

3. Einleitung

3.1. Klinische Bedeutung

Akuter starker Blutverlust führt zur Aktivierung physiologischer Kompensationsmechanismen, um einer drohenden Minderversorgung lebenswichtiger Organe mit Sauerstoff entgegen zu wirken. Schreitet jedoch die Hämorrhagie ohne eine adäquate Therapie voran, so entwickelt sich zunehmend aufgrund des direkten Volumenmangels und auch indirekt durch Zentralisation ein Zirkulationsversagen mit einem Missverhältnis zwischen Sauerstoffangebot und –bedarf, entsprechend einem hämorrhagischen Schock. Die Folge dieser zunächst makrohämodynamischen Veränderungen ist ein zunehmendes Mikrozirkulationsversagen mit Ausbildung einer low-flow Hypoxie und schließlich Ischämie bei Aggravation des Perfusionsversagens. Der daraus resultierende Gewebeschaden führt zu einer Organdysfunktion, die letztendlich bei protrahiertem Verlauf die Entwicklung eines Multiorganversagens nach sich ziehen kann.

Diese von TILNEY 1973 und BAUE 1975 erstmals beschriebene Syndrom des Multiorganversagens stellt ein zentrales medizinisches wie ökonomisches Problem der Patientenversorgung dar, da trotz weit reichender Fortschritte in der Behandlung einzelner Organsysteme, wie zum Beispiel des akuten Nierenversagens oder Lungenversagens („Adult Respiratory Distress Syndrome“ ARDS), die Letalität immer noch über 70% bei gleichzeitigem Versagen von drei oder mehr Organsystemen beträgt (BEAL 1994). Einen besonderen Stellenwert in der Prognose des Multiorganversagens scheint dabei die Leber aufgrund der hier stattfindenden Proteinsynthese und der damit verbundenen umfassenden Auswirkungen auf zahlreiche Organsysteme einzunehmen. Bedingt durch die Komplexität der Funktionsweise stellt das manifeste Leberversagen mit entsprechend eingeschränkten bis nicht vorhandenen Therapiemöglichkeiten im Zusammenhang mit einem Multiorganversagen einen prognostisch limitierenden Faktor dar und führt dadurch zu einem deutlichen Anstieg der Letalität (HAWKER 1991; MARZI 1994).

Daher erscheint es unverzichtbar, eine hämodynamisch relevante Blutung schnell zu beenden sowie die entstandene Hypovolämie adäquat zu ersetzen, um eine Reduktion der Letalität zu erreichen (CARRICIO 2002), da eine verspätete oder

3. Einleitung

unzureichende Volumentherapie die Prognose des Patienten entscheidend verschlechtert (SHIRES 1965).

Neben traumatisch hervorgerufenen Blutungen, kommen auch im klinischen Bereich hämorrhagische Ereignisse vor, die zu vergleichbaren pathophysiologischen Veränderungen und Auswirkungen wie oben beschriebenen führen können. Hervorzuheben sind hier insbesondere elektive operative Eingriffe mit hoher Blutungswahrscheinlichkeit, wie sie in zahlreichen chirurgischen Disziplinen eintreffen können. Der grundlegende Unterschied besteht jedoch darin, dass durch Vorbereitung und angepasstes perioperatives Management das Auftreten von negativen Folgen verhindert oder zumindest minimiert werden kann. Hierzu gehört neben der engmaschigen Kontrolle der Vitalparameter, die suffiziente Volumensubstitution sowie die rechtzeitige Transfusion von Erythrozytenkonzentraten, um ein makro- und mikrohämodynamisches Perfusionsversagen mit Ausbildung einer low-flow Hypoxie oder gar Ischämie zu verhindern.

Aufgrund der jedoch notwendigen Kompatibilität von Blutprodukten sind der Transfusion Grenzen gesetzt, weshalb seit vielen Jahren intensive Versuche unternommen werden, um einen universell einsetzbaren Blutersatzstoff zu entwickeln. Zu diesen Lösungen zählen die Perfluorocarbone, welche jedoch aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften nur unter speziellen Bedingungen einsetzbar sind, und die hämoglobin-basierten Sauerstoffträger (HBOC), welche aufgrund ihrer mit dem humanen Blut vergleichbaren physikalischen Eigenschaften von besonderem Interesse sind (PAXIAN 2003; KEIPERT 1996; KOTHE 1985; LAMY 2000). Zu diesen Substanzen gehört auch das Diaspirin-quervernetzte Hämoglobin (DCLHb). Leider führte trotz viel versprechender tierexperimenteller Ergebnisse der Einsatz dieser Lösung in klinischen Phase-III Studien zu einem signifikanten Anstieg der Letalität (SLOAN 1999; SAXENA 1999), weshalb die Studien abgebrochen wurden und seither DCLHb nicht mehr als artifizieller Sauerstoffträger zur Verfügung steht. Als wesentlichen Grund dieser Letalitätserhöhung nimmt man eine durch das azelluläre Hämoglobin hervorgerufen Vasokonstriktion an, die durch Störung der Mikrozirkulation zu einer Zunahme von Organdysfunktionen führen kann (HESS 1993; WINSLOW 2000, 2003; Kubulus 2004).

3. Einleitung

Neben der Optimierung des Managements einer perioperativen Blutung werden seit vielen Jahren auch supportive, präoperative Maßnahmen beschrieben, mit dem Ziel, die Auswirkungen eines nachfolgenden, potentiell schädlichen Stressereignisses zu minimieren. Hierzu zählt auch die Möglichkeit der Präkonditionierung. Darunter versteht man eine Vorbehandlung eines Gewebes mit physikalischen Maßnahmen wie z. B. milde Ischämie (KUBULUS 2004) oder mit pharmakologischen Substanzen wie z. B. Hämin (SHIBAHARA 1978) um eine Toleranz dieses Gewebes gegenüber einer nachfolgenden starken Ischämie zu generieren. Obwohl die protektiven Eigenschaften dieser Maßnahmen vielfach beschrieben wurden, waren die zugrunde liegenden pathophysiologischen Vorgänge lange nicht bekannt. Neuere Untersuchungen ergeben jedoch Hinweise, dass diese Protektion über eine Induktion der Expression von unterschiedlichen Stressproteinen zustande kommt, welche auf zellulärer Ebene zu einer Erhöhung der Stresstoleranz führen (KUBULUS 2005). Trotz einer Vielzahl der heute bekannten Stressproteine scheint die Hämoxxygenase-1 (HO-1) von besonderem Interesse zur Reduktion eines durch Ischämie hervorgerufenen Gewebeschadens zu sein (RENSING 1999; KUBULUS 2005). Das Hämoxxygenasesystem, welches sich aus insgesamt 2 Subtypen zusammensetzt (HO-1, HO-2), katalysiert den oxidativen Abbau von Häm zu equimolaren Mengen Kohlenmonoxid (CO), Biliverdin und Eisen. Kohlenmonoxid soll wie Stickstoffmonoxid (NO) über die Aktivierung der löslichen Guanylyl-Cyclase zu einer Zunahme des zyklischen 3' 5' Guanosinmonophosphat (cGMP) - Spiegels führen und dadurch eine Gefäßdilatation bewirken (FURCHGOTT 1991; UTZ 1991; VERMA 1993; MORITA 1995). Biliverdin wird durch die Biliverdin-Reduktase in Bilirubin - einem antioxidativ wirkenden Molekül (STOCKER 1987) - reduziert (KUTTY 1981; MAINES 1988; Abb. 1). Eisen wird nach Induktion der Ferritinexpression durch HO-Aktivitätszunahme an Ferritin gebunden und kann damit nicht mehr als Präoxidant die Herstellung von Sauerstoffradikalen, wie z. B. OH⁻, katalysieren (HALLIWELL 1978). Aufgrund dieser antioxidativen und gefäßdilatierenden Eigenschaften spielt die Hämoxxygenase eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase und kann dadurch möglicherweise einen ischämischen Schaden reduzieren. Obwohl das gesamte Hämoxxygenasesystem diese protektiven Eigenschaften aufweist, spielt die HO-1 eine ausschlaggebende Rolle im zellulären Schutz nach Stressereignissen und im

3. Einleitung

Hinblick auf eine durch Präkonditionierung induzierte Protektion, da dieses Isoenzym gleichzeitig als das Hitzeschock-(Stress)protein (HSP) 32 identifiziert wurde (MAINES 1974; YOSHIDA 1974). Entsprechend ist die HO-1 durch eine Vielzahl von Stimuli, wie Hyper- (OKINAGA 1993) und Hypothermie (Kubulus 2004), Ischämie (KUBULUS 2004; RENSING 1999) oder Hämin (KATO Y 2003), induzierbar, wobei allen Induktoren gemeinsam ist, dass sie oxidativen Stress verursachen (BAUER M 2002). Trotz der vielfältigen Induktionsmöglichkeiten ist Häm, und damit auch Hämoglobin bzw. Hämin, der stärkste Induktor der HO-1, da dieses gleichzeitig das Substrat dieses Enzymes ist.

Einhergehend mit den beschriebenen pathophysiologischen Vorgängen könnte die präoperative Applikation von DCLHb im Rahmen einer Präkonditionierung - als Alternative zu dem nicht erfolgreichen Einsatz dieser Lösung als artifizieller Sauerstoffträger - über die Induktion der HO-1 zu einer Gewebeprotektion führen und damit zu einer Reduktion von Mortalität und Letalität beitragen.

Deshalb wurde in der vorliegenden Studie untersucht, ob eine Präkonditionierung mit DCLHb zu einer Induktion der HO-1 Expression führt und wie sich diese auf den durch hämorrhagischen Schock und Reperfusion hervorgerufenen Organschaden auswirkt. Die gewonnenen Erkenntnisse wurden darüberhinaus mit denen aus Gruppen verglichen, welche mit Häminarginat präkonditioniert wurden. Hierbei handelt sich um eine Substanz, welche aus Hämin – einem bekannten HO-1 Induktor (SHIBAHARA 1978) – und L-Arginin besteht und bereits in der Klinik zur Behandlung der akuten Porphyrie etabliert ist (TENHUNEN 1998). Im Gegensatz zu DCLHb weist diese Lösung keine Sauerstofftransportkapazität und keine NO-Affinität auf und zeigt somit keine Nebeneffekte wie Vasokonstriktion mit potentieller Störung der Mikrozirkulation (TENHUNEN 1987; MARTASEK P 1991).

3.2. Hämorrhagisches Schockmodell

Der Schock ist definiert als ein akutes Zirkulationsversagen mit resultierendem Missverhältnis von Sauerstoffangebot und mitochondrialem Sauerstoffbedarf lebenswichtiger Organe (LARSEN 1987). Die Ursache des Zirkulationsversagens beim hämorrhagischen Schock ist eine stärkere innere oder äußere Blutung.

Dabei ist das Sauerstoffangebot bzw. der Sauerstofftransport (DO_2) in den Organen vom regionalen Blutfluß beziehungsweise vom Herzzeitvolumen (HZV) und dem arteriellen Sauerstoffgehalt (CaO_2) abhängig und wird folgendermaßen definiert:

$$DO_2 = HZV \text{ (L/min)} \times CaO_2 \text{ (ml/dl)}.$$

Der CaO_2 ist definiert als:

$$CaO_2 = (1,34 \text{ ml O}_2/\text{g Hb} \times O_2 \text{ Sat} \times [\text{Hb}]) + (0,003 \text{ ml O}_2/\text{O}_2 \text{ torr} \times PaO_2),$$

wobei Hb die Hämoglobinkonzentration (g/dl), PaO_2 der Sauerstoffpartialdruck im arteriellen Blut und O_2 Sat die Hämoglobin- O_2 -Sättigung darstellt. Daraus ergibt sich, dass Bedingungen, die den Blutfluss, die Hämoglobinkonzentration oder die Hämoglobin- O_2 -Sättigung herabsetzen, einen direkten Einfluss auf den Sauerstofftransport haben.

Eine Abnahme des arteriellen Sauerstoffgehalts wird als Hypoxämie bezeichnet, wobei die hypoxische Hypoxie durch Störungen der Lungenfunktion oder der Atmung, die toxische Hypoxämie z.B. durch CO-Intoxikation und die anämische Hypoxämie durch Anämie, auch in Verbindung mit hämorrhagischen Schock, hervorgerufen werden können. Eine Herabsetzung des Sauerstofftransports kann weiterhin zu adaptiven Veränderungen des Sauerstoffverbrauchs (VO_2) führen. Diese kompensatorischen Reaktionen können die Gewebe vor Änderungen des Blutflusses und der Hämoglobinkonzentration schützen.

Zur Untersuchung der Auswirkung einer Präkonditionierung bedienen wir uns in der vorliegenden Arbeit, wegen der Wiederholbarkeit einer standartisierten

3. Einleitung

Simulation einer Low-flow-Ischämie, eines hämorrhagischen Schockmodells am Kleintier.

Im Kleintiermodell sind verschiedene hämorrhagische Schockmodelle beschrieben, die entsprechend dem gewählten pathophysiologischen Endpunkt generell in zwei Gruppen eingeteilt werden. Dabei werden solche mit einem definiert entzogenen Blutvolumen („fixed volume“) und solche mit einem definierten Blutdruck („fixed pressure“) unterschieden. Der Vorteil eines druckkonstanten Modells gegenüber einem volumenkonstanten Modell liegt darin, dass es nicht vom Hydratationsgrad des Tieres abhängig ist. Bezüglich der Verwendung von Heparin und Anästhetika ergeben sich die Kategorien der heparinisierten und nicht-heparinisierten sowie der anästhesierten und nicht-anästhesierten Modelle (CHAUDRY 1994), wobei die prophylaktische Heparinisierung als auch die Verwendung von Anästhetika zu einer Organprotektion führt. Dies bedeutet, dass, verglichen mit nicht-heparinisierten und nicht-anästhesierten Tieren, zur Erzielung eines vergleichbaren pathophysiologischen Endpunktes wie Dekompensation oder Organschaden längere Hypotensionsphasen erforderlich sind.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein druckgesteuertes, nicht heparinisiertes, modifiziertes WIGGERS-Schockmodell gewählt (WIGGERS 1946). Aus ethischen Gründen wurden die Tiere mit Pentobarbital, einem lang wirksamen Barbiturat, anästhesiert. Um das Modell kliniknah zu gestalten, wurde der mittlere arterielle Druck (MAD) auf 35 ± 5 mmHg gesenkt und die Dauer des Schocks auf 60 bzw. 120 Minuten festgelegt. Zur Volumentherapie wurde ein Substitutionschema, basierend auf der Retransfusion von 60% des entzogenen Blutvolumens und Ringerlaktatlösung entsprechend dem dreifachen Blutvolumens, angewandt. Dieses Therapieschema führt zu einer leichten Hämodilution mit Hämatokritwerten zwischen 25 und 30 %, wie sie heute klinisch nach überlebten Schockereignis angestrebt werden, sowie zur Wiederherstellung des MAD und der Herzfrequenz sowie zu supranormalen Herzzeitvolumina (HZV).

3.3. Oxidativer Stress nach Hämorrhagie und Retransfusion

Ein möglicher Schädigungsmechanismus für den durch Hämorrhagie und Retransfusion entstehenden Parenchymschaden ist die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies. Eine Ischämie führt zu einem Verbrauch von ATP, das dabei schließlich zu Hypoxanthin abgebaut wird (CUNNINGHAM 1977). Die Ischämie bewirkt eine Umwandlung von Xanthindehydrogenase zu Xanthinoxidase, die, zusätzlich zu den Sauerstoffradikalen aus der mitochondrialen Atmungskette, aus dem bei Retransfusion wieder verfügbaren Sauerstoff Superoxidanionen produziert, welche durch die Superoxiddismutase weiter in Hydrogenperoxid umgewandelt werden (ROY 1983; GONZALEZ-FLECHA 1993). Die Reaktion von Superoxid und Hydrogenperoxid bei Verfügbarkeit von Eisen führt über die Metallionen abhängige Fentonreaktion zur Bildung des Hydroxylradikals. Dieses hochreaktive Molekül kann sehr schnell mit allen zellulären Makromolekülen, vor allem mit ungesättigten Fettsäuren, reagieren, und führt dann zur Bildung von kurzkettigen Aldehyden und Hydroxyfettsäuren, was zur Erhöhung der Membranfluidität bis hin zur Desintegration der Membran mit Verlust der zellulären Homöostase führen kann (GONZALEZ-FLECHA 1993; REDL 1993; JAESCHKE 1995).

In diesem Zusammenhang könnte die HO-1 von besonderem Interesse sein. Aufgrund der durch den Häm-Abbau bereitgestellten Endprodukte Biliverdin und Kohlenmonoxid könnte diese zu einer Minimierung des primären ischämischen Schadens durch Vasodilatation (CO) und zu einer Verringerung des sekundären Schadens, vermittelt durch die Radikalbildung, durch Antioxidation (Biliverdin) beitragen. Darüber hinaus führt die HO-1 Expression zu einer Induktion der Ferritin-Synthese, so dass frei entstehendes Eisen über die Bindung an Ferritin aus dem Reaktionsgebiet entfernt wird und somit nicht mehr die Bildung von Radikalen über die Fenton-Reaktion katalysieren kann. Ein Substitutionsschema, basierend auf der Retransfusion von 60% des entzogenen Blutvolumens und Ringerazetatlösung entsprechend dem dreifachen Blutverlustvolumen, angewandt. Dieses Therapieschema führt zu einer leichten Hämodilution mit Hämatokritwerten zwischen 25 und 30 %, wie sie heute klinisch nach überlebtem Schockereignis angestrebt werden, sowie zur Wiederherstellung des MAD und der Herzfrequenz sowie zu supranormalen Herzzeitvolumina (HZV).

3. Einleitung

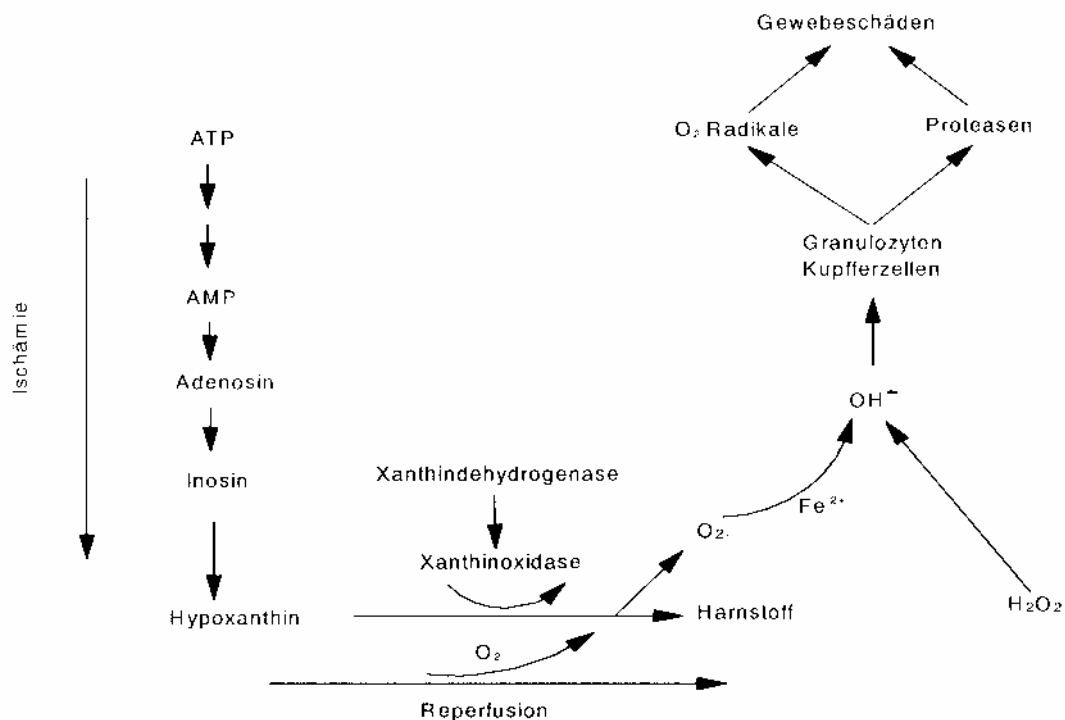


Abb. 1: Pathophysiologische Vorstellung zum Sauerstoffradikal-vermittelten Gewebeschaaden. Abbau von ATP bis zum Hypoxanthin bei Ischämie. Die Wiederverfügbarkeit von Sauerstoff während der Retransfusion kann zur Bildung von Superoxidanion durch die Xanthinoxidase und über die Fenton-Reaktion zur Bildung des Hydroxylions fuhren. Nach Aktivierung von Kupferzellen und Granulozyten durch Sauerstoffradikale kann letztlich der Gewebeschaaden durch Freisetzung von Proteasen potenziert werden (modifiziert nach GRANGER 1981).

3.4. Hämoxygenasestoffwechsel

Im Jahre 1962 wurde eine neue Art von Proteinen entdeckt, welche aufgrund ihrer Expression nach Hyperthermie-Behandlung Hitzeschockproteine (HSP) genannt wurden (RITOSSA 1996). Ihre Expression ist der wichtigste Bestandteil der zellulären Antwort auf unterschiedliche Stressereignisse (LINDQUIST 1988; NOVER 1991). Neben der Hyperthermie können jedoch auch andere Stressfaktoren wie Infektionen, metabolische Erkrankungen, Neoplasien, Traumata usw. zur Expression dieser Proteine fuhren (WELCH 1992). In Anbetracht der möglichen Induktion durch diese Vielzahl von Stressfaktoren

3. Einleitung

werden sie zu den Stressproteinen gezählt. Obwohl die HSP die bekannteste Gruppe innerhalb der Stressproteine darstellen, werden während der Stressantwort noch andere Substanzen, wie Thrombomodulin (CONMAY 1994), Tissue Type- oder Urokinase Plasminogen-Aktivator (FUKAO 1996) exprimiert. Die Antwort auf ein Stressereignis hat somit die Expression einer Vielzahl wichtiger Proteine zur Folge, die eine Wiederherstellung der intra- und extrazellulären Homöostase bewirken sollen (Abb. 2).

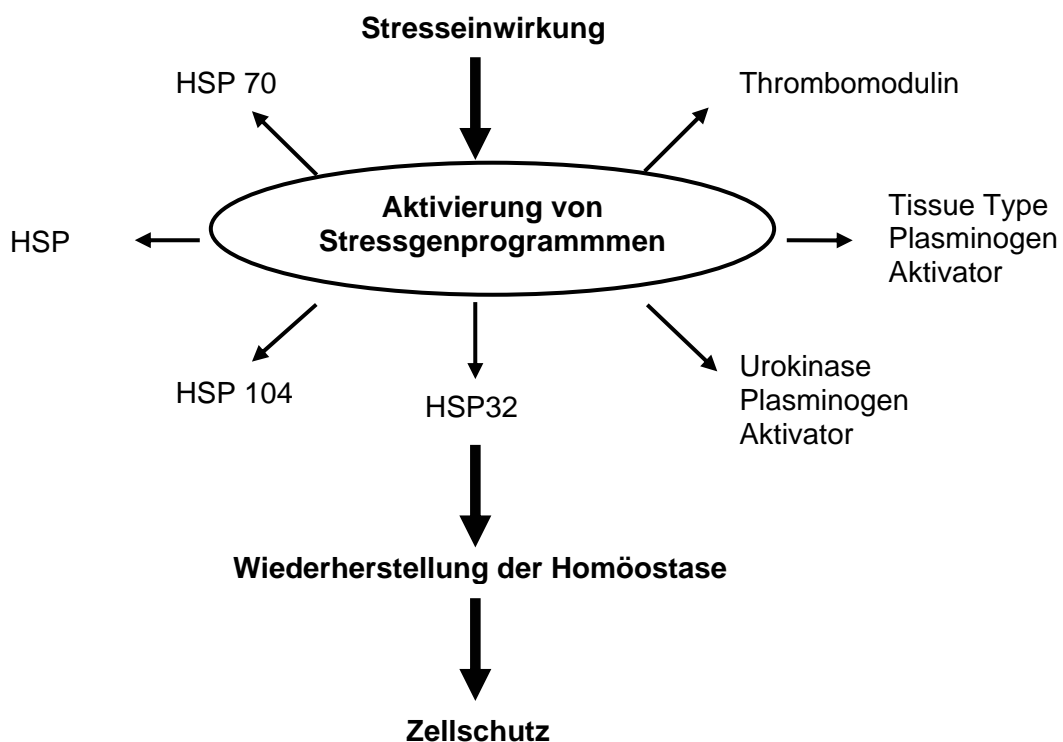


Abb.2: Schematische Darstellung der Einwirkung eines Stressereignisses auf eine Zelle und der daraufhin aktivierten Antwort.

Die Hitzeschockproteine werden innerhalb der Gruppe nach ihrem Molekulargewicht in Kilodalton (kDa) unterschieden, z. B. HSP 90, HSP 70 usw. Sie sind phylogenetisch hochkonserviert und universell bei allen Organismen zu finden. Dies gilt nicht nur für die höher entwickelten, sondern auch primitiven und einzelligen Lebewesen (BEALE 1984). Viele dieser Proteine werden nicht nur unter Stressbedingungen, sondern auch in Ruhe exprimiert. Damit erfüllen sie eine Schutzfunktion und wirken einer Schädigung der Zellen entgegen (FRACELLA 1995). Innerhalb kurzer Zeit ist die Kenntnis sowohl über die Zahl als

3. Einleitung

auch über andere Schutzmechanismen der Proteine stark expandiert (WYNN 1994). Hierzu gehört auch die Entdeckung der Hämoxxygenase (HO), welche 1968 zum ersten Mal beschrieben (TENHUNEN 1968) und 1974 als wichtiges Schutzprotein charakterisiert wurde (MAINES 1974; YOSHIDA 1974). Die Hämoxxygenase ist ein mikrosomales Enzym, dessen Bedeutung auf der Tatsache beruht, dass es den initialen und Geschwindigkeit bestimmenden Schritt im Häm-Abbau katalysiert. Hierbei erfolgt die oxidative Spaltung der α -meso-Karbonbrücke des β -Typ Häm-Moleküls in equimolare gleiche Mengen von Biliverdin-IXa, Kohlenmonoxid (CO) und Eisen (TENHUNEN 1968), (Abb. 3)

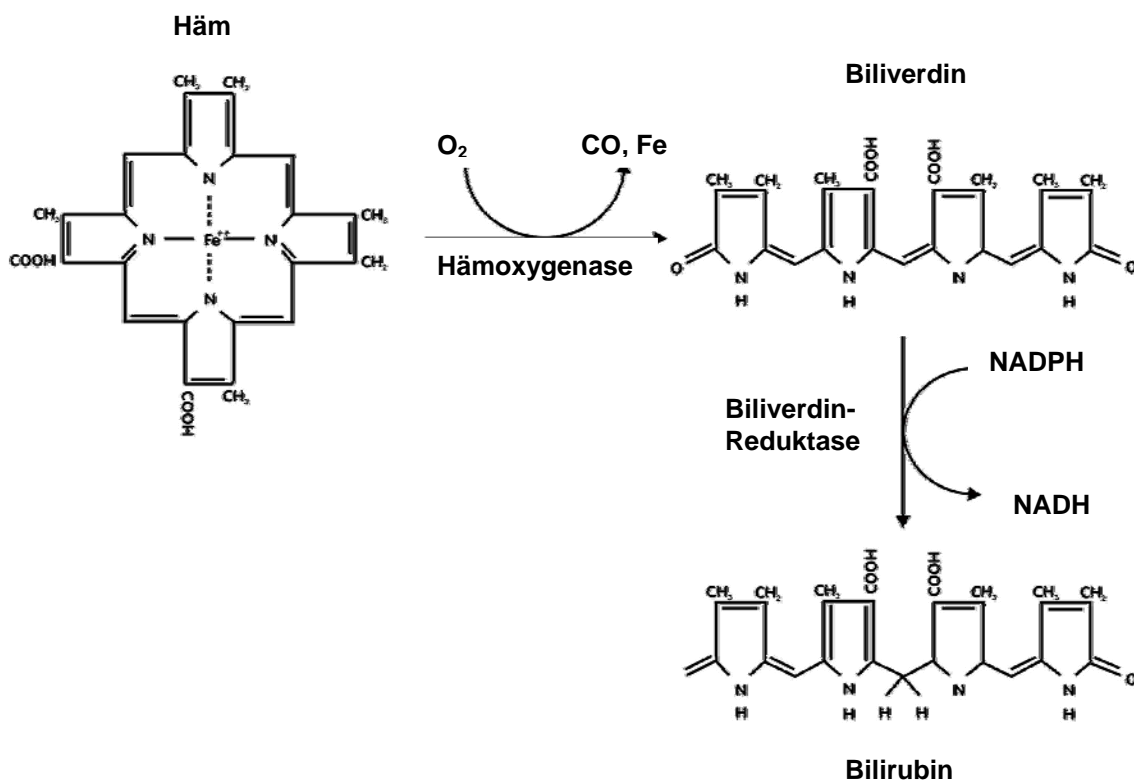


Abb. 3: Katalytische Reaktion der Hämoxxygenase (nach: AUGUSTIN 1996)

Freies zelluläres Häm ist ein Pro-Oxidant, weshalb es vor allem in höheren Konzentrationen toxisch wirkt (GUTTERIDGE 1988; BALLA 1991). Es kann zwar auch durch aktivierte Sauerstoffradikale zu Nicht-Biliverdin Pigmenten abgebaut werden (BISSEL 1980). Die Hämoxxygenase ist jedoch das effizienteste System des Häm-Abbaus und auch das einzige, welches Biliverdin und Kohlenmonoxid gleichzeitig bereitstellt (DOCHERTY 1984; KUTTY 1988). Biliverdin wird anschließend durch die Biliverdin Reduktase in Bilirubin - einem antioxidativ

3. Einleitung

wirkenden Molekül (STOCKER 1987) - reduziert (KUTTY 1981; MAINES 1988). Das in der Abbaureaktion gleichzeitig gebildete und lange nicht beachtete Kohlenmonoxid soll wie Stickstoffmonoxid (NO) die lösliche Guanylyl-Cyclase aktivieren. Das führt wiederum zu einer Zunahme des zyklischen 3' 5' Guanosinmonophosphat (cGMP) - Spiegels in der Zelle. Hierdurch agiert CO als ein zellulärer Messenger, welcher in die Regulation von multiplen Funktionen involviert ist und dabei auch den vaskulären Muskeltonus beeinflussen kann (FURCHGOTT 1991; UTZ 1991; VERMA 1993; MORITA 1995). Zuletzt wird bei der Reaktion das Eisen-Molekül aus dem Porphyrinring freigesetzt. Dieses Präoxidant ist in der Lage, die Herstellung von Sauerstoffradikalen, wie z. B. OH^\cdot , zu katalysieren (HALLIWELL 1978). Es wird schließlich an Ferritin gekoppelt, um in verschiedenen Synthesevorgängen wieder zur Verfügung stellen zu stehen.

Aufgrund dieser Merkmale nimmt man an, dass die Hämoxxygenase eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase als Antwort auf einen oxidativen Stress einnimmt. Sie kann einerseits als ein Antioxidations-Enzym durch Bereitstellung von Bilirubin die oxidativ wirkenden Metabolite, z. B. toxische Sauerstoffradikale, wie H_2O_2 , neutralisieren. Andererseits kann sie durch die Generierung des second messengers Kohlenmonoxid den vaskulären Muskeltonus im Sinne einer Vasodilatation soweit beeinflussen, dass eine ausreichende Blutversorgung im betroffenen Gebiet gewährleistet bleibt (MAINES 1988; AUGUSTINE 1996).

Die Aktivität der Hämoxxygenase wurde in allen Geweben nachgewiesen (MAINES 1988). Die Diskrepanz zwischen den unterschiedlichen Aktivitäten in den einzelnen Organen nach Induktionsversuch führte zu der Entdeckung weiterer Isoformen der Hämoxxygenase, die nicht induzierbar sind (MAINES 1986; TRAKSHEL 1986; McCOUBREY 1997). Um eine Unterscheidung zu ermöglichen, nannte man die induzierbare Form Hämoxxygenase-1 (HO-1), die nicht-induzierbaren Hämoxxygenase-2 (HO-2) (MAINES 1986), wobei alle Proteine durch verschiedene Gene kodiert werden (CRUSE 1988; KUTTY 1994; McCOUBREY 1997). HO-2, ein Protein mit einem Molekulargewicht von 36 kDa, wird in den meisten Geweben dauernd exprimiert, bevorzugt jedoch im zentralen Nervensystem und Hoden (MAINES 1988; AUGUSTINE 1996; BAUER M 1997).

3. Einleitung

Der Aktivitätsanstieg der induzierbaren Form ist die Konsequenz einer höheren Syntheserate eines 32 kDa Proteins, dessen Aktivität neben Häm-Produkten (SHIBAHARA 1978) durch eine Vielzahl anderer Induktoren - u. a. UV-Strahlung (KEYSE 1989), H₂O₂ (ALAM 1995), Hyperthermie (OKINAGA 1993), Hypoxie (LEE 1996), Schwermetalle (TAKEDA 1994; ALAM 1995) usw. - gesteigert werden kann. Initial wurde HO-1 als ein Hitzeschock (Stress) -Protein (HSP 32) identifiziert (SHIBAHARA 1987; KEYSE 1988; KEYSE 1990; EWING 1991; APPELGATE 1991). Die Aktivität dieses Proteins wurde in bisher allen getesteten Geweben gefunden, und beschränkt sich nicht nur auf Gewebe, die primär am Häm-Abbau, wie z. B. Leber und Milz, beteiligt sind (MAINES 1988; AUGUSTINE 1996). Die hohe Zahl an diversen HO-1 Induktoren widerspricht primär der Möglichkeit, dass alle den gleichen transkriptionellen Aktivierungsweg benutzen. Die durchgeführten Untersuchungen haben dabei eine Vielzahl von regulativen Promotern an der 5' Endregion des Maus-, Ratte- und menschlichen HO-1 Gens identifiziert. Hierzu gehören Promoter wie das Stress-, Interleukin-, Hyperoxie-, Hypoxie-, Hitzeschock-, Prostaglandin- sowie TPA und Cadmium-Antwort-Element (AUGUSTINE 1996). Viele der Induktoren rufen zellulären oxidativen Stress hervor, was zu der Überlegung führte, dass deren Aktivität auf einen gemeinsamen Transkriptionsfaktor zusammenläuft (AUGUSTINE 1996). Von besonderer Bedeutung scheint in diesem Zusammenhang die Generierung von reaktiven Sauerstoffradikalen zu sein, wie sie beim oxidativen Stress jeglicher Genese entstehen. Diese führen wiederum zu einer Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie NF-kappa β und Aktivatorprotein 1 und 2 (AP-1, AP-2), welche eine direkte Genaktivierung von HO-1 zur Folge haben (LAVROVSKY 1994, 2000; LU 2000). Das Zeitintervall zwischen einem Stressereignis und Aktivitätsanstieg unterliegt bei der Vielzahl der potentiellen Induktoren einer starken Variationsbreite. Allerdings konnte nach spätestens 24 Stunden die HO-1 Aktivität durch alle applizierbaren Stressinduktoren erhöht werden (MAINES 1988).

Obwohl die Hämoxygenase eine katalytische Spezifität bezüglich des Porphyrinringes zeigt, so gilt dies nicht im Hinblick auf das chelatierte Metallion. Diese Eigenschaft führt dazu, dass auch andere Metalloporphyrine an das enzymatische Zentrum binden können. Aufgrund der jedoch höheren strukturellen

3. Einleitung

Festigkeit können diese Porphyrine durch HO-1 nicht gespalten werden, was die Aufhebung der Enzymaktivität zur Folge haben kann. In diesem Zusammenhang zeigen gerade nicht physiologische Metalloporphyrine eine starke Affinität zu HO-1. Dieses ist wiederum meistens mit einer kompetitiven Aktivitätsblockade dieses Enzyms vergesellschaftet. Zu diesen gehören Zinn- (Sn), Zink- (Zn), Chromat- (Cr) und Mangan (Mn)-Protoporphyrine (SnPP, ZnPP, CrPP, MnPP) (DRUMMOND 1981; MAINES 1981; KAPPAS 1984, 1986; MAINES 1988) sowie die entsprechenden Mesoporphyrine, wobei diese eine noch höhere Affinität zur Hämoxygenase als die Protoporphyrine aufweisen.

Die beiden Eigenschaften der Hämoxygenase-1 - Gewebeprotektion durch antioxidative und gefäßerweiternde Wirkung sowie die Möglichkeit der Aktivitätsblockade durch Metall-Porphyrine - versuchte man schon frühzeitig in der klinischen Medizin zu nutzen. Gerade die Möglichkeit der Inhibition wollte man im Hinblick auf die Hyperbilirubinämie im Säuglingsalter (QATO 1985) sowie die biliärer Zirrhose und das Gilbert-Syndrom (KAPPAS 1984) therapeutisch zu nutzen. Untersuchungen zeigten jedoch, dass diese Substanzen unerwünschte Nebenwirkungen hervorrufen, was einen breiten Einsatz in der klinischen Medizin verhinderte. Hierzu gehören z. B. die Fotosensibilisierung mit nachfolgenden fototoxischen Reaktionen bei Lichtexposition (McDONAGH 1985) oder die negativen Wechselwirkungen mit anderen metabolischen wichtigen Faktoren, wie z. B. dem Glutathionstoffwechsel (MAINES 1987). Die möglichen protektiven Eigenschaften der Hämoxygenase haben in den vergangenen Jahren jedoch an Interesse gewonnen.

3.5. Präkonditionierung

Eine mögliche Strategie zum Schutz verschiedener Gewebe vor Schädigung durch Ischämie und anschließender Reperfusion ist die Präkonditionierung mit dem Ziel einer präventiven Toleranzentwicklung. Hierunter versteht man eine Reaktion von Geweben oder Organen, nach einer definierten Vorbehandlung mit einer höheren Toleranz auf einen später einwirkenden Reiz, der primär das Gewebe schädigen würde, zu antworten.

3. Einleitung

Grundsätzlich unterscheidet man drei Arten der Präkonditionierung: Gentherapie, chirurgische oder pharmakologische Vorbehandlung.

Bei dem sich noch im experimentellen Stadium befindlichen gentherapeutischen Verfahren werden durch Zellen oder organspezifische Viren mit hoher Infektionsrate, wie dem modifizierten rekombinanten Adenovirus, Gene in das Genom eingeschleust, die eine veränderte Transkription und somit Proteinsynthese zur Folge haben (DRAZAN 1995). Zu den erfolgreichen Verfahren gehört z.B. die Einschleusung von Genen wie Bcl-2 und Bag-1, die eine Regulation des programmierten Zelltodes (Apoptose) bewirken (TAKAYAMA 1995), wobei Bcl-2 eine wichtige Rolle beim Schutz des Herzens gegen Myokardinfarkt zu spielen scheint (MAULIK 1999).

Als ischämische Präkonditionierung bezeichnet man einen Vorgang, bei dem die Gewebedurchblutung im betreffenden Organ für eine bestimmte Zeit reduziert oder unterbrochen wird. Erreicht wird dieses durch eine entweder nur wenige Minuten dauernde Unterbrechung der Blutzirkulation im Organ, z. B. in der Leber durch das Pringle Manöver (KUME 1996) oder durch eine länger andauernde Reduzierung der nutritiven Blutversorgung (KUBULUS 2004). Diese Methode führt in der Zelle zu einer Stressreaktion, die eine nachfolgende Toleranzerhöhung gegenüber einem nachfolgenden Stressereignis bewirkt. Als mögliche Mediatoren der generierten Protektion werden neben Adenosin (PERALTA 1997), NO (PERALTA 1996) und TNF- α (PERALTA 2001) vor allem jedoch die durch den oxidativen Stress induzierte Proteinexpression verschiedene Hitzeschockproteine, insbesondere der HO-1 (REDAELLI 2002; KUBULUS 2004) diskutiert.

Obwohl dieses Phänomen ursprünglich am Myokard entdeckt wurde (MURRY 1986) konnte es im weiteren Verlauf auch bei einer Vielzahl von anderen Geweben wie Skelettmuskel (PANG 1995), Gehirn (GLAZIER 1994), Rückenmark (SAKURAI 1998), Niere (TURMAN 1997), Retina (ROTH 1998), Lunge (DU 1996), Darm (HOTTER 1996), Haut (KUBULUS 2004) und Leber (HARDY 1996; PERALTA 1996; YADAV 1999; CLAVIEN 2000) nachgewiesen werden.

Die pharmakologische Präkonditionierung basiert auf dem Verfahren einer Toleranzsteigerung gegenüber einem Stressereignis durch die Applikation eines Pharmakons. Tierexperimentell konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass eine Konzentrationszunahme von Adenosin (OLSSON 1970; PARRAT 1994) oder NO (PERALTA 1996) nach Präkonditionierung mit Adenosinrezeptoragonisten und

3. Einleitung

NO-Donatoren wie L-Arginin, sowohl im Myokard als auch in der Leber (PERALTA 1997) eine starke Protektion vor ischämischer Schädigung bewirkt. Darüber hinaus konnte BALLA (1993), VERCELLOTTI (1994) und VILE (1994) in in-vitro Versuchen zeigen, dass eine Induktion der HO-1 Expression durch eine Vorbehandlung von Zellkulturen mit UV-A-Strahlung oder Inkubation mit Häm diese widerstandsfähiger gegen nachfolgenden oxidativen Stress machte. Eine entsprechende Protektion konnte auch NATH (1992) in einem tierexperimentellen in-vivo Modell nachweisen. Hierbei konnte durch Induktion der HO-1 Expression nach Hämin-Präkonditionierung sowohl das durch Rhabdomyolyse hervorgerufene Nierenversagen als auch die Mortalitätsrate stark vermindert werden.

Einhergehend mit den positiven Wirkungen einer Präkonditionierung auf den Organschaden und den protektiven Effekten einer induzierten HO-1 Aktivität, ist es durchaus vorstellbar, beide Eigenschaften zu kombinieren, in dem man selektiv HO-1 durch eine pharmakologische Präkonditionierung induziert.

3.6. Diaspirin-quervernetztes Hämoglobin (DCLHb)

Trotz verbesserter Überwachung von Blutprodukten können Infektionen wie Hepatitis, Herpes, HIV, Syphilis oder Malaria absolut ausgeschlossen werden, wie ABO-Unverträglichkeiten oder die Verwendung falscher oder schlecht gelagerter Blutkonserven. Aufgrund dieser Tatsachen sowie der abnehmenden Blutspendebereitschaft der Bevölkerung wurde seit Mitte des letzten Jahrhunderts (AMBERSON 1949) die Entwicklung verschiedener künstlicher Sauerstoffträger (hemoglobin based oxygen carriers, HBOC) als Alternative zur allogenen Bluttransfusion forciert. Die meisten Hämoglobinderivate werden aus verfallenen Blutkonserven oder Rindererythrozyten hergestellt, wobei das Risiko der Übertragung viraler Infektionen durch Ultrafiltration und Hitzebehandlung des zellfreien Hämoglobins minimiert wird.

In der frühen Phase der Entwicklung künstlicher Sauerstoffträger bediente man sich zellfreier Hämoglobinlösungen (SAVITZKY 1978). Die Anwendung dieser Substanzen führte zwar zu einem gleichzeitigen Anstieg des arteriellen Blutdrucks begleitet von einer Reflexbradykardie ohne jedoch eine adäquate

3. Einleitung

Sauerstoffversorgung des Gewebes zu erzielen. Zusätzlich manifestierte sich im weiteren Verlauf der Behandlung eine zunehmende Niereninsuffizienz bis zum Nierenversagen. Als Ursache dieser negativen Eigenschaften wird einerseits die Entfernung des Hämoglobins aus den Erythrozyten und der damit verbundene Verlust von 2,3-Bisphosphoglycerat, was zu einer Linksverschiebung der Sauerstoffbindungskurve und damit eine verminderte Sauerstoffabgabe an das Gewebe zur Folge hat, diskutiert (WINSLOW 2000). Andererseits zerfällt das aus den Erythrozyten isolierte Hb-Tetramer spontan in Di- und Monomere, welche aufgrund ihrer Molekülgröße leicht filtriert werden, hierdurch in den Tubulie präzipitieren und somit zur Niereninsuffizienz führen (ROGERS 1995). Durch verfeinerte chemische und gentechnologische Methoden gelang es zwar hoch gereinigte Hämoglobinderivate herzustellen, die eine geringere renale Toxizität aufwiesen, eine Verbesserung der Gewebeoxygenierung konnte dabei jedoch nicht erreicht werden.

Erst die Quervernetzung des Hämoglobins mit 3,5-bis-Dibromsalicylfumerat (DBBF) durch eine Polymerisierungsreaktion der beiden Aminosäuren Lys α_1 99 und Lys α_2 99 schützte vor der Dissoziation des Tetramers in Dimere, verlängerte somit die intravasale Retention, eliminierte die renale Toxizität und führte zu einer Rechtsverschiebung der Sauerstoffbindungskurve, was eine erleichterte Sauerstoffabgabe im Gewebe zur Folge hat (vergleichbar mit der Erhöhung von 2,3-DPG in Erythrozyten). Dieses als $\alpha\alpha$ HB bezeichnete Produkt wurde zunächst durch das Letterman Institut im Auftrag der US-Army entwickelt und nachfolgend die Forschungen an der leicht modifizierten Substanz durch Baxter Healthcare (Diaspirin-quervernetztes Hämoglobin, "DCLHb") mit dem Ziel einer industriellen Produktion weitergeführt.

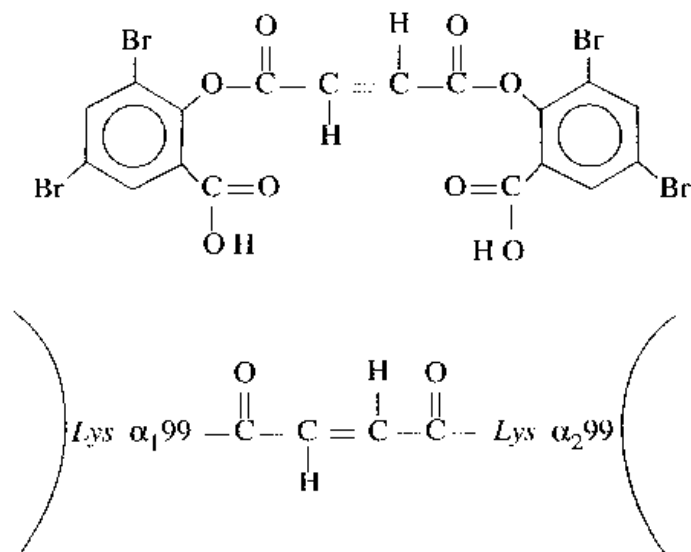


Abb. 4: Chemische Struktur von DCLHb (WINSLOW 2000)

Über 100 präklinische Studien untersuchten in verschiedenen Tiermodellen die Sicherheit und Wirksamkeit von DCLHb als künstlicher Sauerstoffträger. Nach hämorrhagischen Schock war zum Beispiel die Reperfusion mit DCLHb wirksamer als Ringerlactatlösung zur Wiederherstellung eines ausreichenden arteriellen Blutdrucks und einer adäquaten Gewebeoxygenierung (SPAHM 2005). Die Studien zeigten ein Wirkprofil ohne Antigenität, Antigen- oder Komplementaktivierung und ohne Nephrotoxizität (SPAHM 2005). Wegen der mit Blut vergleichbaren Eigenschaften schien DCLHb ein viel versprechender Blutersatzstoff zu sein (MONDORO 1998; CHANG TM 1992; EVERSE 1997), obwohl die Applikation dieser Substanz auch zu einer dosisabhängigen Zunahme des arteriellen Mitteldrucks mit Reflexbradykardie führte (GULATI 1994, 1995, 1998).

Trotz der erfolgversprechenden Vorversuche und der positiven Eigenschaften musste 1998 das Zulassungsverfahren von DCLHb eingestellt werden, nachdem in zwei voneinander unabhängigen Phase III Studien die Verwendung dieser Substanz zu einer erhöhten Letalität bei Trauma- (SLOAN 1999) bzw. Schlaganfallpatienten (SAXENA 1999) führte.

Als wesentlichen Grund dieser deletären Wirkung wird eine Vasokonstriktion mit konsekutivem Blutdruckanstieg durch eine direkte Stimulation der Arteriolen sowie eine gesteigerte NO-Affinität des azellulären Hämoglobins diskutiert (WINSLOW

3. Einleitung

2000). NO aktiviert die Guanylatcyclase und erhöht damit die intrazelluläre Bildung des second messengers cGMP, welches wiederum zu einer Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur und dadurch zur Vasodilatation führt (SEN 1998). Dieser Pathomechanismus scheint insbesondere auf dem Gebiet der Mikrozirkulation eine wichtige Rolle in der Regulation der Durchblutung und somit in der nutritiven Versorgung des Gewebes einzunehmen (WINSLOW 2000). Entsprechend könnte eine durch DCLHb hervorgerufene NO-Bindung eine gestörte Mikrozirkulation im Endstromgebiet mit Organschädigung zur Folge haben (HESS 1993; WINSLOW 2000, 2003). Aufgrund dieser Nebenwirkungen steht DCLHb nicht mehr für die klinische Anwendung als Blutersatzstoff zur Verfügung.

Wie bereits zuvor beschrieben ist Hämoglobin jedoch das Substrat und somit der stärkste Induktor der HO-1. Deshalb ist es durchaus vorstellbar, dass die Applikation von DCLHb zu einer Induktion der HO-1 Proteinexpression führt. Entsprechend steht in der vorliegenden Arbeit nicht die Sauerstoff transportierende Eigenschaft dieser Substanz im Vordergrund. Vielmehr sollte untersucht werden, ob eine frühzeitige und somit hämodynamisch neutrale Präkonditionierung mit DCLHb, über die Induktion der HO-1 Proteinexpression und der damit verbundenen Generierung der protektiven Endprodukte, zu einer Verminderung der durch einen hämorrhagischen Schock - als Sinnbild einer low-flow Ischämie - verursachten Organschäden führt.

3.7. Häminarginat (HAR)

Häminarginat, eine Hämin-basierte Lösung ohne Sauerstofftransportkapazität, ist eine etablierte Substanz in der Behandlung der akuten hepatischen Porphyrie (MUSTAJOK P 1986, 1993).

Bei den Porphyrien handelt sich um eine Gruppe von vererbaren Erkrankungen, von denen jede mit einem Defekt an einem der an der Häm-Biosynthese beteiligten Enzyme verbunden ist. Hierdurch führt eine erniedrigte Häm-Konzentration über die Aktivierung der δ -Aminolaevulinsäure-Synthetase zu einer kompensatorisch gesteigerten Neusynthese von Häm-Vorstufen und gewissen Porphyrinen, welche jedoch nicht weiter verstoffwechselt werden können. Hieraus ergibt sich eine Anhäufung dieser Vorstufen, die direkt oder indirekt toxisch für den

3. Einleitung

Organismus sind und für die Symptome der Erkrankung mit verantwortlich sind. Die Verabreichung von HAR führt zu einer Korrektur des Hämmangels, was wiederum durch negative Rückkopplung die Aktivität der δ -Aminolaevulinsäure-Synthetase hemmt und somit die Überproduktion an toxischen Vorstufen des Häms reduziert (BONKOWSKY 1971; WATSON 1973; DHAR 1975).

Im Gegensatz zu DCLHb weist HAR keine NO-Affinität und keine vasokonstringierende Eigenschaft mit konsekutiver Blutdrucksteigerung auf (Tenhunen R 1987; MARTASEK P 1991).

Hämin ist nicht nur eine Häm-Vorstufe sondern wie Häm auch das Substrat der Hämoxygenase. Entsprechend stellt Häminarginat eine mögliche Substanz zur Induktion der HO-1 dar (KOBAYASHI 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb HAR nicht als Therapeutikum sondern als Vergleichssubstanz zur Induktion der HO-1 ohne hämodynamische Auswirkungen benutzt.

3.8. Ziel der Studie

In der vorliegenden Arbeit sollten folgende Fragen geklärt werden:

- Führt die Vorbehandlung mit DCLHb bzw. HAR zur Expression der Hämoxygenase-1 in unterschiedlichen Organen?
- Hat die Vorbehandlung eine Auswirkung auf den durch hämorrhagischen Schock verursachten Organschaden und welche Rolle spielt die Induktion der Hämoxygenase-1 bei diesen Auswirkungen?