gefärbt. Ergänzend wurde die Färbung mittels Chloracetatesterase durchgeführt, die als spezifische

3 Material und Methoden

Färbungsmethode für die Detektion und Quantifizierung der Gewebeeinfiltration durch neutrophile Granulozyten dient. Die neutrophilen Granulozyten wurden mit standardisierten Zählkammern mikroskopisch gezählt (Axiovert 40, Zeiss, Jena). Kurz darauf wurden unter Mikrometer-Einsatz (x10) die Neutrophilen in 10 verschiedenen Hochleistungsfeldern (engl. high power fields (HPF)) pro Schnitt gezählt. Durchschnittswerte pro Organ und Tier wurden entsprechend in prädefinierten Mengenbereichen eingeordnet (Zellen/0.09 mm² [0-5, 6-10, 11-20, 21-50, 51-100, 101-500]).

3.3.9 Statistik

Die statistische Analyse wurde mit Hilfe von SAS/Stat for Windows software (SAS Institute, Inc, Cary, NC, version 8) und SPSS (SPSS, Inc, Chicago, IL, version 15) berechnet. Die nicht-parametrische Varianzanalyse (ANOVA) der Rohdaten wurde durchgeführt, um spezifische Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen sowie auch im Zeitverlauf darzustellen. Die Daten wurden als signifikant eingestuft bei einem p-Wert von <0,05. Der Van der Waerden two-sample test fand seinen Einsatz bei der Bestimmung spezifischer Zwischengruppen-Unterschiede, und der Wilcoxon paired test für die Verlaufsbeurteilung (Zeitpunkt versus Ausgangspunkt). Alle Daten sind als Mittelwert +/- Standardfehler (SEM) dargestellt.

Für die Auswertung sowohl der Gen- und Proteinexpression von HIF-1 α und HO-1 als auch der MDA-Konzentrationsanalyse wurde der nicht gepaarte t-Test benutzt, ebenfalls mit einer statistischen Signifikanz ab p <0,05.

4. Ergebnisse

Im Folgenden werden die wichtigsten Ergebnisse zu den durch Hypoxie beeinflussbaren Größen Malondialdehyd, Hämoxygenase-1 und Hypoxie-induzierter Faktor 1 α dargelegt.

Die dargebotenen Ergebnisse zu MDA, HO-1 und HIF-1 α stellen den Schwerpunkt der hier vorliegenden Arbeit dar und wurden selbstständig im Labor der Klinik für Unfall- und Handchirurgie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf erarbeitet und ausgewertet.

4.1 Hypoxieanalysen im Gewebe

Diese Untersuchung basiert auf dem Vergleich beider Versuchsgruppen, ⁺LIM und ⁿLIM, und einem Bezug zu einer gesunden Kontrollgruppe (KG) unter Einsatz von Hypoxieanalysen im Gewebe nach Euthanasie der Versuchstiere nach 48 bzw. 72 Stunden.

Zur Untersuchung eines möglichen hypoxisch bedingten Schadens auf Gewebe-Ebene wurden drei durch Hypoxie beeinflussbare Größen herangezogen. Diese sollten einen Vergleich zwischen den zwei untersuchten Gruppen ⁺LIM und ⁿLIM ermöglichen bzw. dazu dienen, das Ausmaß einer hypoxischen Schädigung zu quantifizieren.

4.1.1 Hypoxie-Induzierter Faktor 1 α (HIF-1 α)

Die Expression des Hypoxie induzierten Faktor-1 α wurde auf Gen- und Proteinebene analysiert.

Bei der Genanalyse mittels Polymerase-Kettenreaktion untersuchte man die verschiedenen Gewebeproben auf eine erhöhte oder verminderte Expression von HIF-1 α nach 48 und 72 Stunden.

Die Proteinexpression wurde mittels Western Blot analysiert und die Gruppen ⁺LIM und ⁿLIM zu den gleichen Zeitpunkten wie bei der Genexpression miteinander verglichen.

4.1.1.1 Gen- und Proteinexpression nach 48 Stunden

Die Genanalyse von HIF-1 α bei den nach 48 Stunden entnommenen Organen (*Abb. 9-A*) ergab am deutlichsten in der Lunge eine erhöhte Genexpression von HIF-1 α und zwar bei der ⁿLIM-Gruppe mit einem Wert von $2,824 \pm 1,431$ [n=3]. Die ⁺LIM-

4 Ergebnisse

Gruppe hingegen zeigte eine relative Expression von $0,432 \pm 0,250$ [n=3]. In der Leber fand erneut bei ^nLIM die höchste Genexpression statt mit Werten von $1,136 \pm 0,490$ [n=3] gefolgt von der Kontrollgruppe mit $0,508 \pm 0,249$ [n=5]. An letzter Stelle befand sich die ^+LIM -Gruppe mit einem Wert von $0,143 \pm 0,009$ [n=3]. Im Herz war die gleiche Relation wie in Lunge und Leber zu beobachten mit Werten von $0,828 \pm 0,383$ [n=3] bei ^nLIM , $0,167 \pm 0,071$ [n=5] bei der Kontrollgruppe und einem Wert von $0,109 \pm 0,029$ [n=3] bei der ^+LIM -Gruppe. Bei der Auswertung der Expression in der Milz sieht man eng beieinander liegende Werte bei ^nLIM ($0,797 \pm 0,591$ [n=2]) und KG ($0,770 \pm 0,307$ [n=5]). Die niedrigste Expressionsrate ist in der ^+LIM -Gruppe zu finden ($0,204 \pm 0,084$ [n=3]). Beim Vergleich der Werte in der Niere steigt die Expression von HIF-1 α ebenfalls bei ^nLIM am deutlichsten mit einem Wert von $0,635 \pm 0,572$ [n=2]. Die Werte von ^+LIM und KG bleiben auf einem vergleichbar niedrigen Niveau.

Die einzige Ausnahme in der Tendenz bildet der Darm, bei dem im Gegensatz zu den anderen Organen dieser Reihe eine hohe Expressionsrate bei ^+LIM ($0,862 \pm 0,726$ [n=3]) festzustellen ist, während ^nLIM ($0,559 \pm 0,298$ [n=3]) und KG ($0,017 \pm 0$ [n=1]) darunter liegen.

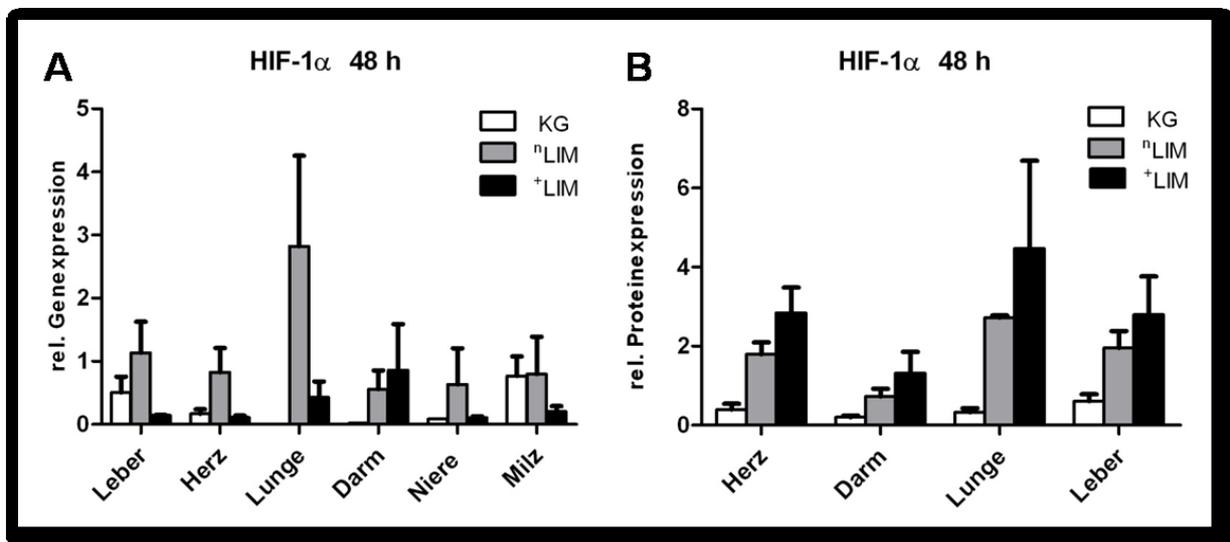


Abb. 9 Relative HIF-1 α Gen (A)- und Proteinexpression (B) nach 48 Stunden

Bei Auswertung der Ergebnisse der Proteinexpression nach 48 Stunden (Abb. 9-B) fällt eine Tendenz zu höheren Werten in den untersuchten Organen bei ^+LIM auf. Die Lunge ist erneut das Organ mit der höchsten relativen Genexpression (^+LIM : $4,471 \pm 2,221$ [n=3]; ^nLIM : $2,723 \pm 0,057$ [n=3]), diesmal gefolgt von Herz (^+LIM : $2,841 \pm$

4 Ergebnisse

0,640 [n=3]; ⁿLIM: 1,796 ± 0,302 [n=3]) und mit geringfügig niedrigerer Expression in der Leber (⁺LIM: 2,797 ± 0,967 [n=3]; ⁿLIM: 1,953 ± 0,432 [n=3]). Am wenigsten auffällig verhält sich hier der Darm mit Expressionswerten von 1,319 ± 0,537 [n=3] bei ⁺LIM und 1,953 ± 0,432 [n=3] bei ⁿLIM.

4.1.1.2 Gen- und Proteinexpression nach 72 Stunden

Beinahe antiproportional zu den Werten nach 48 Stunden verhalten sich die Ergebnisse bei der Genexpression nach 72 Stunden (Abb. 10-A). Die relative Genexpression ist in der Lunge bei ⁺LIM (3,792 ± 0,450 [n=3]) signifikant am höchsten [p=0,017], wobei ⁿLIM einen Wert von 0,753 ± 0,338 [n=2] aufweist. Auch in dieser Reihenfolge verhält sich die Genexpression in Leber (⁺LIM: 0,977 ± 0,521 [n=3]; KO: 0,508 ± 0,249 [n=5]; ⁿLIM: 0,330 ± 0,162 [n=3]), Niere (⁺LIM: 0,857 ± 0,466 [n=3]; ⁿLIM: 0,512 ± 0,221 [n=3]; KO: 0,087 ± 0 [n=1]), Milz (⁺LIM: 0,845 ± 0,511 [n=3]; KO: 0,770 ± 0,307 [n=5]; ⁿLIM: 0,523 ± 0,210 [n=3]) und Herz (⁺LIM: 0,664 ± 0,290 [n=3]; ⁿLIM: 0,449 ± 0,183 [n=3]; KO: 0,167 ± 0,071 [n=5]). Der Darm macht hier erneut die Ausnahme mit Werten von 2,702 ± 1,466 [n=2] bei ⁿLIM und 0,210 ± 0 [n=1] bei ⁺LIM.

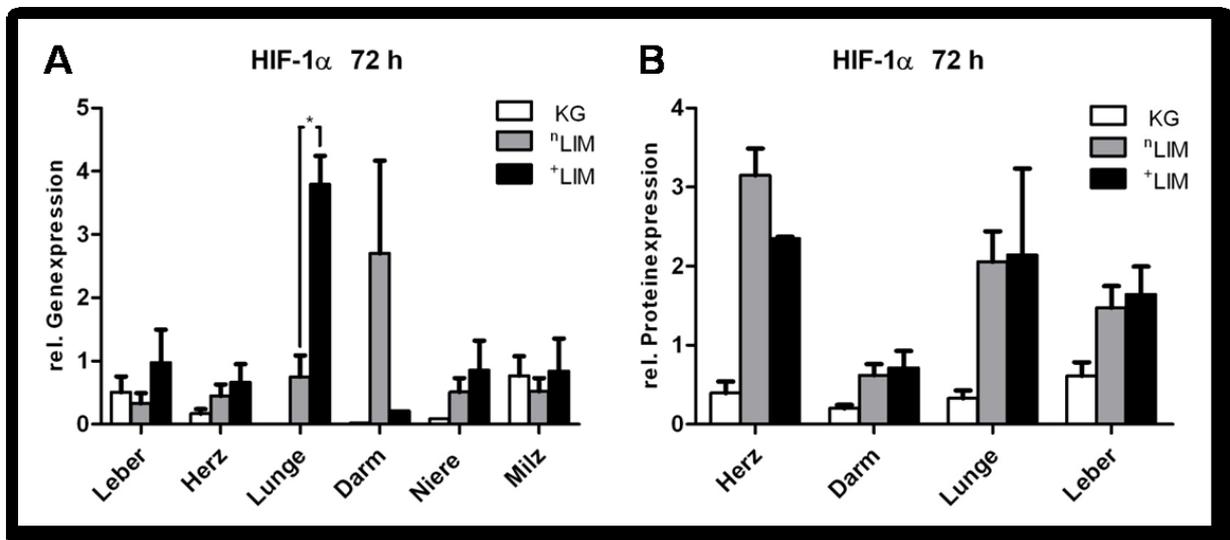


Abb. 10 Relative HIF-1α Gen (A)- und Proteinexpression (B) nach 72 Stunden (* = p<0,05)

Die Ergebnisse zur Proteinexpression nach 72 Stunden (Abb. 10-B) zeigen eine allmähliche Angleichung der Werte gegenüber den Messungen nach 48 Stunden. Allerdings wird die HIF-1α-Expression von ⁺LIM im Herz (2,347 ± 0,025 [n=3]) von ⁿLIM (3,148 ± 0,341 [n=3]) übertroffen. In der Lunge lassen sich vergleichbare Werte

4 Ergebnisse

messen (${}^{\dagger}\text{LIM}: 2,141 \pm 1,095$ [n=3]; ${}^{\text{n}}\text{LIM}: 2,055 \pm 0,387$ [n=3]) jedoch bei ${}^{\dagger}\text{LIM}$ mit einem außerordentlich großen Standardfehler. Die Leber zeigt annähernde Werte in beiden Gruppen mit einem geringfügigen Überwiegen der Expression bei ${}^{\dagger}\text{LIM}$ ($1,640 \pm 0,356$ [n=3]) verglichen mit ${}^{\text{n}}\text{LIM}$ ($1,476 \pm 0,271$ [n=3]). Der Darm weist erneut die niedrigste Proteinexpression aller untersuchten Organe auf (${}^{\dagger}\text{LIM}: 0,713 \pm 0,215$ [n=3]; ${}^{\text{n}}\text{LIM}: 0,623 \pm 0,141$ [n=3]).

4.1.2 Hämoxygenase-1 (HO-1)

Die Expression von Hämoxygenase-1 wurde, wie auch diejenige von HIF-1 α , auf Gen- und Proteinebene analysiert. Bei der Genanalyse mittels Polymerase-Kettenreaktion untersuchte man die verschiedenen Gewebeproben auf eine erhöhte oder verminderte Expression von HO-1 nach 48 und 72 Stunden.

Die Proteinexpression wurde mittels Western Blot analysiert und die Gruppen ${}^{\dagger}\text{LIM}$ und ${}^{\text{n}}\text{LIM}$ zu den gleichen Zeitpunkten wie bei der Genexpression miteinander verglichen.

4.1.2.1 Gen- und Proteinexpression nach 48 Stunden

Die relative HO-1 Genexpression nach 48 Stunden (*Abb. 11-A u. B*) war am größten in der Milz, mit dem höchsten Wert in der KG ($3,995 \pm 1,089$; n=5), gefolgt von ${}^{\text{n}}\text{LIM}$ ($3,714 \pm 3,174$; n=2) und zuletzt ${}^{\dagger}\text{LIM}$ ($1,077 \pm 0,286$; n=3). Danach folgte die Konzentration in der Lunge mit Werten von $3,574 \pm 1,732$ bei ${}^{\text{n}}\text{LIM}$ (n=3) und $0,486 \pm 0,107$ bei ${}^{\dagger}\text{LIM}$ (n=3). An dritter Stelle kam die Leber (KG: $1,075 \pm 0,373$ [n=5]; ${}^{\text{n}}\text{LIM}: 0,990 \pm 0,931$ [n=2]; ${}^{\dagger}\text{LIM}: 0,252 \pm 0,139$ [n=3]) gefolgt von Niere (${}^{\text{n}}\text{LIM}: 0,832 \pm 0,767$ [n=2]; KG: $0,440 \pm 0$ [n=1]; ${}^{\dagger}\text{LIM}: 0,213 \pm 0,007$ [n=3]), Darm (${}^{\text{n}}\text{LIM}: 0,787 \pm 0,336$ [n=3]; KG: $0,417 \pm 0$ [n=1]; ${}^{\dagger}\text{LIM}: 0,348 \pm 0,245$ [n=3]) und Herz (${}^{\text{n}}\text{LIM}: 0,833 \pm 0,447$ [n=3]; KG: $0,180 \pm 0,084$ [n=5]; ${}^{\dagger}\text{LIM}: 0,103 \pm 0,029$ [n=3]) mit vergleichbar niedriger Expression.

4 Ergebnisse

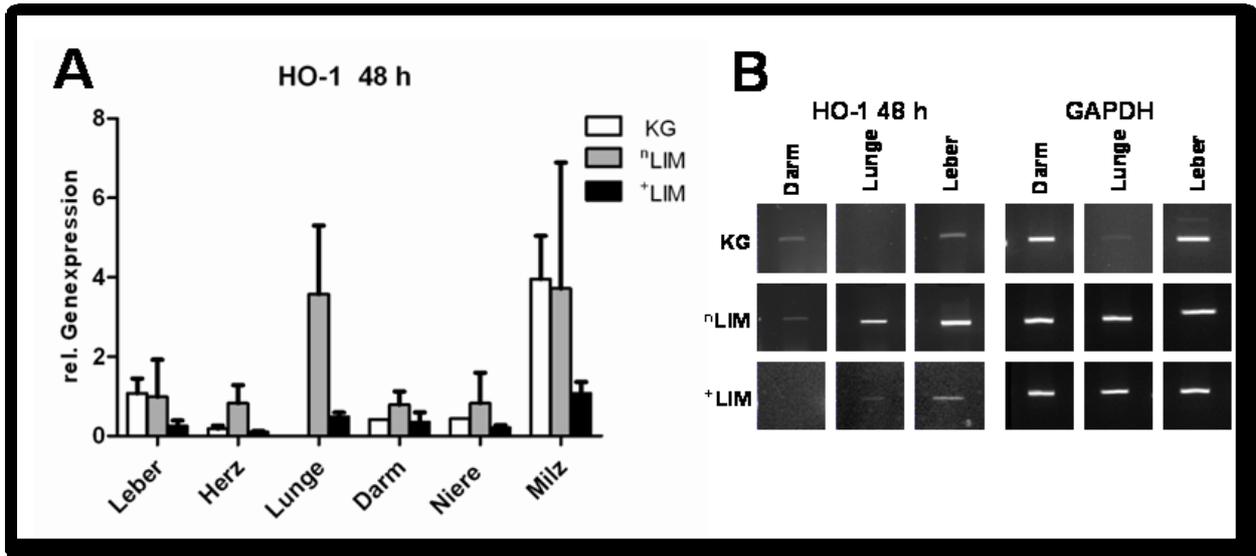


Abb. 11 Relative HO-1 Genexpression nach 48 Stunden. **A:** Diagramm; **B:** PCR

Zusammenfassend für diesen Zeitpunkt lässt sich festhalten, dass in der +LIM-Gruppe vor allem in der Lunge der Nachweis einer stark erniedrigten Hämooxygenase-1 Genexpression gegenüber der nLIM-Gruppe zu verzeichnen ist. Außerdem sind in Darm und Niere ähnliche, wenn auch weniger ausgeprägte Tendenzen zu beobachten. Allerdings sind einige Ergebnisse wegen der kleinen Gruppengrößen mit hohen Standardfehlern versehen.

Bei Betrachtung der relativen Proteinexpression nach 48 Stunden (*Abb. 12*) sieht man im Vergleich +LIM [n=3] zu nLIM [n=3] den größten Unterschied in der Lunge, wo die relative Proteinexpression von HO-1 bei +LIM den Höchstwert von $0,608 \pm 0,155$ und bei nLIM einen Wert von $0,231 \pm 0,070$ aufweist. Die Expression im Herz folgt mit einem höheren Wert bei nLIM von $0,358 \pm 0,023$, und +LIM mit $0,322 \pm 0,096$. In der Leber zeigen sich vergleichbare Werte, jedoch mit einem deutlicheren Unterschied zwischen nLIM ($0,326 \pm 0,036$) und +LIM ($0,197 \pm 0,033$). Die niedrigste Expressionsrate ist im Darm zu finden, wo +LIM ($0,203 \pm 0,056$) den geringfügig höheren Wert aufweist. Die nLIM-Expression beträgt hier $0,173 \pm 0,040$ und ist damit die niedrigste des gesamten Mess-Zeitpunktes.

4 Ergebnisse

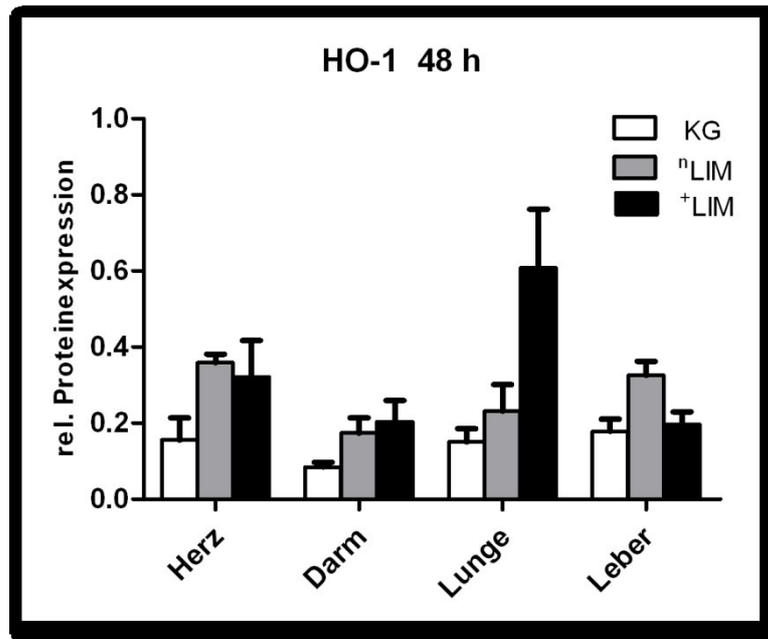


Abb. 12 Relative HO-1 Proteinexpression nach 48 Stunden

4.1.2.2 Gen- und Proteinexpression nach 72 Stunden

Die relative Genexpression von HO-1 nach 72 Stunden (Abb. 13) zeigt die höchsten Werte in der Milz (KG: $3,955 \pm 1,089$ [n=5]; ⁺LIM: $1,799 \pm 1,011$ [n=3]; ⁿLIM: $1,509 \pm 1,047$ [n=3]), gefolgt von Darm (ⁿLIM: $3,909 \pm 2,953$ [n=2]; KG: $0,417 \pm 0$ [n=1]; ⁺LIM: $0,191 \pm 0$ [n=1]) und Lunge (⁺LIM: $3,830 \pm 1,497$ [n=2]; ⁿLIM: $1,046 \pm 0,712$ [n=2]). Niedrigere Werte wurden in Niere (ⁿLIM: $1,668 \pm 0,804$ [n=3]; ⁺LIM: $0,813 \pm 0,564$ [n=3]; KG: $0,440 \pm 0$ [n=1]), Leber (ⁿLIM: $1,338 \pm 0,785$ [n=3]; ⁺LIM: $1,274 \pm 0,609$ [n=3]; KG: $1,075 \pm 0,373$ [n=5]) und Herz (⁺LIM: $0,596 \pm 0,238$ [n=3]; ⁿLIM: $0,445 \pm 0,194$ [n=3]; KG: $0,180 \pm 0,084$ [n=5]) festgestellt.

4 Ergebnisse

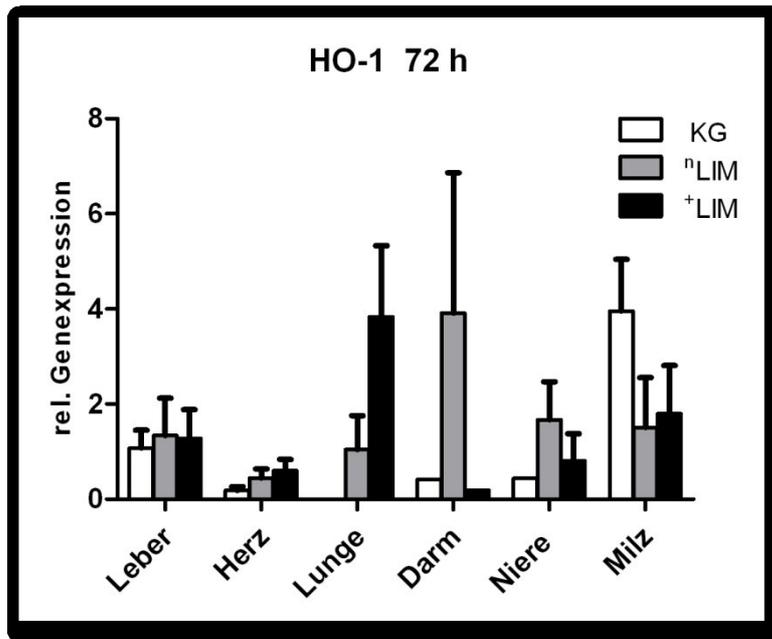


Abb. 13 Relative HO-1 Genexpression nach 72 Stunden

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Tendenz zur höheren HO-1 Genexpression im Darm aus Abb. 11-A bei der ⁿLIM-Gruppe in diesem Zeitraum noch stärker zum Vorschein tritt, ebenso in der Niere. Demgegenüber bleibt zu verzeichnen, dass es in der Lunge zu einer Umkehr der in Abb. 11-A dargestellten Verhältnisse mit erhöhten Werten bei ^tLIM kommt.

Bei Betrachtung der Proteinexpression nach 72 Stunden (*Abb. 14 A u. B*) fällt auf, dass die relative Proteinexpression von HO-1 bei ⁿLIM in allen gemessenen Organen durchweg die höhere Konzentration aufweist als die von ^tLIM. In der Lunge beginnend findet man eine relative Expression von $0,939 \pm 0,672$ [n=2] bei ⁿLIM und bei ^tLIM von $0,427 \pm 0,255$ [n=3]. Dahinter liegt das Herz mit Expressionswerten von $0,912 \pm 0,716$ [n=2] bei ⁿLIM und von $0,433 \pm 0,337$ [n=3] bei ^tLIM. Im Darm bleibt die Tendenz erhalten mit Werten von $0,696 \pm 0,451$ [n=3] bei ⁿLIM und von $0,237 \pm 0,232$ [n=3] bei ^tLIM. Als letztes und mit einer fast deckungsgleichen Proteinexpression erscheint die Leber mit einem Wert von $0,411 \pm 0,210$ [n=2] bei ⁿLIM und von $0,409 \pm 0,336$ [n=3] bei ^tLIM.

4 Ergebnisse

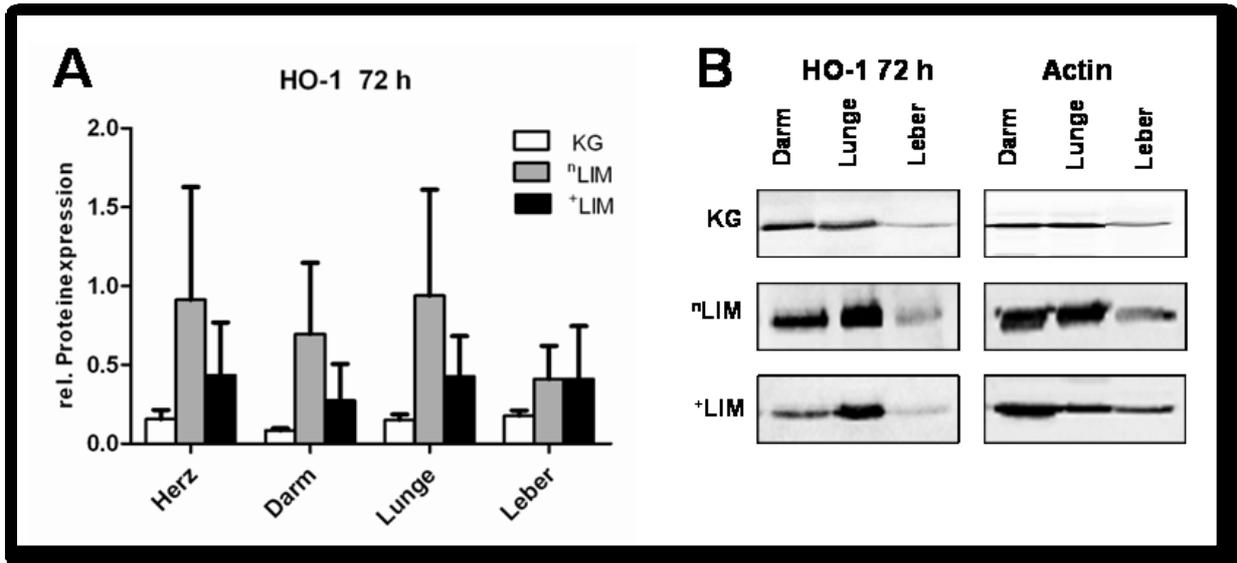


Abb. 14 Relative HO-1 Proteinexpression nach 72 Stunden. **A:** Diagramm; **B:** Western Blot

Bei Anblick der Ergebnisse der Genexpression von HO-1 nach 48 Stunden (Abb.11-A u. B) und Vergleich mit den Ergebnissen der Proteinexpression von HO-1 nach 72 Stunden (Abb.14-A u. B) kann man eine Korrelation der Werte im Verlauf beobachten. Diese zeigt, dass die Genexpression von HO-1 einen Höchstwert nach 48 Stunden und der Höchstwert für die Proteinexpression nach 72 Stunden erreicht wird. Diese Ähnlichkeiten sind vor allem in Darm, Lunge und Leber reproduzierbar und gelten sowohl für die ⁺LIM-Gruppe, als auch für die ⁿLIM-Gruppe. Diese Tendenz wird in den anderen untersuchten Organen nicht gefunden.

4.1.3 Lipidperoxidation (Malondialdehyd-Assay)

Die Analysen zur Lipidperoxidation wurden, wie bei den Messungen von Gen- und Proteinexpression von HIF-1 α und HO-1, nach 48 und 72 Stunden durchgeführt.

Die Malondialdehydkonzentration als Anzeichen für erhöhte Lipidperoxidation im Gewebe war in beiden Gruppen (⁺LIM-Gruppe, ⁿLIM-Gruppe) in allen untersuchten Geweben außer der Leber höher als die der Kontrollgruppe.

Bei Beobachtung der Werte nach 48 Stunden (Abb. 15) sieht man eine erhöhte Konzentration von MDA pro mg Protein im Darm der ⁿLIM-Gruppe (100 μ M), gefolgt von der ⁺LIM-Gruppe (67 μ M) und zuletzt die Kontrollgruppe (22 μ M). In der Lunge war der Unterschied zwischen ⁿLIM und ⁺LIM sehr gering (36 zu 38 μ M) mit einer erneut niedrigen MDA-Konzentration von 20 μ M in der Kontrollgruppe. In der Leber befand sich die niedrigste Konzentration aller Gewebe mit dem kleinsten

4 Ergebnisse

Konzentrationsunterschied zwischen den Gruppen (KG: 38 μM ; ^nLIM : 22 μM ; ^+LIM : 21 μM).

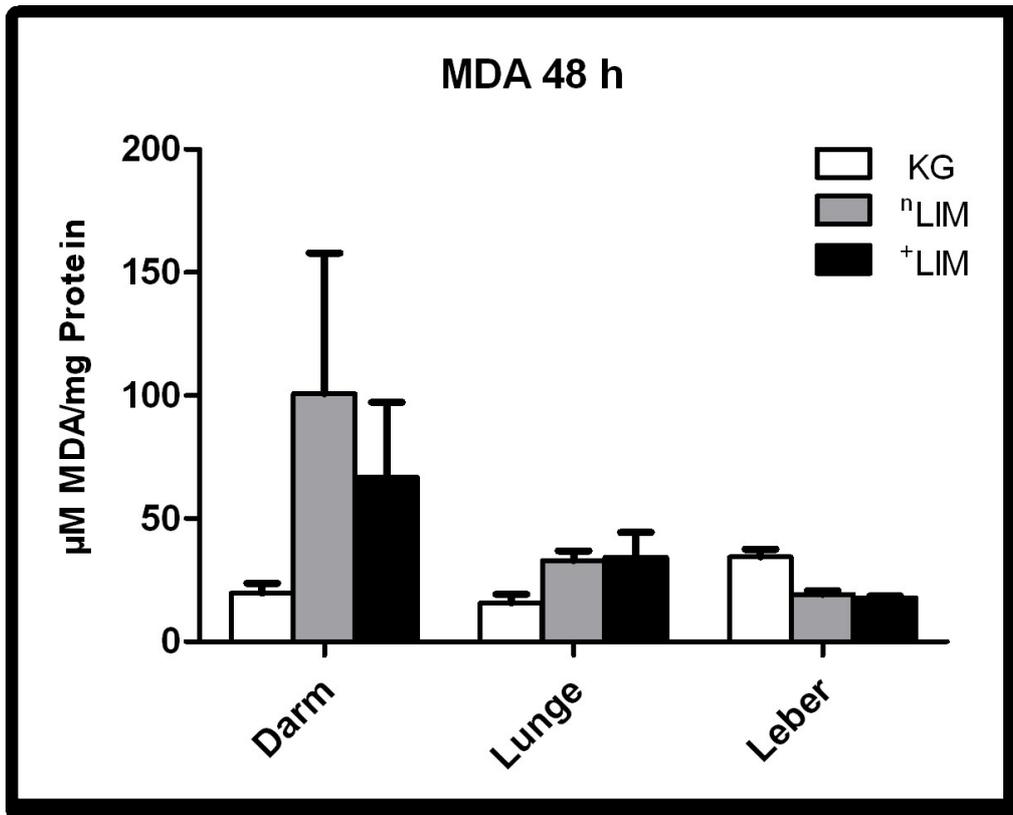


Abb. 15 Malondialdehyd (MDA)-Konzentration nach 48 Stunden

In der Analyse nach 72 Stunden erzielte die MDA-Konzentration im Darm der ^nLIM -Gruppe erneut den höchsten, diesmal signifikanten Wert von 144 μM [$p=0,0104$] (Abb. 16) im Vergleich zu ^+LIM . Die Werte von ^+LIM und KG waren deutlich niedriger (KG: 32 μM ; ^+LIM : 20 μM). Die Ergebnisse der MDA-Konzentration in der Lunge zeigten eine Erhöhung der Werte von ^+LIM und ^nLIM im Vergleich zu jenen nach 48 Stunden. Die Konzentration bei ^nLIM stieg auf 75 μM , wobei die ^+LIM -Konzentration einen Wert von 50 μM erreichte. Die Kontrollgruppe zeigte einen kaum veränderten Wert von 19 μM . Die Leber blieb bei Werten von 34 μM bei der Kontrollgruppe, 20 μM bei ^nLIM und 20,5 μM bei ^+LIM .

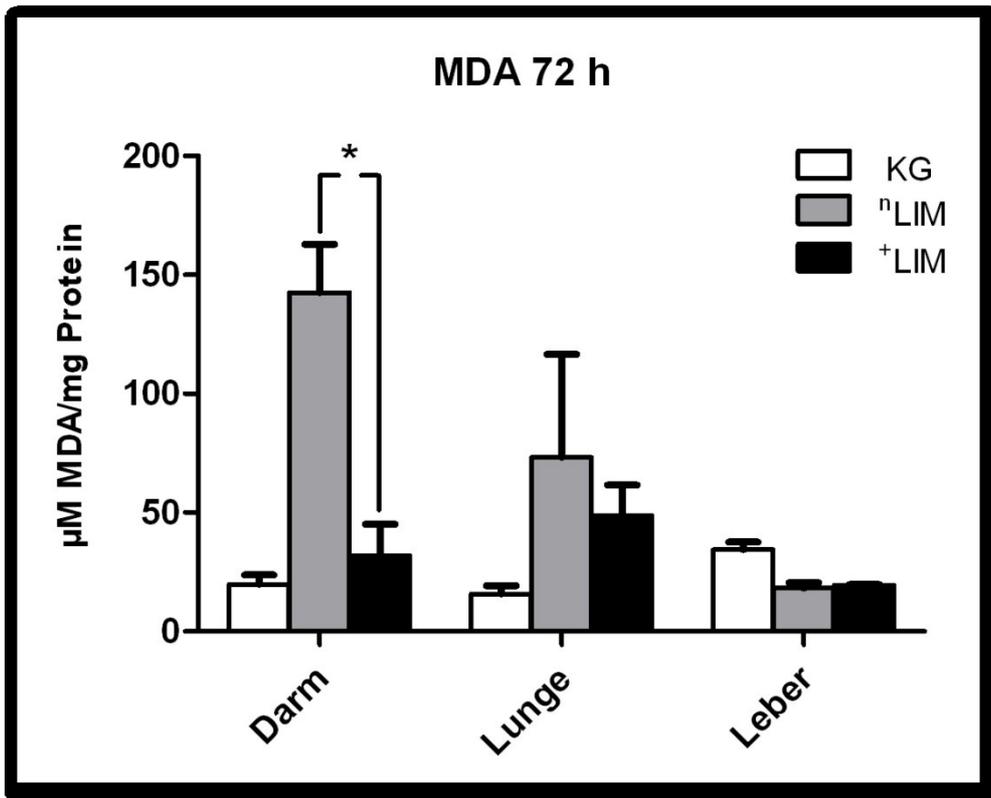


Abb. 16 Malondialdehyd (MDA)-Konzentration nach 72 Stunden (* = $p < 0,05$)

5. Diskussion

Die Hauptvoraussetzung für den Erfolg der Untersuchungen dieser Arbeit bestand in der Herbeiführung eines reproduzierbaren Schadens durch akuten Blutverlust mit nachfolgend ausreichender Stressreaktion im Schweinemodell.

In dem in dieser Arbeit etablierten Großtiermodell mit hämorrhagischem Schock konnte eine deutliche Stressreaktion mit gestörter Hämodynamik, Gewebeeinfiltration mit neutrophilen Granulozyten, Lipidperoxidation in Darm, Lunge und Leber über einen Beobachtungszeitraum bis 72 Stunden gezeigt werden.

Die schnelle unspezifische Hyperaktivierung des angeborenen Immunsystems nach einem schweren Trauma wird als ein wesentlicher Auslöser für schwere Folgeerscheinungen, wie etwa die Zerstörung der endothelialen oder epithelialen Integrität mit Mikrozirkulationsstörungen und Organversagen, angesehen (Weiss 1989; Brown, Brain et al. 2006; Lenz, Franklin et al. 2007; Scholz, Cinatl et al. 2007; van Meurs, Wulfert et al. 2008). Klinisch sind Darm, Nieren, Lungen, Leber und Herz betroffen (McCloskey, Kameneva et al. 2004; Sato, Tanaka et al. 2007; Toda, Takahashi et al. 2007; Zakaria el, Campbell et al. 2007). Neutrophile Granulozyten sind wichtige Effektorzellen des angeborenen unspezifischen Immunsystems. Die schnelle Aktivierung wird durch die Ausschüttung von 10^{11} Zellen pro Tag getrieben (Brown, Brain et al. 2006; Lenz, Franklin et al. 2007). Chemokine, die in geschädigten oder infizierten Geweben ausgeschüttet werden, locken zirkulierende neutrophile Granulozyten an (Bone 1996; Lomas, Chung et al. 2003; Maier, Lefering et al. 2007; van Meurs, Wulfert et al. 2008), worauf im Gewebe zusätzlich schädigende Faktoren, wie proinflammatorische Zytokine, Proteasen und Sauerstoffradikale ausgeschüttet werden bzw. entstehen (Bone 1996; Lenz, Franklin et al. 2007; Scholz, Cinatl et al. 2007). Eine gestörte Gegenregulation dieser neutrophilen Hyperaktivierung führt, vorangetrieben u.a. durch G-CSF u. GM-CSF, zur Verlängerung der Neutrophilen-Lebenszeit sowie Verweilzeit innerhalb des Gewebes (Keel and Trentz 2005), zur weiteren Zerstörung von zellulären Strukturen und der Extrazellulärmatrix und zu oxidativem Stress mit Lipidperoxidation (Kaminski, Bonda et al. 2002). Mechanismen, die zu einer verlängerten Lebenszeit der Neutrophilen führt, sind verschiedene Faktoren, die den programmierten Zelltod der Neutrophilen verhindern oder verzögern. Beispiele dafür sind die Inhibitoren von Apoptoseproteine (IAPs), Granulozyten/Makrophagen kolonienstimulierende

5 Diskussion

Faktoren (GM-CSF) und Granulozyten kolonienstimulierende Faktoren (G-CSF) (Lee, Whyte et al. 1993).

In einer eigenen Studie konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass Traumapatienten sehr hohe Konzentrationen von GM-CSF im Serum aufweisen. Ein Zusammenhang zwischen GM-CSF mit einer Apoptoresistenz wurde bereits beschrieben (Watson, Rotstein et al. 1997; Watson, Rotstein et al. 1997; Ertel, Keel et al. 1998). Tatsächlich fanden wir eine erhöhte anti-apoptotische MCL-Genexpression und Proteinexpression in frisch isolierten Neutrophilen aus Patienten mit schwerem Trauma (Paunel-Gorgulu, Zornig et al. 2009). Die Arbeitshypothese unserer Forschungsgruppe war daher, therapeutische Strategien zu entwickeln, die eine Apoptose-Resistenz und somit die Entstehung Neutrophilen-vermittelter Organschädigungen in der frühen posttraumatischen Phase überwinden.

5.1 Das Fas/FasL-System als Zielobjekt bei hämorrhagischem Schock/Reperfusion

Das Fas/FasL (CD95/CD95L)-System ist möglicherweise das wichtigste physiologische System zur Gegenregulation der Neutrophilen-Hyperaktivität. Darüber hinaus spielt Fas/FasL offenbar auch eine bedeutende Rolle bei der Steuerung wichtiger Effektorfunktionen (Cinatl, Blaheta et al. 2000; Peter, Budd et al. 2007). Wir konnten beispielsweise kürzlich zeigen, dass membrangebundenes anti-Fas IgM adhätierende Neutrophile in wenigen Minuten inaktivierte. Die chemotaktische Aktivität, die transepitheliale Migration und die Zellmotilität waren nahezu blockiert (Scholz and Cinatl 2005). Dies führte zu der Idee, dass immobilisiertes agonistisches Fas für therapeutische Zwecke in extrakorporalen Immuntherapie-Systemen eingesetzt werden könnte.

Die Machbarkeit solcher Systeme, bei denen ein agonistischer anti-Fas IgM-Antikörper auf einer biokompatiblen Polyurethan-Oberfläche kovalent gebunden wird, wurde bereits bei herzchirurgischen Patienten, in experimentellen Tierversuchen und auch in klinischen Studien gezeigt. Zudem ist ein Verfahren mit Verwendung immobilisierter biofunktioneller Effektormoleküle zur extrakorporalen Behandlung des Patienten-Blutes wesentlich ungefährlicher als eine systemische Applikation z.B mit therapeutischen Antikörpern. Experimentell konnte bereits gezeigt werden, dass

systemisch appliziertes anti-Fas zu Leberschädigungen und zu Lungenfibrose führt (Ogasawara, Watanabe-Fukunaga et al. 1993; Hagimoto, Kuwano et al. 1997).

Um nun die Effekte einer extrakorporalen Immuntherapie auf der Basis von anti-Fas-IgM auf die Limitierung von posthämorrhagischen Immunstörungen zu untersuchen, wurde ein künstlicher Kreislauf, bestehend aus einem Sheldon-Katheter, einem Schlauchsystem, einer Pumpe und einer funktionellen Einheit, für den Einsatz bei Großtieren entwickelt. Die funktionelle Einheit wurde von unserer Forschungsgruppe mitentwickelt und wird als Leukozyten-Inhibitions-Modul (LIM) bezeichnet.

5.2 Einstellung und Etablierung eines hämorrhagischen Schockmodells im Schwein

Die Etablierung des Schockmodells im Schwein wurde im Rahmen dieser Dissertationsarbeit durchgeführt. Das Modell wurde so gewählt, dass eine Absenkung des MAP auf 35 ± 5 mmHg über 45 Minuten standardisiert eingestellt wurde. Eine erhöhte Herzfrequenz war ein Maß für die physiologische Gegensteuerung des Tieres. Fünf gesunde Tiere dienten als Kontrolltiere zur Bestimmung der Normalwerte und der normalen Histologie. Im Rahmen der Studie wurde eine „Standard medical care“ (SMC) bzw. ⁰LIM-Therapiegruppe mit einer ⁺LIM-Therapiegruppe verglichen.

Der den Schweinen zugefügte hämorrhagische Schaden hatte eine deutliche Beeinflussung der Hämodynamik als Folge (Witte 2010), mit schocktypischen Veränderungen in Herzfrequenz, mittlerem arteriellen Blutdruck und Herzzeitvolumen (Allgower and Burri 1968; Birkhahn, Gaeta et al. 2005) (Falk, O'Brien et al. 1992).

Die schockspezifischen Laborveränderungen konnten teilweise repräsentiert werden. So wurde ein deutlicher Anstieg der Leukozyten festgestellt. Man setzte auf diese Erkenntnis basierend besonderes Augenmerk auf die Neutrophilen- und Lymphozytenfraktion der Leukozyten (Ott 2010). Die neutrophilen Granulozyten zeigten ein sehr ähnliches Verhalten im Verlauf wie das der Leukozyten, wohingegen der Kurvenverlauf der Lymphozyten flach und nicht ansteigend war. Dies gilt als Beweis, dass die neutrophilen Granulozyten durch Ischämie/Reperfusion isoliert stimuliert wurden.

5 Diskussion

Zu diskutieren bleibt aber der in diesem Modell ausgebliebene Anstieg des Lactatwertes als Zeichen eines hohen anaeroben Stoffwechsels und Indikator für eine erhöhte Morbidität und Mortalität nach Trauma (Nguyen, Loomba et al.; Nguyen, Rivers et al. 2004; Mikkelsen, Miltiades et al. 2009). Vergangene Studien konnten u.a. den Lactatwert als Richtwert für die Magnitude eines hämorrhagischen Schocks am Schwein verwenden (Rixen, Raum et al. 2001). Noch bleibt zu klären, aus welchem Grund es im Rahmen unseres Schockmodells isoliert nicht zu einem Anstieg von Lactat, jedoch zu einer relativen metabolischen Azidose kam. Dies kann als Ausdruck eines nicht ausreichenden hämorrhagischen Schocks gewertet werden. Eine andere Möglichkeit für die Diskrepanz der Lactatwerte kann die für unsere Studie gewählte Schweinerasse darstellen. Es liegen bislang noch keine vergleichenden Studien über hämorrhagischem Schock am Münchner Minischwein vor.

5.3 Überprüfung der posthämorrhagischen Immunantwort anhand inflammatorisch/hypoxischer Parameter

Ziel der Überprüfung der hämorrhagischen Immunantwort war, anhand von drei Größen die Unterschiede bezüglich posthämorrhagischer Organschädigung/Hypoxieausprägung von ⁿLIM und ^tLIM zu untersuchen. Wie oben bereits erwähnt, dienten dafür die Lipidperoxidation im Gewebe und die Expression von Hämoxigenase-1 (HO-1) und Hypoxie-induzierter Faktor 1 α (HIF-1 α).

Die durchgeführten Untersuchungen zur Lipidperoxidation im Gewebe ergaben einen Unterschied zwischen den Gruppen ⁿLIM und ^tLIM, mit einer messbar verminderten Lipidperoxidation im Gewebe der ^tLIM-Gruppe als Zeichen für einen niedrigeren oxidativen Stress nach Hypoxie/Reperfusion. Dieser Unterschied zeigte die größte Ausprägung im Darm, vor Lunge und Leber. Dies kann dadurch erklärt werden, dass der Darm bei Hypoxie/Reperfusion als sehr anfälliges Organ reagiert, mit einer deutlichen Empfindlichkeit gegenüber Hypoxiezuständen. Pathophysiologisch kann folgendes postuliert werden: Eine erhöhte Lipidperoxidation im Darm führt zur Ansammlung freier Radikale (Green and Reed 1998), Schädigung von Lipidmembranen und Inhibierung metabolischer Prozesse in der Zelle (Nigam and Schewe 2000). Als Folge dessen entsteht eine Permeabilitätsstörung auf zellulärer Ebene, die ihrerseits die bekannten Schockfolgen im Darm hervorrufen können. Dazu zählen unter anderem die postischämische Darmnekrose, die ischämische

5 Diskussion

Kolitis und schließlich die Sepsis aufgrund einer Durchwanderung von pathogenen Erregern durch die vorgeschädigte Darmwand.

Die Untersuchungen zur relativen Expression von HO-1 ergaben eine verminderte Gen- und Proteinexpression insbesondere im Darm der ⁺LIM-Versuchsgruppe. Dies kann als negative Folge des Einsatzes von LIM gewertet werden, da wie bereits oben erwähnt, die Hämoxxygenase einen protektiven Effekt bei Ischämie/Reperfusion darstellt. Eine alternative Interpretation ist, dass von einer reaktiven HO-1 Expression proportional zu einem Ischämie/Reperfusionsschaden ausgegangen wird. Ist diese als Maß für eine mögliche Organschädigung definiert, bedeutet der Umkehrschluss, dass bei der ⁺LIM-Gruppe ein geringerer Organschaden stattgefunden hat. Im Gegensatz dazu war die Lungen-HO-1 Expression bei der ⁺LIM-Gruppe höher als die der ⁻LIM-Gruppe. Als Ursache dafür könnte eine gewisse Schädigung des Lungengewebes durch den Einsatz von LIM zugrunde liegen. Dies konnte allerdings histopathologisch nicht bestätigt werden (Ott 2010).

Ein weiteres erwähnenswertes Ergebnis stellt die Korrelation von relativer Gen- und Proteinexpression von HO-1 dar. Die Ergebnisse zur Genexpression nach 48 Stunden korrelierten im Darm, Herz und Lunge mit den Proteinexpressionswerten nach 72 Stunden Beobachtungszeit. Dies kann als Zeitfenster von ca. 24 Stunden zwischen Genexpression und Proteinexpression im Bezug auf einen hypoxischen Stimulus gewertet werden. Allerdings konnten diese Ergebnisse nicht in allen untersuchten Organen reproduziert werden. Die entsprechend durchgeführte Analyse der Ergebnisse bei der Expression von HIF-1 α zeigte ebenfalls keinerlei Korrelation zu den Ergebnissen von HO-1, sodass diese Annahme möglicherweise einen Zufall darstellen kann.

Bei Betrachtung der Gen- und Proteinexpressionsergebnisse von HIF-1 α konnten weder statistisch signifikante Ergebnisse noch richtungsweisende Tendenzen interpretiert werden. Eine Auffälligkeit beschreibt die relative Genexpression von HIF-1 α nach 72 Stunden im Vergleich zu 48 Stunden. Der Darm bot als einziges Organ einen antiproportionalen Verlauf der Genexpression von ⁺LIM im Vergleich zu ⁻LIM: Zunächst kam es nach 48 Stunden zu einer höheren HIF-1 α Genexpression im Darm, entgegen der Expression in allen anderen Organen. Nach 72 Stunden zeigte der Darm hingegen als einziges Organ eine geringere HIF-1 α Genexpression. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung könnte mit dem zugrundeliegenden höheren Zellumsatz im Darm zusammenhängen.

5 Diskussion

Die Interaktionen zwischen den Regulationsmechanismen von HO-1 und insbesondere von HIF-1 α sollten aufgrund ihrer Komplexität in Folgestudien näher untersucht werden.

5.4 Testung der LIM-Effektivität und Unbedenklichkeit

Hauptvoraussetzung für den Einsatz von LIM am Menschen ist zum einen eine Mortalitätssenkung im Vergleich zu den herkömmlichen Therapieverfahren und zum anderen ein möglichst geringes Risiko an Nebenwirkungen und Komplikationen.

Die untersuchten Parameter zur Hämodynamik zeigten eine tendenzielle Besserung bei der ⁺LIM-Gruppe, insbesondere bezüglich des mittleren arteriellen Drucks. Bei Betrachtung der Gesamtergebnisse von MAP konnte man gruppenspezifisch einen Wert von 61 % bei der ⁿLIM-Gruppe und 71,5 % bei der ⁺LIM-Gruppe zum zuletzt gemessenen Zeitpunkt im Vergleich zum Ausgangs-MAP feststellen (Witte 2010). Dieses Ergebnis kann als Fundament für eine bessere postischämische hämodynamische Antwort nach LIM-Therapie gedeutet werden.

Eine Erklärung für die verminderte Organschädigung durch die transiente Therapie mit LIM ist die bereits früher nachgewiesene Hemmung der Neutrophilen-Motilität. Dies könnte eine Inhibition der Fähigkeit der Neutrophilen in Gewebe zu migrieren bzw. auf chemotaktische Reize zu reagieren zur Folge haben.

Histopathologische Analysen von post-hämorrhagischen Organen der ⁺LIM-Gruppe zeigten geringere Zahlen infiltrierter Neutrophilen in verschiedenen Organen im Vergleich zur SMC-Gruppe (Abb.17), aber insbesondere in der Lunge (Ott 2010). Dies war zum Teil in Einklang mit einer verbesserten Organfunktion zu sehen.

5 Diskussion

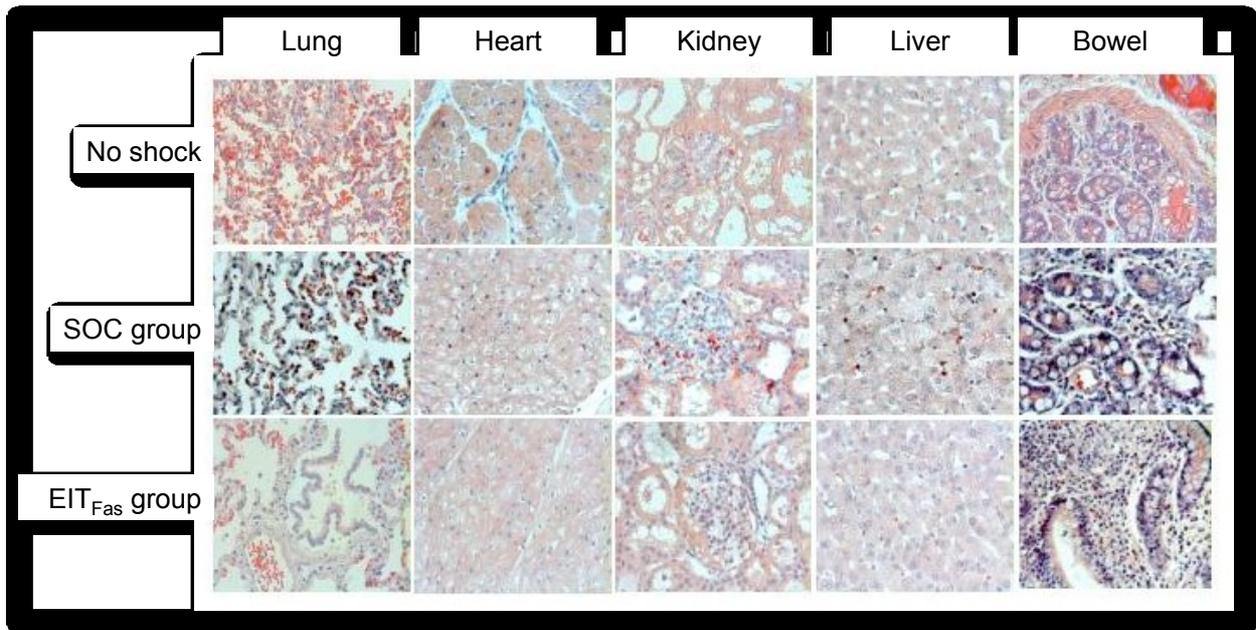


Abb. 17 Chloroacetat-Esterase Färbung der Paraffinschnitte aus Lunge, Herz, Niere, Leber und Darm bei der Kontrollgruppe, ⁿLIM und ⁺LIM (Lögters 2010)

Die Hämoxygenase-Aktivität konnte durch den Einsatz von LIM verringert werden, was als tendenzielle Reduktion des postischämischen Schadens zu werten ist.

In Bezug auf die Unbedenklichkeit von LIM galt als Herausforderung an die Herstellung der funktionellen Einheit des LIM, die kovalent gebundenen Antikörper resistent gegen Sterilisation zu machen. Dies gelang mit Hilfe einer speziellen Beschichtung auf dem Polyurethanschaum. Andererseits durften sich die gebundenen anti-Fas IgM Antikörper von der Polyurethanmembran nicht lösen, in die Blutbahn gelangen und dabei potentiell systemische Schädigungen hervorrufen. Inwiefern es durch die funktionelle Einheit von LIM zu einem Anstieg von HO-1 im Lungengewebe kommen konnte, war histopathologisch nicht nachzuvollziehen. Einen Anhalt für eine signifikante Gefahr von LIM konnte im Rahmen dieser Studie nicht gefunden werden.

Ein entscheidendes Ergebnis dieser Arbeit ist, dass die Lipidperoxidation, also die oxidativ bedingte Schädigung der Zellmembranen im Gewebe, in der ⁺LIM-Gruppe weniger ausgeprägt war als in der ⁿLIM-Gruppe. Interessanterweise war die Lipidperoxidation im Darm besonders stark. Dies entspricht der klinischen Situation, bei der die Durchblutung des Darms von Patienten nach schwerem Trauma schwerwiegend gestört ist. Eine Dysfunktion bzw. Perforation der Darmwand führt wiederum zur Dissemination von pathogenen Erregern. In Folge davon ist das Risiko

5 Diskussion

zur Erlangung einer Sepsis stark erhöht. Es bleibt daraufhin kritisch zu hinterfragen bzw. untersuchen, inwiefern der LIM-Einsatz ein erhöhtes Risiko für die Entstehung eines septischen Geschehens darstellt. Allerdings waren histologisch in den Darmschnitten relativ wenige Neutrophile detektiert worden (Ott 2010). Ob die schädigenden Granulozyten innerhalb des Darmgewebes möglicherweise schneller umgesetzt werden, also schneller von phagozytierenden Zellen abgeräumt werden, oder in Netose gehen, ist unklar.

Netose, ein neues Paradigma zur Rolle der aktivierten Neutrophilen, die durch Auswerfen ihrer DNA bakterielle Keime abfangen, könnte auch eine pathophysiologische Rolle in geschädigten Organen spielen, da die ausgeworfene DNA bzw. die Netze proinflammatorische Zytokine und Effektormoleküle beinhalten. Diese könnten auch nach Verschwinden der Neutrophilen-Hülle schädigend wirken.

Die Resultate aus dieser Arbeit unterstreichen die Wertigkeit einer extrakorporalen Immuntherapie auf der Basis immobilisierter anti-Fas-Antikörper. Der Einsatz eines solchen künstlichen Kreislaufs kann vermutlich nur auf Intensivstationen stattfinden. Prospektive Analysen zum möglichen Einsatz des LIM bei Patienten auf der Intensivstation werden derzeit durchgeführt. Fokus ist dabei, den besten Zeitpunkt eines LIM-Einsatzes zu definieren. Patienten, die länger als zwei Tage auf der Intensivstation sind und eine Indikation zur Hämodialyse haben, sollen in erster Linie als Studienkohorte angesehen werden. Das LIM könnte in die bestehenden Schlauchsysteme der Hämodialyse-Apparate integriert werden. Allerdings wird die Hemmung von Neutrophilen bislang auch kontrovers diskutiert. So könnte bei einer Kontamination mit pathogenen Keimen die anti-bakterielle Aktivität der Neutrophilen gehemmt werden, so dass das Risiko einer Sepsisentstehung möglicherweise erhöht ist. Der Vorteil einer LIM-Behandlung wäre andererseits die Prävention der inflammatorisch bedingten Zerstörung von Darmepithelien und somit der Ansiedlung von Pathogenen im Gewebe - ein wesentlicher Aspekt bei der Entstehung von Sepsis.

Die präsentierten Ergebnisse im Rahmen dieser Studie dienen hauptsächlich als Hinweis für eine erfolgversprechende Therapiemöglichkeit bei postischämischer Inflammation im Rahmen eines hämorrhagischen Geschehens. Weiterhin bildet diese Studie eine Basis für weiterführende Forschungsvorhaben, die sich mit dem

5 Diskussion

Thema LIM beschäftigen. Darunter seien die Schwerpunkte Polytrauma und Sepsis genannt.

Es bleibt künftig anhand von Folgestudien zu belegen, wie die optimale Anwendung des LIM den hier angedeuteten Therapieerfolg untermauern kann.

6. Zusammenfassung

Ein hämorrhagischer Schock ist eng mit einer aberranten Neutrophilenfunktion und daraus resultierender Organdysfunktion bzw. Organversagen assoziiert. Diese experimentelle Studie am Schweinemodell wurde durchgeführt, um die Auswirkungen einer extrakorporalen Immuntherapie mittels Leukozyten Inhibitions Modul (LIM) auf Hämodynamik, Neutrophilenmigration ins Gewebe und Gewebeschädigung durch diese Zellen bei hämorrhagischem Schock/Reperfusion zu prüfen.

Im Rahmen dieser prospektiven kontrollierten zweiarmigen Studie in der Tierversuchsanlage und im Labor wurde ein Tiermodell an 24 Münchner Mini Pigs (30.3 ± 3.3 kg) etabliert. Die Schweine wurden in einen hämorrhagischen Schock versetzt, für 45 Minuten in diesem Zustand erhalten und nachträglich mit kristalloider Lösung bis zum Erreichen des Ausgangs-Blutdruckes reperfundiert. Mit Anfang der Reperfusionphase leitete man bei 12 Schweinen die extrakorporale Immuntherapie ($^+$ LIM) für 3 Stunden ein. Weitere 12 Schweine wurden ausschließlich reperfundiert und als „standard medical care“ (0 LIM) definiert. Verschiedene Parameter wurden während des gesamten Experiments gemessen. Die Schweine wurden 48 bzw. 72 Stunden nach Schock/Reperfusion euthanasiert. Aus den Organproben wurden die Expressionen von HIF-1 α , HO-1 bestimmt und die Lipidperoxidation im Gewebe anhand von Malondialdehyd (MDA) gemessen.

In der $^+$ LIM Gruppe sank die Neutrophilenanzahl signifikant im Blut, verglichen mit der 0 LIM-Gruppe. Die hämodynamischen Parameter nach 72 Stunden waren ebenfalls in der $^+$ LIM-Gruppe besser. Histologische Analysen zeigten eine durch LIM vermittelte Reduktion der Schock-assoziierten Neutrophileninfiltration im Gewebe sowie auch eine niedrigere Lipidperoxidation und Hämoxxygenase-1 (HO-1) Induktion in verschiedenen Organen als Anzeichen für eine reduzierte Gewebeschädigung.

Die Fas-vermittelte extrakorporale Immuntherapie bietet während der frühen posthämorrhagischen oder posttraumatischen Phase eine innovative Möglichkeit zur Eindämmung der Gewebeeinfiltration und -schädigung durch neutrophile Granulozyten. Es bedürfen dennoch weiterführende Untersuchungen zur Optimierung des klinischen Einsatzes.

7. Referenzen

- Abdel-Rahman, U., S. Margraf, et al. (2007). "Inhibition of neutrophil activity improves cardiac function after cardiopulmonary bypass." J Inflamm (Lond) **4**: 21.
- Allgower, M. and C. Burri (1968). "Shock-index." Ger Med Mon **13**(1): 14-9.
- Amon, M., M. D. Menger, et al. (2003). "Heme oxygenase and nitric oxide synthase mediate cooling-associated protection against TNF-alpha-induced microcirculatory dysfunction and apoptotic cell death." Faseb J **17**(2): 175-85.
- Armstrong, D. and R. Browne (1994). "The analysis of free radicals, lipid peroxides, antioxidant enzymes and compounds related to oxidative stress as applied to the clinical chemistry laboratory." Adv Exp Med Biol **366**: 43-58.
- Balla, G., G. M. Vercellotti, et al. (1991). "Exposure of endothelial cells to free heme potentiates damage mediated by granulocytes and toxic oxygen species." Lab Invest **64**(5): 648-55.
- Baue, A. E. (1975). "Multiple, progressive, or sequential systems failure. A syndrome of the 1970s." Arch Surg **110**(7): 779-81.
- Baue, A. E., R. Durham, et al. (1998). "Systemic inflammatory response syndrome (SIRS), multiple organ dysfunction syndrome (MODS), multiple organ failure (MOF): are we winning the battle?" Shock **10**(2): 79-89.
- Bauer, M. and I. Bauer (2002). "Heme oxygenase-1: redox regulation and role in the hepatic response to oxidative stress." Antioxid Redox Signal **4**(5): 749-58.
- Bergentz, S. E., A. Carlsten, et al. (1969). ""Hidden Acidosis" in Experimental Shock." Ann Surg **169**(2): 227-232.
- Beri, R. and R. Chandra (1993). "Chemistry and biology of heme. Effect of metal salts, organometals, and metalloporphyrins on heme synthesis and catabolism, with special reference to clinical implications and interactions with cytochrome P-450." Drug Metab Rev **25**(1-2): 49-152.
- Birkhahn, R. H., T. J. Gaeta, et al. (2005). "Shock index in diagnosing early acute hypovolemia." Am J Emerg Med **23**(3): 323-6.
- Bone, R. C. (1996). "Toward a theory regarding the pathogenesis of the systemic inflammatory response syndrome: what we do and do not know about cytokine regulation." Crit Care Med **24**(1): 163-72.
- Bone, R. C., W. J. Sibbald, et al. (1992). "The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure." Chest **101**(6): 1481-3.
- Brown, K. A., S. D. Brain, et al. (2006). "Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis." Lancet **368**(9530): 157-69.

7 Referenzen

- Buettner, G. R. (1993). "The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate." Arch Biochem Biophys **300**(2): 535-43.
- Camenisch, G., D. M. Stroka, et al. (2001). "Attenuation of HIF-1 DNA-binding activity limits hypoxia-inducible endothelin-1 expression." Pflugers Arch **443**(2): 240-9.
- Camhi, S. L., J. Alam, et al. (1995). "Induction of heme oxygenase-1 gene expression by lipopolysaccharide is mediated by AP-1 activation." Am J Respir Cell Mol Biol **13**(4): 387-98.
- Carden, D., F. Xiao, et al. (1998). "Neutrophil elastase promotes lung microvascular injury and proteolysis of endothelial cadherins." Am J Physiol **275**(2 Pt 2): H385-92.
- Catala, A. (2006). "An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay." Int J Biochem Cell Biol **38**(9): 1482-95.
- Choi, A. M. and J. Alam (1996). "Heme oxygenase-1: function, regulation, and implication of a novel stress-inducible protein in oxidant-induced lung injury." Am J Respir Cell Mol Biol **15**(1): 9-19.
- Cinatl, J., Jr., R. Blaheta, et al. (2000). "Decreased neutrophil adhesion to human cytomegalovirus-infected retinal pigment epithelial cells is mediated by virus-induced up-regulation of Fas ligand independent of neutrophil apoptosis." J Immunol **165**(8): 4405-13.
- Cotran R., K. V., Collins T. (1999). Robbins Pathologic Basis of Disease. Philadelphia, Saunders.
- Coulet, F., S. Nadaud, et al. (2003). "Identification of hypoxia-response element in the human endothelial nitric-oxide synthase gene promoter." J Biol Chem **278**(47): 46230-40.
- de Groot, H. (1994). "Reactive oxygen species in tissue injury." Hepatology **41**(4): 328-32.
- Deitch, E. A. (1992). "Multiple organ failure. Pathophysiology and potential future therapy." Ann Surg **216**(2): 117-34.
- Demling, R. H. and C. LaLonde (1990). "Early postburn lipid peroxidation: effect of ibuprofen and allopurinol." Surgery **107**(1): 85-93.
- Eiseman, B., R. Beart, et al. (1977). "Multiple organ failure." Surg Gynecol Obstet **144**(3): 323-6.
- Epstein, A. C., J. M. Gleadle, et al. (2001). "C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation." Cell **107**(1): 43-54.

7 Referenzen

- Ertel, W., M. Keel, et al. (1998). "Circulating mediators in serum of injured patients with septic complications inhibit neutrophil apoptosis through up-regulation of protein-tyrosine phosphorylation." J Trauma **44**(5): 767-75; discussion 775-6.
- Esterbauer, H., R. J. Schaur, et al. (1991). "Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes." Free Radic Biol Med **11**(1): 81-128.
- Falk, J. L., J. F. O'Brien, et al. (1992). "Fluid resuscitation in traumatic hemorrhagic shock." Crit Care Clin **8**(2): 323-40.
- Fandrey, J., T. A. Gorr, et al. (2006). "Regulating cellular oxygen sensing by hydroxylation." Cardiovasc Res **71**(4): 642-51.
- Fernandez, M. and H. L. Bonkovsky (1999). "Increased heme oxygenase-1 gene expression in liver cells and splanchnic organs from portal hypertensive rats." Hepatology **29**(6): 1672-9.
- Forsythe, J. A., B. H. Jiang, et al. (1996). "Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1." Mol Cell Biol **16**(9): 4604-13.
- Frei, B., R. Stocker, et al. (1988). "Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(24): 9748-52.
- Furchgott, R. F. and D. Jothianandan (1991). "Endothelium-dependent and -independent vasodilation involving cyclic GMP: relaxation induced by nitric oxide, carbon monoxide and light." Blood Vessels **28**(1-3): 52-61.
- Galli, F., M. Piroddi, et al. (2005). "Oxidative stress and reactive oxygen species." Contrib Nephrol **149**: 240-60.
- Gerber, H. P., J. Kowalski, et al. (2000). "Complete inhibition of rhabdomyosarcoma xenograft growth and neovascularization requires blockade of both tumor and host vascular endothelial growth factor." Cancer Res **60**(22): 6253-8.
- Gonzalez-Amaro, R. and F. Sanchez-Madrid (1999). "Cell adhesion molecules: selectins and integrins." Crit Rev Immunol **19**(5-6): 389-429.
- Granger, D. N. (1988). "Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury." Am J Physiol **255**(6 Pt 2): H1269-75.
- Green, D. R. and J. C. Reed (1998). "Mitochondria and apoptosis." Science **281**(5381): 1309-12.
- Gu, Y. Z., J. B. Hogenesch, et al. (2000). "The PAS superfamily: sensors of environmental and developmental signals." Annu Rev Pharmacol Toxicol **40**: 519-61.

7 Referenzen

- Gu, Y. Z., S. M. Moran, et al. (1998). "Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia inducible factor subunit, HIF3alpha." Gene Expr **7**(3): 205-13.
- Guengerich, F. P. (1978). "Destruction of heme and hemoproteins mediated by liver microsomal reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-cytochrome P-450 reductase." Biochemistry **17**(17): 3633-9.
- Gutteridge, J. M. (1995). "Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage." Clin Chem **41**(12 Pt 2): 1819-28.
- Gutteridge, J. M. and A. Smith (1988). "Antioxidant protection by haemopexin of haem-stimulated lipid peroxidation." Biochem J **256**(3): 861-5.
- Hagimoto, N., K. Kuwano, et al. (1997). "Induction of apoptosis and pulmonary fibrosis in mice in response to ligation of Fas antigen." Am J Respir Cell Mol Biol **17**(3): 272-8.
- Halliwell, B. (1978). "Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron chelates: is it a mechanism for hydroxyl radical production in biochemical systems?" FEBS Lett **92**(2): 321-6.
- Halliwell, B. and J. M. Gutteridge (1984). "Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy." Lancet **1**(8391): 1396-7.
- Hart, M. L., K. A. Ceonzo, et al. (2005). "Gastrointestinal ischemia-reperfusion injury is lectin complement pathway dependent without involving C1q." J Immunol **174**(10): 6373-80.
- Hengartner, M. O. (2000). "The biochemistry of apoptosis." Nature **407**(6805): 770-6.
- Hon, W. C., M. I. Wilson, et al. (2002). "Structural basis for the recognition of hydroxyproline in HIF-1 alpha by pVHL." Nature **417**(6892): 975-8.
- Huang, L. E., J. Gu, et al. (1998). "Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(14): 7987-92.
- Immenschuh, S., S. Iwahara, et al. (1995). "Expression of the mRNA of heme-binding protein 23 is coordinated with that of heme oxygenase-1 by heme and heavy metals in primary rat hepatocytes and hepatoma cells." Biochemistry **34**(41): 13407-11.
- Issbrucker, K., H. H. Marti, et al. (2003). "p38 MAP kinase--a molecular switch between VEGF-induced angiogenesis and vascular hyperpermeability." Faseb J **17**(2): 262-4.
- Ivan, M., K. Kondo, et al. (2001). "HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing." Science **292**(5516): 464-8.

7 Referenzen

- Jaakkola, P., D. R. Mole, et al. (2001). "Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation." Science **292**(5516): 468-72.
- Jeney, V., J. Balla, et al. (2002). "Pro-oxidant and cytotoxic effects of circulating heme." Blood **100**(3): 879-87.
- Jiang, B. H., J. Z. Zheng, et al. (1997). "Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1alpha. Modulation of transcriptional activity by oxygen tension." J Biol Chem **272**(31): 19253-60.
- Jubb, A. M., T. Q. Pham, et al. (2004). "Expression of vascular endothelial growth factor, hypoxia inducible factor 1alpha, and carbonic anhydrase IX in human tumours." J Clin Pathol **57**(5): 504-12.
- Kaminski, K. A., T. A. Bonda, et al. (2002). "Oxidative stress and neutrophil activation--the two keystones of ischemia/reperfusion injury." Int J Cardiol **86**(1): 41-59.
- Kawashima, A., Y. Oda, et al. (2002). "Heme oxygenase-1 deficiency: the first autopsy case." Hum Pathol **33**(1): 125-30.
- Keel, M. and O. Trentz (2005). "Pathophysiology of polytrauma." Injury **36**(6): 691-709.
- Kewley, R. J., M. L. Whitelaw, et al. (2004). "The mammalian basic helix-loop-helix/PAS family of transcriptional regulators." Int J Biochem Cell Biol **36**(2): 189-204.
- Kubulus, D., H. Rensing, et al. (2005). "Influence of heme-based solutions on stress protein expression and organ failure after hemorrhagic shock." Crit Care Med **33**(3): 629-37.
- Kubulus, D., F. Roesken, et al. (2004). "Mechanism of the delay phenomenon: tissue protection is mediated by heme oxygenase-1." Am J Physiol Heart Circ Physiol **287**(5): H2332-40.
- Kutty, R. K. and M. D. Maines (1981). "Purification and characterization of biliverdin reductase from rat liver." J Biol Chem **256**(8): 3956-62.
- Lee, A., M. K. Whyte, et al. (1993). "Inhibition of apoptosis and prolongation of neutrophil functional longevity by inflammatory mediators." J Leukoc Biol **54**(4): 283-8.
- Lee, P. J., B. H. Jiang, et al. (1997). "Hypoxia-inducible factor-1 mediates transcriptional activation of the heme oxygenase-1 gene in response to hypoxia." J Biol Chem **272**(9): 5375-81.
- Lenz, A., G. A. Franklin, et al. (2007). "Systemic inflammation after trauma." Injury **38**(12): 1336-45.

7 Referenzen

- Lieschke, G. J., D. Grail, et al. (1994). "Mice lacking granulocyte colony-stimulating factor have chronic neutropenia, granulocyte and macrophage progenitor cell deficiency, and impaired neutrophil mobilization." Blood **84**(6): 1737-46.
- Lögters, T., Altrichter, et al. (2010). "Extracorporeal immune therapy with immobilized agonistic anti-Fas antibodies leads to transient reduction of circulating neutrophil numbers and limits tissue damage after hemorrhagic shock/resuscitation in a porcine model." J Inflamm **7**(1):18.
- Lomas, J. L., C. S. Chung, et al. (2003). "Differential effects of macrophage inflammatory chemokine-2 and keratinocyte-derived chemokine on hemorrhage-induced neutrophil priming for lung inflammation: assessment by adoptive cells transfer in mice." Shock **19**(4): 358-65.
- Maier, B., R. Lefering, et al. (2007). "Early versus late onset of multiple organ failure is associated with differing patterns of plasma cytokine biomarker expression and outcome after severe trauma." Shock **28**(6): 668-674.
- Maines, M. D. (1988). "Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications." Faseb J **2**(10): 2557-68.
- Maines, M. D. (1997). "The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases." Annu Rev Pharmacol Toxicol **37**: 517-54.
- Marshall, J. C., D. J. Cook, et al. (1995). "Multiple organ dysfunction score: a reliable descriptor of a complex clinical outcome." Crit Care Med **23**(10): 1638-52.
- Martin, C., P. C. Burdon, et al. (2003). "Chemokines acting via CXCR2 and CXCR4 control the release of neutrophils from the bone marrow and their return following senescence." Immunity **19**(4): 583-93.
- Masson, N. and P. J. Ratcliffe (2003). "HIF prolyl and asparaginyl hydroxylases in the biological response to intracellular O(2) levels." J Cell Sci **116**(Pt 15): 3041-9.
- Maxwell, P. H., M. S. Wiesener, et al. (1999). "The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis." Nature **399**(6733): 271-5.
- McCloskey, C. A., M. V. Kameneva, et al. (2004). "Tissue hypoxia activates JNK in the liver during hemorrhagic shock." Shock **22**(4): 380-6.
- McCoubrey, W. K., Jr., T. J. Huang, et al. (1997). "Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3." Eur J Biochem **247**(2): 725-32.
- McMullen, M. E., M. L. Hart, et al. (2006). "Mannose-binding lectin binds IgM to activate the lectin complement pathway in vitro and in vivo." Immunobiology **211**(10): 759-66.

7 Referenzen

- Mikkelsen, M. E., A. N. Miltiades, et al. (2009). "Serum lactate is associated with mortality in severe sepsis independent of organ failure and shock." Crit Care Med **37**(5): 1670-7.
- Min, J. H., H. Yang, et al. (2002). "Structure of an HIF-1alpha -pVHL complex: hydroxyproline recognition in signaling." Science **296**(5574): 1886-9.
- Mollnes, T. E., O. L. Brekke, et al. (2002). "Essential role of the C5a receptor in E coli-induced oxidative burst and phagocytosis revealed by a novel lepirudin-based human whole blood model of inflammation." Blood **100**(5): 1869-77.
- Moore, F. A., B. A. McKinley, et al. (2004). "The next generation in shock resuscitation." Lancet **363**(9425): 1988-96.
- Morini, S., W. Yacoub, et al. (2000). "Intestinal microvascular patterns during hemorrhagic shock." Dig Dis Sci **45**(4): 710-22.
- Morita, T., M. A. Perrella, et al. (1995). "Smooth muscle cell-derived carbon monoxide is a regulator of vascular cGMP." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(5): 1475-9.
- Murre, C., G. Bain, et al. (1994). "Structure and function of helix-loop-helix proteins." Biochim Biophys Acta **1218**(2): 129-35.
- Mutschler (2004). Praxis der Unfallchirurgie, Thieme.
- Nguyen, H. B., M. Loomba, et al. "Early lactate clearance is associated with biomarkers of inflammation, coagulation, apoptosis, organ dysfunction and mortality in severe sepsis and septic shock." J Inflamm (Lond) **7**(1): 6.
- Nguyen, H. B., E. P. Rivers, et al. (2004). "Early lactate clearance is associated with improved outcome in severe sepsis and septic shock." Crit Care Med **32**(8): 1637-42.
- Nigam, S. and T. Schewe (2000). "Phospholipase A(2)s and lipid peroxidation." Biochim Biophys Acta **1488**(1-2): 167-81.
- Ogasawara, J., R. Watanabe-Fukunaga, et al. (1993). "Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice." Nature **364**(6440): 806-9.
- Ohh, M., C. W. Park, et al. (2000). "Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the beta-domain of the von Hippel-Lindau protein." Nat Cell Biol **2**(7): 423-7.
- Okinaga, S. and S. Shibahara (1993). "Identification of a nuclear protein that constitutively recognizes the sequence containing a heat-shock element. Its binding properties and possible function modulating heat-shock induction of the rat heme oxygenase gene." Eur J Biochem **212**(1): 167-75.
- Ott, A. (2010). Untersuchungen zum Einfluss des Leukozyten-Inhibitions-Moduls auf die posthämorrhagische Aktivierung von neutrophilen Granulozyten im Tiermodell.

7 Referenzen

- Palmer, L. A., G. L. Semenza, et al. (1998). "Hypoxia induces type II NOS gene expression in pulmonary artery endothelial cells via HIF-1." Am J Physiol **274**(2 Pt 1): L212-9.
- Paunel-Gorgulu, A., M. Zornig, et al. (2009). "Mcl-1-mediated impairment of the intrinsic apoptosis pathway in circulating neutrophils from critically ill patients can be overcome by Fas stimulation." J Immunol **183**(10): 6198-206.
- Pellacani, A., P. Wiesel, et al. (1998). "Induction of heme oxygenase-1 during endotoxemia is downregulated by transforming growth factor-beta1." Circ Res **83**(4): 396-403.
- Peter, M. E., R. C. Budd, et al. (2007). "The CD95 receptor: apoptosis revisited." Cell **129**(3): 447-50.
- Ponka, P. (1999). "Cell biology of heme." Am J Med Sci **318**(4): 241-56.
- Pugh, C. W., J. F. O'Rourke, et al. (1997). "Activation of hypoxia-inducible factor-1; definition of regulatory domains within the alpha subunit." J Biol Chem **272**(17): 11205-14.
- Quaid, G. A., C. Cave, et al. (1999). "Preferential loss of CXCR-2 receptor expression and function in patients who have undergone trauma." Arch Surg **134**(12): 1367-71; discussion 1371-2.
- Rensing, H., I. Bauer, et al. (1999). "Differential expression pattern of heme oxygenase-1/heat shock protein 32 and nitric oxide synthase-II and their impact on liver injury in a rat model of hemorrhage and resuscitation." Crit Care Med **27**(12): 2766-75.
- Rixen, D., M. Raum, et al. (2001). "A pig hemorrhagic shock model: oxygen debt and metabolic acidemia as indicators of severity." Shock **16**(3): 239-44.
- Rolfs, A., I. Kvietikova, et al. (1997). "Oxygen-regulated transferrin expression is mediated by hypoxia-inducible factor-1." J Biol Chem **272**(32): 20055-62.
- Rosario, H. S., S. W. Waldo, et al. (2004). "Pancreatic trypsin increases matrix metalloproteinase-9 accumulation and activation during acute intestinal ischemia-reperfusion in the rat." Am J Pathol **164**(5): 1707-16.
- Rose S, B. D., Chandler J, Blum U, Dike J, Wierkinski A, Mutschler W (1994). "Respiratory failure in polytrauma patients: Role of altered PMNL-signal transduction and free radical injury." Int Care Med **20**(2): 89.
- Rüter A., T. O., Wagner M. (2004). Unfallchirurgie.
- Sakorafas, G. H., G. G. Tsiotos, et al. (2000). "Ischemia/Reperfusion-Induced pancreatitis." Dig Surg **17**(1): 3-14.

7 Referenzen

- Salceda, S. and J. Caro (1997). "Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes." J Biol Chem **272**(36): 22642-7.
- Sato, H., T. Tanaka, et al. (2007). "Role of p38 mitogen-activated protein kinase on cardiac dysfunction after hemorrhagic shock in rats." Shock **28**(3): 291-9.
- Schmidt, R., A. Hoetzel, et al. (2004). "Isoflurane pretreatment lowers portal venous resistance by increasing hepatic heme oxygenase activity in the rat liver in vivo." J Hepatol **41**(5): 706-13.
- Scholz, M. and J. Cinatl (2005). "Fas/FasL interaction: a novel immune therapy approach with immobilized biologicals." Med Res Rev **25**(3): 331-42.
- Scholz, M., J. Cinatl, et al. (2005). "First efficacy and safety results with the antibody containing leukocyte inhibition module in cardiac surgery patients with neutrophil hyperactivity." Asaio J **51**(2): 144-7.
- Scholz, M., J. Cinatl, et al. (2007). "Neutrophils and the blood-brain barrier dysfunction after trauma." Med Res Rev **27**(3): 401-16.
- Scholz, M., A. Simon, et al. (2004). "In vivo inhibition of neutrophil activity by a FAS (CD95) stimulating module: arterial in-line application in a porcine cardiac surgery model." J Thorac Cardiovasc Surg **127**(6): 1735-42.
- Semenza, G. L. (2000). "HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia." J Appl Physiol **88**(4): 1474-80.
- Semenza, G. L., B. H. Jiang, et al. (1996). "Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1." J Biol Chem **271**(51): 32529-37.
- Sies, H. and E. Cadenas (1985). "Oxidative stress: damage to intact cells and organs." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **311**(1152): 617-31.
- Stocker, R., Y. Yamamoto, et al. (1987). "Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance." Science **235**(4792): 1043-6.
- Suematsu, M., N. Goda, et al. (1995). "Carbon monoxide: an endogenous modulator of sinusoidal tone in the perfused rat liver." J Clin Invest **96**(5): 2431-7.
- Suratt, B. T., S. K. Young, et al. (2001). "Neutrophil maturation and activation determine anatomic site of clearance from circulation." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **281**(4): L913-21.
- Takahashi, S., Y. Takahashi, et al. (1999). "Positive and negative regulation of the human heme oxygenase-1 gene expression in cultured cells." Biochim Biophys Acta **1447**(2-3): 231-5.

7 Referenzen

- Talks, K. L., H. Turley, et al. (2000). "The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1 α and HIF-2 α in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages." Am J Pathol **157**(2): 411-21.
- Tamion, F., V. Richard, et al. (2001). "Induction of heme-oxygenase-1 prevents the systemic responses to hemorrhagic shock." Am J Respir Crit Care Med **164**(10 Pt 1): 1933-8.
- Tanaka, H., K. Ishikawa, et al. (1996). "Changes in granulocyte colony-stimulating factor concentration in patients with trauma and sepsis." J Trauma **40**(5): 718-25; discussion 725-6.
- Taylor, B. L. and I. B. Zhulin (1999). "PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light." Microbiol Mol Biol Rev **63**(2): 479-506.
- Taylor, J. L., M. S. Carraway, et al. (1998). "Lung-specific induction of heme oxygenase-1 and hyperoxic lung injury." Am J Physiol **274**(4 Pt 1): L582-90.
- Tenhunen, R., H. S. Marver, et al. (1968). "The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase." Proc Natl Acad Sci U S A **61**(2): 748-55.
- Tenhunen, R., H. S. Marver, et al. (1969). "Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme." J Biol Chem **244**(23): 6388-94.
- Terry, C. M., J. A. Clikeman, et al. (1998). "Effect of tumor necrosis factor- α and interleukin-1 α on heme oxygenase-1 expression in human endothelial cells." Am J Physiol **274**(3 Pt 2): H883-91.
- Tian, H., S. L. McKnight, et al. (1997). "Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells." Genes Dev **11**(1): 72-82.
- Toda, Y., T. Takahashi, et al. (2007). "A neutrophil elastase inhibitor, sivelestat, ameliorates lung injury after hemorrhagic shock in rats." Int J Mol Med **19**(2): 237-43.
- Tullius, S. G., M. Nieminen-Kelha, et al. (2002). "Inhibition of ischemia/reperfusion injury and chronic graft deterioration by a single-donor treatment with cobalt-protoporphyrin for the induction of heme oxygenase-1." Transplantation **74**(5): 591-8.
- Utz, J. and V. Ullrich (1991). "Carbon monoxide relaxes ileal smooth muscle through activation of guanylate cyclase." Biochem Pharmacol **41**(8): 1195-201.
- van Meurs, M., F. M. Wulfert, et al. (2008). "Early organ-specific endothelial activation during hemorrhagic shock and resuscitation." Shock **29**(2): 291-9.
- Verma, A., D. J. Hirsch, et al. (1993). "Carbon monoxide: a putative neural messenger." Science **259**(5093): 381-4.

7 Referenzen

- Wagener, F. A., H. D. Volk, et al. (2003). "Different faces of the heme-heme oxygenase system in inflammation." Pharmacol Rev **55**(3): 551-71.
- Wagner, M., P. Cadetg, et al. (2003). "Heme oxygenase-1 attenuates ischemia/reperfusion-induced apoptosis and improves survival in rat renal allografts." Kidney Int **63**(4): 1564-73.
- Walsh, A. M., D. Mustafi, et al. (2005). "A surfactant copolymer facilitates functional recovery of heat-denatured lysozyme." Ann N Y Acad Sci **1066**: 321-7.
- Wang, G. L., B. H. Jiang, et al. (1995). "Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(12): 5510-4.
- Wang, G. L. and G. L. Semenza (1993). "Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia." J Biol Chem **268**(29): 21513-8.
- Watson, R. W., O. D. Rotstein, et al. (1997). "Augmented intracellular glutathione inhibits Fas-triggered apoptosis of activated human neutrophils." Blood **89**(11): 4175-81.
- Watson, R. W., O. D. Rotstein, et al. (1997). "Impaired apoptotic death signaling in inflammatory lung neutrophils is associated with decreased expression of interleukin-1 beta converting enzyme family proteases (caspases)." Surgery **122**(2): 163-71; discussion 171-2.
- Weiss, S. J. (1989). "Tissue destruction by neutrophils." N Engl J Med **320**(6): 365-76.
- Welbourn, C. R., G. Goldman, et al. (1991). "Neutrophil elastase and oxygen radicals: synergism in lung injury after hindlimb ischemia." Am J Physiol **260**(6 Pt 2): H1852-6.
- Witte, I. (2010). Untersuchungen zum Einfluss des Leukozyten-Inhibitions-Moduls auf die Posthämorrhagische Hämodynamik im Tiermodell.
- Yachie, A., Y. Niida, et al. (1999). "Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency." J Clin Invest **103**(1): 129-35.
- Yagi, K. (1998). "Simple assay for the level of total lipid peroxides in serum or plasma." Methods Mol Biol **108**: 101-6.
- Young, I. S. and J. McEneny (2001). "Lipoprotein oxidation and atherosclerosis." Biochem Soc Trans **29**(Pt 2): 358-62.
- Zakaria el, R., J. E. Campbell, et al. (2007). "Postresuscitation tissue neutrophil infiltration is time-dependent and organ-specific." J Surg Res **143**(1): 119-25.
- Zhang, M., K. Takahashi, et al. (2006). "Activation of the lectin pathway by natural IgM in a model of ischemia/reperfusion injury." J Immunol **177**(7): 4727-34.

8. Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. J. Windolf, dem Direktor der Klinik für Unfall- und Handchirurgie der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf für die Überlassung des Themas und die wissenschaftliche Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank und Hochachtung gilt Herrn Prof. Dr. phil. nat. M. Scholz für die wissenschaftliche Betreuung, seine stetige Förderung, die motivierenden Gespräche und Hilfeleistungen bei Inspirations-Engpässen und für sein Engagement und seine Begeisterungsfähigkeit, die diese Arbeit überhaupt ermöglichten.

Es ist mir ein besonderes Anliegen, mich ganz herzlich bei meinen Kollegen/Innen der Arbeitsgruppe LIM , Dr. med. Tim Lögters, Frau Annina Ott, Frau Sarah Sadek, Frau Jessica Baltes und Herrn Ingo Witte zu bedanken. Für die freundliche, lustige, und dennoch zielorientierte Atmosphäre, durch welche die Arbeit im Labor und vor allem in der TVA viel Spaß gemacht hat, möchte ich mich ebenfalls bedanken.

Bei dem Team der Tierversuchsanlage, insbesondere Herrn Dr. Sager, Frau Dr. Engelhardt und Frau Schrey möchte ich mich für die Hilfestellung bei vielen Problemen und die gute Zusammenarbeit ganz herzlich bedanken.

Einen besonderen und nicht zu unterschätzenden Dank hat das gesamte Team des wissenschaftlichen Labors der Klinik für Unfall- und Handchirurgie der Uni Düsseldorf verdient: Frau Dr. rer. nat. Adnana Paunel Görgülü für die wichtigen Details, Frau Samira Seghrouchni und Frau Jutta Schneider. Die perfekte Mischung aus Professionalität und Harmonie hat die Arbeit im Labor unvergesslich gemacht.

Frau Dr. med. Julia Kuhlemann hat einen liebevollen Dank für ihre Unterstützung und Motivation bei der Verarbeitung des mit Strapazen und Rückschlägen überfüllten Endspurtes verdient. Danke dafür, Julia.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern, Anabel Ferrer und Hartmut Schek, und ganz besonders bei meinen Geschwistern Anabel, Alexander, Andreas und Adriana Schek herzlichst bedanken. Ohne sie hätte der Jüngste nicht all die Motivation und das Durchsetzungsvermögen erlernt.