

*Aus der Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie,
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Univ.-Professor Dr. Reinhard Larsen*

**Häminarginat-induzierte Hämoxygenase-1-Expression
verbessert die Lebermikrozirkulation und vermittelt eine
anti-inflammatorische Zytokinantwort nach
hämorrhagischem Schock**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES**

2009

vorgelegt von: Jochen Heiser
geb. am: 25.06.1978 in Konstanz

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Summary: Hemin Arginate-induced Heme Oxygenase-1 expression improves liver microcirculation and mediates an anti-inflammatory cytokine response after hemorrhagic shock.....	2
3. Einleitung	3
3.1 Physiologische Grundlagen	3
3.1.1 Aufbau der Leber	3
3.1.2 Die Mikrozirkulation der Leber	5
3.1.3 Das Hämoxxygenase-System	7
3.2 Klinische Bedeutung	8
3.2.1 Organversagen nach hämorrhagischem Schock	8
3.2.2 Hepatozelluläre Veränderungen im hämorrhagischen Schock	11
3.2.3 Zytokinantwort im hämorrhagischen Schock	13
3.3 Präkonditionierung	14
3.4 Auswirkungen der HO-1-Induktion durch Präkonditionierung	15
3.5 Modell des hämorrhagischen Schocks	16
3.6 Fragestellung	19
4. Material und Methodik	20
4.1 Versuchstiere	20
4.2 Versuchsdesign	20
4.2.1 Versuchsgruppen	20
4.2.2 Versuchsprotokolle	21
4.3. Versuchsdurchführung.....	22
4.3.1 Anästhesie der Versuchstiere	22
4.3.2 Pharmakologische Vorbehandlung	23
4.3.3 Chirurgische Präparation	23
4.3.3.1 Besonderheit Gruppe HAR + SnMP-IX	25
4.3.3.2 Besonderheit Gruppe HAR + SnMP-IX + DCM	25
4.3.4 Hämorrhagischer Schock und Reperfusion	25
4.3.5 Intravitalmikroskopie.....	26
4.3.5.1 Chirurgische Vorbereitung.....	26

4.3.5.2 Durchführung.....	27
4.4 Applizierte Lösungen	29
4.4.1 Vollelektrolytlösung.....	29
4.4.2 Häminarginat (HAR)	29
4.4.3 Zinn-Mesoporphyrin-IX (SnMP-IX)	29
4.4.4 Dichlormethan (DCM).....	29
4.4.5 Fluorescein-Isothiocyanat-Lösung.....	29
4.5 Fluoreszenz-Zell-Markierung	30
4.6 Erfassung der Untersuchungsparameter	30
4.6.1 Western Blot	30
4.6.2 Hämodynamik.....	32
4.6.3 Intravitalmikroskopische Auswertung	32
4.6.3.1 Mitochondrialer Redox-Status	32
4.6.3.2 Anzahl der perfundierten Sinusoide (pS).....	32
4.6.3.3 Mittlerer sinusoidaler Durchmesser (Ds)	33
4.6.3.4 Erythrozyten-Geschwindigkeit (V_{Ery}).....	33
4.6.3.5 Volumetrischer Blutfluss (VBF).....	33
4.6.4 Bestimmung der Zytokinspiegel im Serum	34
4.6.5 Bestimmung der Leberenzyme im Serum	36
4.7 Blutgasanalyse.....	36
4.8 Statistik	37
4.8.1 Berechnung der Versuchstierzahl und Nullhypothesen.....	37
4.8.2 Statistische Auswertung	37
4.8.3 Grafische Darstellung der Ergebnisse	37
5. Ergebnisse.....	38
5.1 HO-1-Proteinexpression im Lebergewebe	38
5.2 Makrohämodynamik	39
5.3 Blutgasanalyse	41
5.4 Hepatozellulärer Schaden nach Hämorrhagie und Reperfusion	43
5.5 Intravitalmikroskopische Auswertung	44
5.5.1 Parameter der sinusoidalen Perfusion	44
5.5.1.1 Sinusoidaler Durchmesser	44
5.5.1.2 Anzahl der perfundierten Sinusoide	44
5.5.1.3 Mittlere Erythrozytengeschwindigkeit.....	47

5.5.1.4	Volumetrischer Blutfluss	47
5.5.2	Mitochondrialer Redox-Status	49
5.6	Zytokinspiegel im Serum (TNF- α und IL-10)	52
5.7	Zusammenfassung der Ergebnisse	54
6.	Diskussion	55
6.1	Problemstellung	55
6.2	Diskussion von Material und Methodik	56
6.2.1	Tiermodell	56
6.2.2	Hämorrhagischer Schock	57
6.2.3	Intravitalmikroskopie	58
6.2.4	Messmethoden	60
6.3	Diskussion der Ergebnisse	62
6.4	Schlussfolgerung	68
7.	Literaturverzeichnis	69
8.	Publikationen	86
9.	Danksagung	87
10.	Lebenslauf	88

1. Zusammenfassung

Mikrovaskuläres Perfusionsversagen stellt eine der Hauptursachen für die Entwicklung einer hepatozellulären Dysfunktion nach hämorrhagischem Schock dar. Diese kann zu Leberversagen und Multiorganversagen führen, welches heute noch immer eine der Haupt-Todesursachen darstellt. Die Induktion der Hämoxigenase (HO)-1 könnte eine hepatozelluläre Protektion vermitteln. Häminarginat (HAR) induziert die HO-1 und schützt vor schockinduziertem Organversagen. Die genauen Mechanismen dieser Protektion sind nicht hinreichend geklärt, aber eine durch HO-1 vermittelte Verbesserung der Mikrozirkulation und anti-inflammatorische Antwort könnte hierzu beitragen. Daher war das Ziel der vorliegenden Studie, den Einfluss einer HAR-Vorbehandlung auf die Lebermikrozirkulation und die Immunantwort nach hämorrhagischem Schock zu untersuchen.

24 Stunden nach Vorbehandlung mit Vollelektrolytlösung (Vehikel) oder HAR wurden männliche Sprague-Dawley-Ratten (200-300g; n=8/Gruppe) einem hämorrhagischen Schock unterzogen (MAP: 30–40mmHg für 1 Stunde) gefolgt von einer zweistündigen Reperfusion. Die Mikrozirkulation und der Redox-Status (NAD(P)H-Autofluoreszenz) der Leber wurden mittels Intravitalmikroskopie analysiert. Die Zytokinspiegel im Serum (IL-10 und TNF- α) wurden mittels ELISA quantifiziert.

24 Stunden nach Vorbehandlung mit HAR konnte eine deutliche HO-1-Induktion festgestellt werden. Hämorrhagie reduzierte signifikant die sinusoidale Perfusion und erhöhte die NAD(P)H-Autofluoreszenz sowie die Zytokinspiegel im Serum. Vorbehandlung mit HAR verbesserte gegenüber der Vorbehandlung mit Vehikel die Lebermikrozirkulation signifikant und reduzierte die NAD(P)H-Autofluoreszenz. Weiterhin wurde die Zytokin-Freisetzung zugunsten einer anti-inflammatorischen Antwort moduliert, was sich in signifikant erhöhten IL-10 und reduzierten TNF- α -Werten im Serum widerspiegelte. Die Blockade des HO-Stoffwechsels mittels Sn-Mesoporphyrin-IX (SnMP-IX) nach Vorbehandlung mit HAR verhinderte die beobachteten positiven Effekte, während die zusätzliche Gabe des CO-Donors Dichlormethan die SnMP-IX-vermittelten Veränderungen wieder aufhob.

Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Vorbehandlung mit HAR zu einer Verbesserung der Mikrozirkulation der Leber und einer anti-inflammatorischen Zytokinantwort nach hämorrhagischem Schock führt. Diese Veränderungen werden mittels HO-1-Induktion und teilweise über erhöhte CO-Freisetzung vermittelt.

2. Summary

Hemin Arginate-induced Heme Oxygenase-1 expression improves liver microcirculation and mediates an anti-inflammatory cytokine response after hemorrhagic shock

Microvascular perfusion failure is a major determinant for the development of hepatocellular dysfunction after hemorrhagic shock. Induction of Heme Oxygenase (HO)-1 may confer hepatocellular protection. Hemin arginate (HAR) induces HO-1 and protects against shock-induced organ failure. The mechanisms are not completely understood, but HO-1-mediated protective effects on microcirculation and inflammatory response may contribute. Therefore, the aim of this study was to investigate the influence of HAR pretreatment on liver microcirculation and cytokine response to assess the role of HO-1-mediated effects under these conditions.

24 hours after pretreatment with Ringer-solution (vehicle) or HAR, male Sprague-Dawley rats (200-300g; n=8/Gruppe) were subjected to hemorrhage (MAP: 30–40 mmHg for 1 hour), followed by 2 hours of resuscitation. Microcirculation and redox state (NADPH-autofluorescence) of the liver were assessed using intravital microscopy. Cytokine levels (TNF- α and IL-10) were quantified using an enzyme-linked immunoabsorbent assay.

A profound induction of HO-1 was observed 24h after pretreatment with HAR. Hemorrhage significantly reduced sinusoidal perfusion and increased NADPH autofluorescence and cytokine levels. HAR pretreatment significantly improved sinusoidal microcirculation and reduced NADPH autofluorescence. Furthermore, the cytokine release was shifted to an anti-inflammatory response, as suggested by significantly increased IL-10 and decreased TNF- α serum levels compared with shock vehicle. Blockade of the HO pathway with tin-mesoporphyrin-IX after HAR pretreatment abolished the observed effects, whereas the additional administration of the carbon monoxide donor dichloromethane reversed the tin-mesoporphyrin-IX-mediated changes.

These results suggest that HAR pretreatment improves liver microcirculation and mediates an anti-inflammatory cytokine response after hemorrhagic shock through induction of HO-1 and in part through an increased carbon monoxide release.

3. Einleitung

3.1 Physiologische Grundlagen

3.1.1 Aufbau der Leber

Die Leber ist eines der komplexesten Organe des Organismus und nimmt zahlreiche vitale Funktionen wahr. Hierzu gehören die Aufnahme von Aminosäuren, Kohlenhydraten, Cholesterol, Proteinen, Lipiden und Vitaminen zur Speicherung oder Metabolisierung dieser Substanzen beispielsweise in der Proteinbiosynthese, Glukoneogenese oder Gallensäuren-Konjugation. Des Weiteren werden toxische Stoffwechselprodukte durch die Leber eliminiert, zusätzlich nimmt sie eine wesentliche Rolle als Immunorgan ein (Malarkey 2005). Aufgrund dieser Funktionen ist die Leber von zentraler Bedeutung im menschlichen Organismus.

Die Leber setzt sich aus einer Vielzahl verschiedener Zelltypen zusammen. Grundsätzlich werden parenchymatöse von nicht-parenchymatösen Zellen unterschieden. Die Hepatozyten bilden die Population der parenchymatösen Zellen, welche mit einem Anteil von 80% am Lebervolumen und 60% an der Gesamtzellzahl der Leber auch die quantitativ bedeutsamste Zellpopulation darstellt (Kmiec 2001; Malarkey 2005). Ihre Aufgaben umfassen Synthese- und StoffwechsellLeistungen und wichtige Exkretionsleistungen wie z.B. die Konjugation und Exkretion von Bilirubin oder Steroidhormonen. Zu den wesentlichen Stoffwechselfunktionen der Parenchymzellen gehören der Protein- und Aminosäurestoffwechsel, die Harnstoffbiosynthese, die Glukoneogenese und die Metabolisierung von Xenobiotica über das Cytochrom-P₄₅₀-System.

Die nicht-parenchymatösen Leberzellen bilden zwar nur etwa 6,5% des Lebervolumens, stellen jedoch zahlenmäßig 40% der Zellpopulation der Leber dar und setzen sich aus sinusoidalen Endothelzellen, Kupfferzellen und Ito-Zellen zusammen (Bouwens 1992; Kmiec 2001).

Dabei sind die sinusoidalen Endothelzellen mit bis zu 20% der Leberzellen die von der Anzahl her bedeutendsten nicht-parenchymatösen Zellen. Sie stellen einen hochspezialisierten Endothelzellverband dar, der sich in wesentlichen morphologischen und funktionellen Aspekten, wie der besonderen Fenestrierung, einer fehlenden Basalmembran und einer Vielzahl von Oberflächenrezeptoren zur

Endozytose von Makromolekülen, von Endothelzellen anderer Gefäßabschnitte unterscheidet (Wisse 1996; Braet 2002; Enomoto 2004; Smedsrod 2004).

Kupfferzellen sind ortsständige Makrophagen der Sinusoide und spielen bei den Detoxifikationsvorgängen über Filterfunktion und Mediatorenfreisetzung eine wichtige Rolle. Außerdem sind sie insbesondere für die Pathophysiologie des Schocksyndroms von wesentlicher Bedeutung. Kupfferzellen repräsentieren den größten ortsständigen Makrophagenpool. 60% aller Makrophagen des Körpers befinden sich in der Leber. Ihre wichtigsten Funktionen bestehen in der direkten (unspezifischen) Eliminierung von Mikroorganismen und Tumorzellen durch Phagozytose und Endozytose sowie in der Unterstützung des spezifischen lymphozytären Immunsystems durch Antigenpräsentation und kostimulatorische Zytokinproduktion (z.B.: reaktive Sauerstoffmetaboliten (ROS), Eicosanoide, NO, CO, TNF- α) (Bouwens 1992; Wisse 1996; Kmiec 2001; Naito 2004; Wake 2004; Malarkey 2005). Zusätzlich spielen Kupfferzellen bei der Regulation des Häm-Stoffwechsels und der Bilirubin-Exkretion über die Expression von Hämoxygenase-1 eine wichtige Rolle (Hirano 2001; Kobayashi 2002).

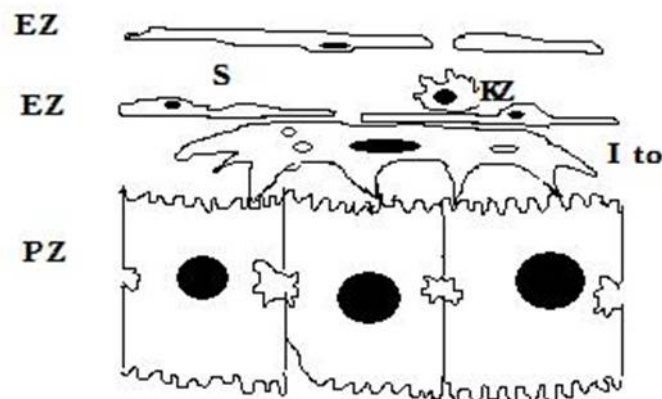


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Zelltypen der Leber und deren Lokalisation in Bezug auf die Sinusoide. Die Ito-Zellen (Ito) sind im perisinusoidalen Raum zwischen Endothelzellen und Parenchymzellen lokalisiert. S: Sinusoid; KZ: Kupfer-Zelle; EZ: Endothelzellen; PZ: Parenchymzellen (nach: SATO et al.: *Hepatic Stellate Cells: Unique Characteristics in Cell Biology and Phenotype. Cell Struct Funct.*, 28(2): 105-12, 2003).

10% der nicht-parenchymatösen Zellen werden als Itozellen bezeichnet. Sie werden auch hepatische Sternzellen oder Fettspeicherzellen genannt. Sie entsprechen den Perizyten des perisinusoidalen Raums, deren Zellen als morphologisches Charakteristikum eine hohe Dichte an perinukleären Fetttröpfchen aufweisen, der abluminalen Oberfläche der sinusoidalen Endothelzellen aufliegen und mit ihren bis zu 40 µm langen dendritischen Zellausläufern Kontakt zu den Parenchymzellen herstellen. Sie speichern unter physiologischen Bedingungen in ihren Fetttröpfchen über 80% des Gesamtkörperbestandes an Vitamin A (Suematsu 1993; Sato 2003). Neben ihrer Speicherfunktion sind sie auch - aufgrund kontraktiler Elemente aus Alpha-SM-Actin in den Dendriten – für die Regulation der Lebersinusoiddurchmesser und somit der Mikrozirkulation verantwortlich (Skalli 1989; Kawada 1993; Rensing 2002).

3.1.2 Die Mikrozirkulation der Leber

Der Begriff Mikrozirkulation beschreibt den Blutfluss durch das Gefäßnetzwerk zwischen Arteriolen und Venolen und umfasst Kapillargebiet, Metarteriolen und arteriovenöse Anastomosen. Jedes Organ besitzt abhängig von seiner Funktion ein unterschiedliches mikrozirkulatorisches Gefäßnetzwerk. In der Leber wird die Mikrozirkulation aus zwei afferenten Gefäßen versorgt: der terminalen portalen Venole, welche aus dem intrahepatischen portalvenösen System hervorgeht und der terminalen hepatischen Arteriole, welche aus der A. hepatica hervorgeht. Dem kapillären Gefäßbett entsprechen im Leberparenchym die Sinusoide. Das efferente Gefäßbett besteht aus terminaler hepatischer Venole und hepatischer Venole (Wisse 1970; Oda 2003).

Vasoaktive Substanzen, die durch Stressereignisse induzierbar sind, scheinen einen bedeutenden Einfluss auf die Gefäßweite und hierdurch auf die Perfusionsheterogenität im mikrovaskulären Perfusionsversagen zu haben. Hierzu gehören Stickstoffmonoxid (NO), Kohlenmonoxid (CO) und Endothelin-1 (ET-1) (Suematsu 1996; Clemens 1997; Pannen 1997; Oda 2003). Dabei weisen NO und CO vasodilatierende, ET-1 vasokonstriktive Eigenschaften auf. NO führt über die Aktivierung der löslichen Guanylyl-Cyclase zu einer Zunahme des zyklischen 3'5'Guanosinmonophosphat (cGMP), welches wiederum über die Blockade der intrazellulären Kalzium-Freisetzung eine Relaxation der glatten Muskulatur und

dadurch eine Gefäßdilataion bewirkt (Furchgott 1991; Morita 1995; Morita 1995; Zabel 2002).

CO, ein zu NO isoelektrisches weiteres gasförmiges Monooxid, führt ebenfalls zur Aktivierung der löslichen Guanylyl-Cyclase und damit zu Vasodilatation. In der Leber unterstützt CO im portalvenösen, und damit auch im sinusoidalen Gefäßbett einen entspannten Gefäßtonus (Moncada 1993; Suematsu 1995; Pannen 1998). Gerade unter Stressbedingungen scheint CO durch Vasodilatation für die Aufrechterhaltung der Perfusion in der Leber eine wichtige Rolle zu spielen. Hauptquelle von CO ist die oxidative Spaltung von Häm, welche durch die Hämoxxygenase katalysiert wird.

Die durch NO und CO induzierte Vasodilatation im sinusoidalen Gefäßbett scheint dabei über die Beeinflussung der kontraktile Elemente von Ito-Zellen vermittelt zu sein (Kawada 1993; Rensing 2002).

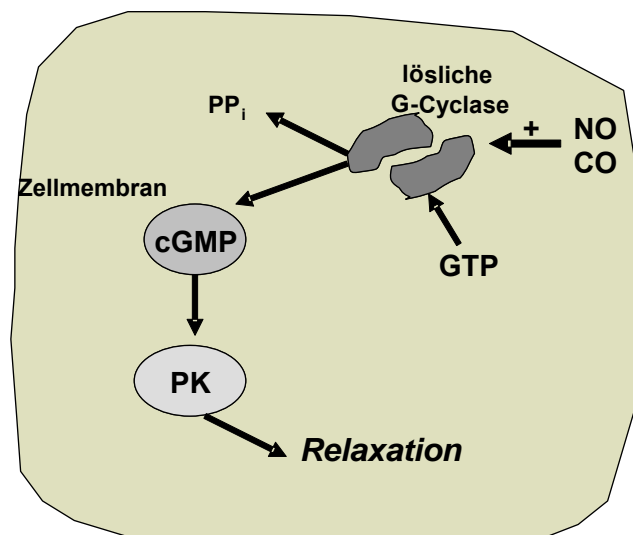


Abbildung 2: Schematische Darstellung der NO/CO-Wirkung über die lösliche Guanylyl-Cyclase in einer Zelle der glatten Muskulatur. PK=Proteinkinase, PP_i=Pyrophosphat

Im Gegensatz zu NO und CO bewirkt ET-1 im sinusoidalen Gefäßbett eine Vasokonstriktion. Dabei wird die ET-1 Wirkung vor allem über ET-Rezeptoren auf Ito-Zellen vermittelt, wodurch es zur Verkürzung der kontraktile Elemente und damit zur Verringerung des Gefäßdurchmessers kommt (Zhang 1994; Zhang 1995; Rensing 2002).

3.1.3 Das Hämoxygenase-System

Das Hämoxygenasesystem setzt sich aus 3 Subtypen (HO-1, HO-2, HO-3) zusammen und katalysiert die initiale und geschwindigkeitsbestimmende Reaktion der Hämdegradation, den oxidativen Abbau von Häm zu equimolaren Mengen Kohlenmonoxid (CO), Biliverdin und Eisen (Tenhunen 1968; Maines 1988).

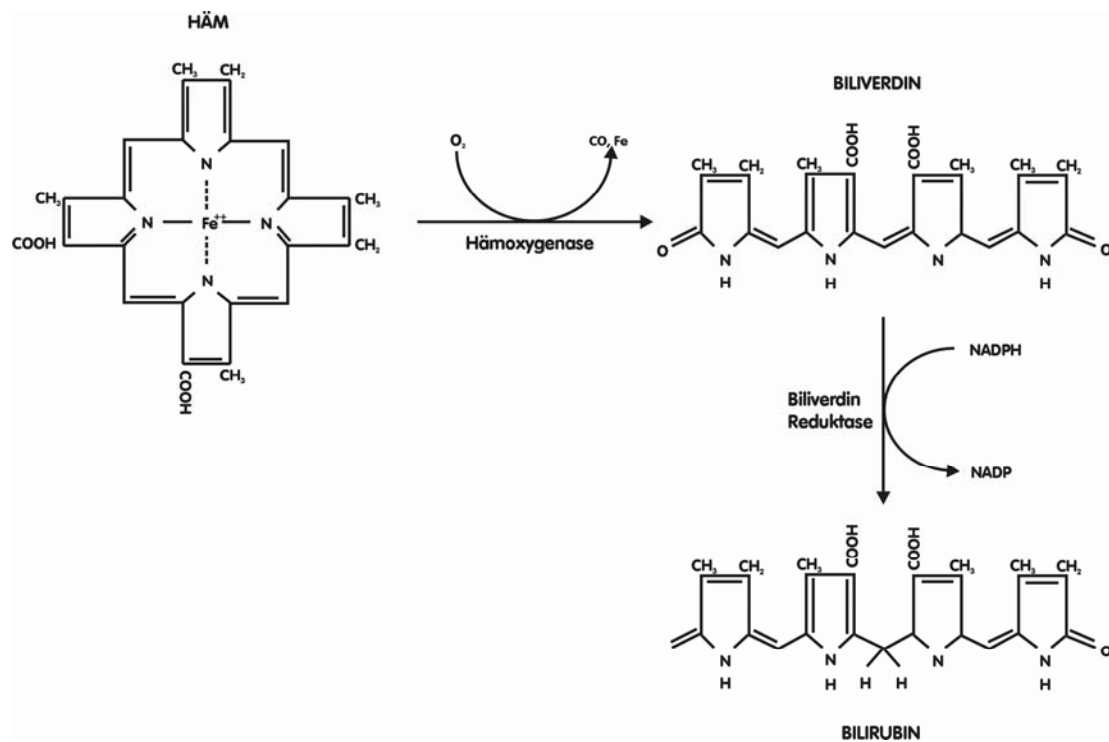


Abbildung 3: Katalytische Reaktion der Hämoxygenase (nach: CHOI et al.: Heme oxygenase-1: function, regulation, and implication of a novel stress-inducible protein in oxidant-induced lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 15: 9-19, 1996).

Wie bereits unter 3.1.2 beschrieben entfaltet CO eine gefäßdilatorische Wirkung über die Aktivierung der Guanylyl-Cyclase. Biliverdin wird durch die Biliverdin-Reduktase zu Bilirubin, einem antioxidativ wirkenden Molekül, reduziert (Kutty 1981; Stocker 1987; Maines 1988). 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[•], die gewebeschädigende Auswirkungen haben, katalysieren (Halliwell 1978; Halliwell 1978). Aufgrund dieser antioxidativen und gefäßdilatorischen Auswirkungen spielt die Hämoxygenase eine

wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase und kann dadurch möglicherweise einen ischämischen Schaden reduzieren (Bauer 2002).

Das gesamte Hämoxxygenasesystem weist diese protektiven Eigenschaften auf. Die HO-1 spielt jedoch eine ausschlaggebende Rolle im zellulären Schutz nach Stressereignissen und im Hinblick auf eine durch Präkonditionierung induzierbare Protektion. Die Isoformen HO-2 und HO-3 kommen konstitutiv im gesamten Organismus vor, während HO-1 die induzierbare Form der Hämoxxygenase darstellt (Bauer 1998; Bauer 2003; Hayashi 2004). Dieses ubiquitär im Säugetiergewebe vorhandene Isoenzym wurde gleichzeitig als Hitzeschock-(Stress)protein (HSP) 32 identifiziert und ist durch verschiedene Zustände, die mit oxidativem Stress wie Hyperthermie, Hypoxie (Bonkovsky 1986), Hyperoxie, Endotoxinämie oder auch Hämorrhagie/Reperfusion (Maines 1993; Bauer 1998; Sonin 1999) einhergehen, induzierbar.

Die HO-1 wird unter anderem von den Kupffer-Zellen der Leber in hohem Maße exprimiert (Goda 1998; Hirano 2001; Bauer 2003; Naito 2004) und ist deshalb nach low-flow Ischämie, wie z.B. hämorrhagischen Schock, von entscheidender Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Perfusion und Homöostase der Leber (Rensing 2002).

3.2 Klinische Bedeutung

3.2.1 Organversagen nach hämorrhagischem Schock

Starke Blutverluste, ob durch Trauma oder chirurgische Eingriffe hervorgerufen, vermindern das zirkulierende Blutvolumen im menschlichen Körper. In der Folge entsteht ein hämorrhagischer Schock, dessen zentrales Merkmal eine durch Minderperfusion der Organe entstehende Dysbalance zwischen O₂-Bedarf und – Angebot ist (Adams 2001). Hieraus resultiert oft eine Störungen der Mikrozirkulation, die zu Gewebhypoxie, Beeinträchtigung des Zellstoffwechsels und Anhäufung toxischer Stoffwechselprodukte führt. Die zu Beginn noch reversiblen funktionellen Organveränderungen führen im protrahierten Verlauf zu irreversiblen Schäden und schließlich Organversagen. Starke Blutverluste können daher durch die Schädigung mehrerer Organe nicht selten ein Multiorganversagen (MOV) hervorrufen, welches eine hohe Letalität aufweist und auf Intensivstationen immer noch eine der

häufigsten Todesursachen darstellt (Levine 1996; Heckbert 1998; Jarrar 1999; Rensing 2001; Durham 2003; Ulvik 2007).

Ein hämorrhagischer Schock initiiert eine Reihe von Kompensationsmechanismen des Körpers. Hierzu gehört auch die Aktivierung des sympatho-adrenergen Systems, welche durch periphere Vasokonstriktion und Mobilisierung kardialer Reserven den fortschreitenden Blutverlust zu kompensieren versucht. Diese Reaktion führt jedoch zu einer Zentralisation des Kreislaufs, d.h. über eine Verminderung der Durchblutung der in dieser akut lebensbedrohlichen Situation sekundär wichtigen Organe, wie z.B. Niere, Leber, Magen-Darm-Trakt oder Muskulatur, wird die nutritive Blutversorgung primär lebenswichtiger Organe, insbesondere Herz und Gehirn, gewährleistet. Im weiteren Verlauf des hämorrhagischen Schocks entwickeln sich aufgrund der bestehenden Minderdurchblutung ausgeprägte Mikrozirkulationsstörungen, welche eine Schlüsselposition in der Entstehung der durch Hypoxie hervorgerufenen Gewebe- und Organschäden – die bis zum MOV kulminieren können – einnehmen (Nuytinck 1988; Deitch 1992; Ertel 1994; Keel 2005).

Die Therapie eines hämorrhagischen Schocks besteht in erster Linie aus der Beseitigung der Blutungsquelle mit dem Ziel der Vermeidung von weiteren Blutverlusten. Zusätzlich soll eine rasche und adäquate Volumensubstitution durchgeführt werden, um den entstandenen Blutverlust zu kompensieren, da ansonsten die Prognose des Patienten entscheidend verschlechtert wird (Bickell 1994). Beide Maßnahmen wirken der fortschreitenden Aktivitätszunahme des sympatho-adrenergen Systems entgegen, so dass durch die Unterbrechung des entstehenden Circulus Viciosus und die Aufrechterhaltung der Sauerstoffversorgung der Organe eine Reduktion der Letalität erreicht werden kann (Carrico 2002).

Größere Blutverluste, die zu einem hämorrhagischen Schock führen können, kommen nicht nur nach akzidentellen Traumata, sondern auch im Rahmen von elektiven chirurgischen Eingriffen vor. Im Unterschied zu den durch Trauma entstehenden Blutungen könnte in diesem Bereich jedoch durch Vorbereitung und angepasstes perioperatives Management das Auftreten von negativen Folgen verhindert oder zumindest minimiert werden. Hierbei spielen die engmaschige Kontrolle der Vitalparameter, die suffiziente Volumensubstitution sowie die rechtzeitige Transfusion von Erythrozytenkonzentraten eine wichtige Rolle, um ein makro- und mikrohäodynamisches Perfusionsversagen mit Ausbildung eines Sauerstoffmangels lebenswichtiger Organe zu verhindern.

Trotz einer kausalen und primär adäquaten Therapie kann ein hämorrhagischer Schock sekundäre Komplikationen nach sich ziehen.

Während eines hämorrhagischen Schocks führt der in zahlreichen Organen verminderte Blutfluss zur Bildung von Sauerstoffradikalen, toxischen Stoffwechselprodukten und vermehrter Freisetzung pro-inflammatorischer Mediatoren wie beispielsweise TNF- α . Werden diese Substanzen im Rahmen der Reperfusion des ischämischen Gewebes freigesetzt, können diese eine generalisierte Aktivierung primär protektiver Defensivsysteme initiieren (Bahrami 1997; Jarrar 1999; Jarrar 2000). Als Folge dieser Reaktion kann sich das systemische inflammatorische Syndrom („Systemic Inflammatory Response Syndrome“, SIRS) manifestieren. SIRS beschreibt dabei einen „generischen“ Entzündungsprozess, der durch eine Vielzahl infektiöser, dann Sepsis genannt, wie nicht-infektiöser Ereignisse, z.B. Verbrennung, Trauma und Hämorrhagie, ausgelöst wird und durch eine Aktivierung verschiedener inflammatorischer Mediatorsysteme gekennzeichnet ist. Diese können wiederum zu kritischen Mikrozirkulationsstörungen durch Freisetzung vasoaktiver sowie permeabilitätssteigernder Substanzen führen, so dass nach dem initialen Schockereignis hierdurch weitere Organschäden verursacht werden können, welche die Bildung eines MOV begünstigen könnten (Baue 1998; Seekamp 1998; Keel 2005). Die Entstehung eines SIRS nach Blutverlust und Reperfusion wird deshalb auch als Ischämie-Reperfusion-Phänomen bezeichnet (Harris 1995).

Der Begriff des Multiorganversagens (MOV) wurde mittlerweile gemäß den Richtlinien der „American College of Chest Physicians (ACCP)/Society of Critical Care Medicine (SCCM) Consensus Conference Committees“ von 1991 durch die Bezeichnung des „Multiple Organ Dysfunction Syndrome (MODS)“ abgelöst und ist als Auftreten von Organdysfunktionen beim Akutkranken mit der Notwendigkeit einer intensivmedizinischen Intervention zur Aufrechterhaltung der Homöostase definiert (Bone 1992).

Die Entwicklung eines posttraumatischen SIRS und eines konsekutiven MODS nach Überleben der ersten posttraumatischen Stunden stellt für polytraumatisierte Patienten einen der wesentlichen prognostischen Faktoren für die Spätletalität im Rahmen der Schockfolgeerkrankungen nach Trauma dar (Ertel 1994; Ulvik 2007).

Trotz erheblicher Fortschritte in der Behandlung einzelner Organsysteme liegt beim Versagen von vier oder mehr Organsystemen die Letalität immer noch bei fast 100%

(Durham 2003). Da die Behandlungsmöglichkeiten des MODS größtenteils auf symptomatische Therapie beschränkt sind, kommt der Prävention einer Ischämie und konsekutiver Hypoxie eine besonders große Bedeutung zu (Ertel 1994). Denn auch eine adäquate Reperfusion vermag die früh nach Trauma und Hämorrhagie einsetzenden zellulären Funktionsverluste des Gewebes unter Umständen nicht dauerhaft wiederherzustellen (Wang 1990; Wang 1990; Wang 1991).

3.2.2 Hepatozelluläre Veränderungen im hämorrhagischen Schock

Ein Schock führt zu einer Minderperfusion der Leber mit darauf folgenden Hypoxieschäden. Gleichzeitig gelangen aus dem Pfortadergebiet vermehrt Endotoxine und Bakterien in den Blutkreislauf, die eine Überlastung der Detoxifikationskapazität der Lebermakrophagen bewirken können. Anschließend kann durch Übertritt dieser Substanzen in den pulmonalen und systemischen Kreislauf die Ausbildung einer Sepsis begünstigt werden (Marzi 1994). In diesem Zusammenhang erfüllt die Leber eine Barriere- und Schutzfunktion für den restlichen Organismus.

Prozesse in der Leber während eines Schocks umfassen zum Einen die direkte hepatozelluläre Schädigung und zum Anderen die Beeinträchtigung der Funktion der sinusoidalen Endothelzellen (Schwellung, Expression von Adhäsionsrezeptoren, Endothelschädigung), verstärkte Aktivierung von Kupferzellen (Phagozytose, Mediatorenfreisetzung) sowie Beeinflussung der Ito-Zellen (Verkürzung der kontraktile Elemente, Vasokonstriktion). Insbesondere die pathophysiologischen Veränderungen der nicht-parenchymatösen Zellen führen zu Störungen der Lebermikrozirkulation mit sinusoidalen Perfusionsstörungen und zu Dysregulation der Hepatozytenfunktion (Vollmar 1993). Schockfolgen in der Leber sind perizentrale Hepatozytennekrose als direkte Hypoxiefolge und frühe midzonale Schädigung im Rahmen von Ischämie und Reperfusion aufgrund der Bildung von freien Sauerstoffradikalen.

Die progressive Leberdysfunktion könnte eine Basis für das Versagen anderer Organe darstellen. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Schwere der Leberfunktionsstörung mit dem Voranschreiten des dekompenzierten Schocks korreliert (Kobelt 1994).

Bei der Entwicklung von Leberersatztherapien bereiten die Komplexität und die zahlreichen Funktionen des Organs große Schwierigkeiten. Eine intakte

Leberfunktion ist ein Schutz vor Dekompensation von Schock und wirkt der Entwicklung eines MODS entgegen, während das manifeste Leberversagen aufgrund von eingeschränkten bis nicht vorhandenen Therapiemöglichkeiten im Zusammenhang mit einem MODS einen prognostisch limitierenden Faktor darstellt (Marzi 1994).

Somit ist eine intakte Leberfunktion nach hämorrhagischem Schock von entscheidender Bedeutung zur Verhinderung der Entstehung eines MODS.

Mikrozirkulationsstörungen während und nach hämorrhagischem Schock stellen einen entscheidenden Mechanismus der Hypoxieentstehung im Gewebe dar. Diese sind gekennzeichnet durch Inhomogenität der Kapillardurchblutung, unzureichenden Sauerstoff- und Substrattransport und Metabolitenabtransport mit nachfolgender Hypoxie und Azidose des Gewebes. Ein hämorrhagischer Schock führt im Lebergewebe zur Reduzierung der perfundierten Sinusoide und gleichzeitig zu Abnahme der Sinusoiddurchmesser (Koo 1977). Charakterisiert wird ein mikrovaskuläres Versagen durch eine Perfusionsheterogenität im sinusoidalen Netzwerk der Leber (Clemens 1997). Diese sinusoidale Perfusionsstörung geht einher mit Reduktion von Erythrozytenflux, Leukozytenfließgeschwindigkeit und gesteigerter Wandadhärenz von Leukozyten. Die Einschränkung der Mikrozirkulation korreliert hierbei mit dem eingeschränkten Energiestoffwechsel und der Einschränkung der Leberfunktion. Bei der Entwicklung des Leberversagens scheint somit die schockinduzierte Mikrozirkulationsstörung eine kausale Rolle zu spielen (Nunes 1970; Vollmar 1993; Vollmar 1995). Es wurde festgestellt, dass im Schock entstandene Reduzierungen des mikrovaskulären Blutflusses trotz adäquater Volumentherapie und Verbesserung der Makrozirkulation weder verbessert noch verhindert werden konnten (Wang 1990).

Die Folgen eines hämorrhagischen Schocks sind dabei nicht nur auf die Leber beschränkt, sondern führen auch in anderen Organen, wie z.B. Darm und Pankreas, zu einer Störung der Mikrozirkulation (Garrison 1998; Krejci 2000).

Ein Erfolg der Schocktherapie wäre somit neben der Erholung der makrohämodynamischen Parameter wohl durch eine rasche Normalisierung und Aufrechterhaltung der Mikrozirkulation gekennzeichnet. Auch der Ischämie-Reperfusionsschaden wird durch die Integrität der Mikrozirkulation wesentlich positiv beeinflusst (Chun 1994).

Wie die „PULSE Trauma Work Group“ in ihrem Report berichtet, ist die Erforschung der Mechanismen von Mikrozirkulationsstörungen bei hämorrhagischem Schock eine der Prioritäten im Kampf gegen die Folgen von Trauma und Hämorrhagie (Carrico 2002).

3.2.3 Zytokinantwort im hämorrhagischen Schock

Schweres Trauma, hämorrhagischer Schock und Ischämie-Reperfusionsschäden werden für eine überschießende unkontrollierte Aktivierung von inflammatorischen Zellen und Mediatoren verantwortlich gemacht, welche bei der Entwicklung von Organschäden und Organversagen eine Schlüsselrolle zu spielen scheint (Roumen 1993; Hildebrand 2005).

Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) ist ein proinflammatorisches Zytokin und wird vor allem von Makrophagen und Monozyten gebildet. TNF- α hat Einfluss auf Entzündung, Sepsis, Lipid- und Proteinstoffwechsel, Hämatopoese, Angiogenese, Wundheilung sowie Immunabwehr und wirkt zytolytisch bzw. zytostatisch auf Tumorzellen.

In der Folge von Trauma und Hämorrhagie konnte ein dramatischer Anstieg von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α und bei Patienten mit MODS ein deutlich erhöhter TNF- α -Spiegel festgestellt werden (Roumen 1993; Seekamp 1998; Hildebrand 2005). Dabei korrelieren erhöhte TNF- α Plasma-Spiegel bei Patienten nach Trauma mit einer erhöhten Sterblichkeit (Roumen 1993).

IL-10 ist ein anti-inflammatorisches Zytokin. Es wird von T-Helferzellen exprimiert und führt zu einer Inhibition der Makrophagen und übernimmt somit die Funktion eines Zytokinsyntheseinhibitors. Ursprünglich wurde es als "cytokine synthesis inhibitor factor" (CSIF) identifiziert, welcher die Zytokinsynthese durch Th-1-Zellen inhibierte. IL-10 supprimiert unter anderem die Produktion von TNF- α und die T-Zell-vermittelte Immunreaktion. Darüber hinaus ist IL-10 von besonderer Bedeutung bei der Gegenregulation der frühen inflammatorischen Reaktion nach Trauma und Hämorrhagie (Schneider 2004). Eine fehlende Hochregulation von antiinflammatorischen Zytokinen wie IL-10 könnte zu einer verstärkten Organdysfunktion bei Trauma-Patienten beitragen (Khadaroo 2004).

Serum-Cytokin-Spiegel korrelieren bei polytraumatisierten Patienten mit generalisiertem I/R-Schaden nach hämorrhagischen Schock mit der Entwicklung von

MODS und könnten früh posttraumatisch als prognostische Faktoren genutzt werden (Seekamp 1998; Hildebrand 2005).

3.3 Präkonditionierung

Supportive präoperative Maßnahmen, die die potentiell schädlichen Auswirkungen einer perioperativen Blutung minimieren sollen sind Gegenstand der Forschung.

In dieses Gebiet fällt auch die Möglichkeit der Präkonditionierung. Darunter versteht man eine Vorbehandlung eines Gewebes mit physikalischen Maßnahmen (z.B. milde Ischämie) oder mit pharmakologischen Substanzen, um eine Toleranz dieses Gewebes gegenüber einer nachfolgenden starken Ischämie zu generieren. Diese Vorbehandlung erfolgt einige Zeit vor dem Ereignis, welches eine potentielle stärkere Blutung nach sich ziehen könnte, um den Anpassungsvorgängen im Organismus ausreichend Zeit für ihre Entfaltung einräumen zu können.

Die protektiven Eigenschaften dieser Verfahren können über eine Induktion von Stressproteinen, insbesondere der Hämoxxygenase-1, zustande kommen (Bauer 2002; Kubulus 2005). Durch die Gabe einer die HO-1-induzierenden Substanz vor einer Hämorrhagie könnte eine erhöhte Toleranz des Gewebes gegenüber den Auswirkungen eines hämorrhagischen Schocks bewirkt werden. Gerade vor elektiven chirurgischen Eingriffen, bei denen es zu größeren Blutverlusten kommen könnte, wäre eine Vorbehandlung mit einer solchen Substanz eine mögliche supportive präoperative Maßnahme um einem potentiell gefährlichen Leberschaden, der zu einem Organversagen bis hin zu einem MODS führen könnte, vorzubeugen.

Häminarginat (HAR), eine Substanz zusammengesetzt aus Hämin und L-Arginin ist in der Lage, die HO-1 zu induzieren (Tenhunen 1987; Martasek 1991). HAR wird als Medikament für die Behandlung akuter Porphyrien, bei denen ein Enzymdefekt in der Biosynthese-Kette von Häm zu einer erhöhten Aktivität der δ -Aminolävulinsäure-Synthase und sich anhäufenden toxischen Zwischenprodukten führt, eingesetzt. Dabei beruht seine Wirkung auf einer allosterischen Hemmung der verstärkten δ -Aminolävulinsäure-Synthase-Aktivität (geschwindigkeitsbestimmendes Enzym der Hämbiosynthese) durch Häm (Herrick 1987).

Neben der Modulation der Hämbiosynthese bewirkt der Hämin-Anteil von HAR, als Substrat der Hämoxxygenase, eine Induktion der HO-1 (Shibahara 1978; Levere

1990; Kubulus 2005). Deshalb könnte diese Substanz von besonderem Interesse zur pharmakologischen Präkonditionierung vor einem Stressereignis sein.

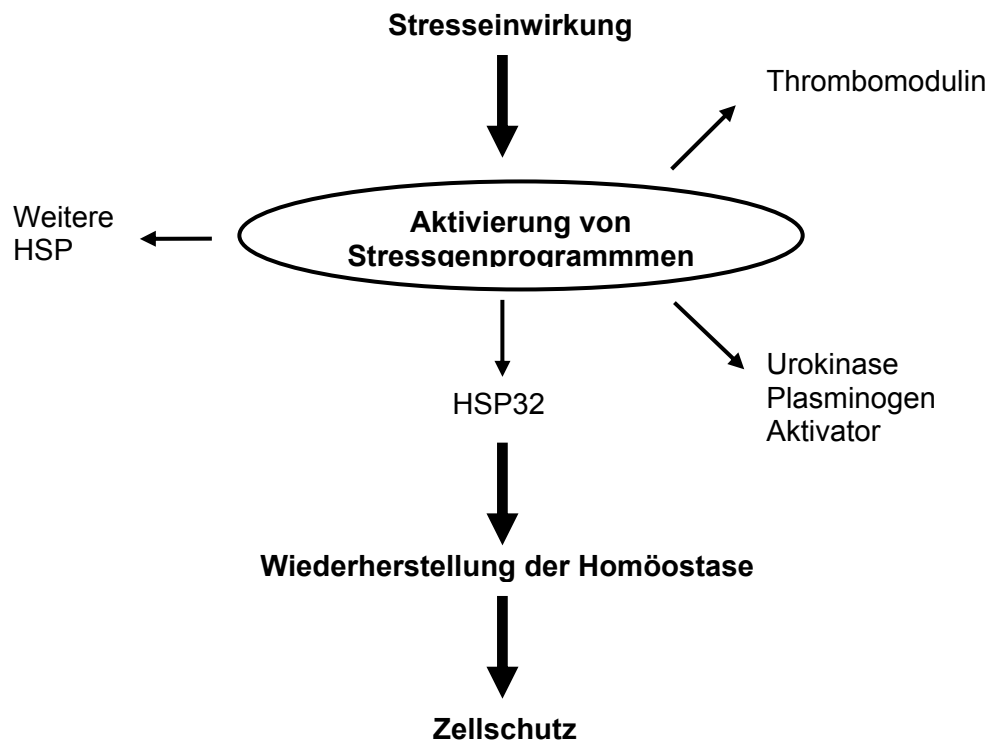


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Einwirkung eines Stressereignisses auf eine Zelle und der daraufhin aktivierten Antwort.

3.4 Auswirkungen der HO1-Induktion durch Präkonditionierung

Die durch Präkonditionierung hervorgerufene Zunahme der HO-1-Aktivität führt zu einem deutlichen Anstieg an endogen produziertem CO und Biliverdin. Eine Induktion der HO-1-Aktivität bewirkt eine Protektion des Gewebes gegenüber oxidativem Schaden (Applegate 1991; Bauer 1998; Sonin 1999; Rensing 1999). Umgekehrt scheint eine Blockade der HO-1 nach hämorrhagischem Schock und Reperfusion einen schwereren Leberschaden zu unterstützen (Rensing 1999). Dabei führt die Blockade der HO-1 zu deutlicher sinusoidaler Verengung mit nachfolgendem Perfusionsversagen und damit zu einem verstärkten hepatozellulären Schaden (Pannen 1998; Rensing 2002).

Dies verdeutlicht die Rolle der HO-1 (HSP 32) als organschutz-vermittelndes Protein durch Verbesserung der Mikrozirkulation der Leber im Rahmen eines hämorrhagischen Schocks.

In tierexperimentellen Versuchen konnte bereits gezeigt werden, dass die Präkonditionierung mit HAR zu einer Protektion gegenüber einem schockinduzierten Organversagen durch low-flow Ischämie führt (Kubulus 2005; Maeshima 2005). Der zugrunde liegende Pathomechanismus konnte dabei nicht geklärt werden, eine durch die Induktion der HO-1-Proteinexpression vermittelte Verbesserung der Mikrozirkulation könnte jedoch von entscheidender Bedeutung sein.

Neben der Verbesserung der mikrozirkulatorischen Perfusion moduliert HO-1 auch die Zytokinantwort nach Stress, wobei die IL-10-Expression erhöht, während die TNF- α -Expression inhibiert wird (Drechsler 2006; Yasui 2007). Hieraus resultiert eine anti-inflammatorische Antwort, welche teilweise für die HAR-vermittelte Zell- und Organprotektion verantwortlich sein könnte.

Daher könnte HAR eine geeignete Substanz für eine erfolgreiche pharmakologische Präkonditionierung darstellen, um post-ischämische Organdysfunktionen und Mortalität durch HO-1-vermittelte Verbesserung von Mikrozirkulation und Induktion einer anti-Inflammatorischen Antwort zu reduzieren.

3.5 Modell des hämorrhagischen Schocks

Der Schock ist definiert als ein akutes Zirkulationsversagen mit resultierendem Missverhältnis von Sauerstoffangebot und mitochondrialem Sauerstoffbedarf lebenswichtiger Organe (Gutierrez 1993), wobei im hämorrhagischen Schock dieser Zustand durch Blutverlust hervorgerufen wird. Das Sauerstoffangebot bzw. der Sauerstofftransport (DO_2) in den Organen ist dabei vom regionalen Blutfluss bzw. vom Herzzeitvolumen (HZV) und dem arteriellen Sauerstoffgehalt (CaO_2) abhängig und wird folgendermaßen definiert:

$$DO_2 = \text{HZV (L/min)} \times \text{CaO}_2 \text{ (ml/dl)}.$$

Der CaO_2 ist definiert als:

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

wobei Hb die Hämoglobinkonzentration (g/dl), PaO_2 der Sauerstoffpartialdruck im arteriellen Blut und $O_2\text{Sat}$ die Hämoglobin- O_2 -Sättigung darstellt. Daraus ergibt sich,

dass Bedingungen, die den Blutfluss, die Hämoglobinkonzentration oder die Hämoglobin-O₂-Sättigung herabsetzen, einen direkten Einfluss auf den Sauerstofftransport haben.

Eine Abnahme des arteriellen Sauerstoffgehalts wird als Hypoxämie bezeichnet. Eine Hypoxämie kann verschiedene Ursachen haben. Im Wesentlichen werden die hypoxische Hypoxämie (Störungen der Lungenfunktion oder Atmung), die toxische Hypoxämie (z.B. durch CO-Intoxikation) und die anämische Hypoxämie (durch Anämie), auch in Verbindung mit einem hämorrhagischen Schock, unterschieden. Bei Herabsetzung des Sauerstofftransports können weiterhin adaptive Veränderungen des Sauerstoffverbrauchs (VO₂) auftreten. Diese kompensatorischen Reaktionen können die Gewebe vor Änderungen des Blutflusses und der Hämoglobinkonzentration schützen.

Um die Auswirkungen einer Präkonditionierung untersuchen zu können wurde in der vorliegenden Arbeit ein hämorrhagisches Schockmodell am Kleintier angewendet. Aufgrund der komplexen Auswirkungen einer Präkonditionierung und eines hämorrhagischen Schocks auf den Organismus und der zentralen Position der Leber mussten die Untersuchungen in Tierversuchen unternommen werden.

Zur Auswahl standen verschiedene Kleintiermodelle für den hämorrhagischen Schock. Dabei gibt es Modelle, in denen ein definiertes Blutvolumen entzogen wird, so genannte „fixed volume hemorrhage“-Modelle und Modelle, in denen ein definierter Blutdruck aufrecht erhalten wird, so genannte „fixed pressure hemorrhage“-Modelle. Daneben existieren Modelle, die mit unkontrollierter Hämorrhagie arbeiten um eine möglichst kliniknahe Situation zu erzeugen. Modelle mit unkontrollierter Hämorrhagie haben aber den erheblichen Nachteil eines nicht standardisierten Blutverlusts und Grades der Hypotension. Diese Situationen haben nur einen geringen Grad an Reproduzierbarkeit. Die Wahl fiel folglich auf ein Modell mit kontrollierter Hämorrhagie. Ein Modell mit definiertem Blutdruck erlaubt das Monitoring und die Kontrolle von Hypotension, Dauer des Schocks und Volumen. Des Weiteren ist ein druckkonstantes Modell nicht vom Hydratationsgrad des Tieres abhängig. Daher wurde ein „fixed pressure hemorrhage“-Modell gewählt, um ein möglichst hohes Maß an Standardisierung und Reproduzierbarkeit einer Simulation einer Low-flow-Ischämie zu erhalten.

Weitere Faktoren, die die Modelle beeinflussen sind die Verwendung von Heparin und Anästhesie. Prophylaktische Heparinisierung und Anästhesie führen zu einer

Organprotektion (Lomas-Niera 2005). Daraus folgt, dass, verglichen mit nicht-heparinisierten und nicht-anästhesierten Tieren, bei heparinisierten und anästhesierten Tieren zur Erzielung eines vergleichbaren pathophysiologischen Endpunktes wie Dekompensation oder Organschaden längere Hypotensionsphasen notwendig sind.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein druckgesteuertes, nicht-heparinisiertes modifiziertes WIGGERS-Schockmodell gewählt (Wiggers 1946).

Aus ethischen Gründen wurde auf eine Anästhesie der Versuchstiere nicht verzichtet. Für die Anästhesie wurde Pentobarbital, ein langwirksames Barbiturat, eingesetzt. Um das Modell kliniknah zu gestalten, wurde der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) auf 35 ± 5 mmHg gesenkt und die Dauer des Schocks auf 60 Minuten festgelegt. Zur Volumentherapie wurde ein Substitutionsschema, basierend auf der Retransfusion von 60% des entzogenen Blutvolumens und Ringerlaktatlösung entsprechend dem dreifachen Blutverlustvolumen angewendet. Unter diesem Therapieschema kommt es zu einer leichten Hämodilution mit Hämatokritwerten zwischen 25 und 30%, wie sie heute klinisch nach überlebtem Schockereignis angestrebt werden, sowie zur Wiederherstellung des MAP und der Herzfrequenz und zu supranormalen Herzzeitvolumina (HZV).

3.6 Fragestellung

Ziel der vorliegenden Studie war daher, die folgenden Fragen zu klären:

1. Beeinflusst die Vorbehandlung mit HAR die Mikrozirkulation der Rattenleber nach Hämorrhagie und Reperfusion?
2. Führt die Vorbehandlung mit HAR zu einer Dilatation der Sinusoide der Rattenleber nach Hämorrhagie und Reperfusion?
3. Ist eine eventuell auftretende Dilatation der Sinusoide nach H/R auf die HAR-vermittelte CO-Bildung zurückzuführen?
4. Welchen Einfluss hat die Vorbehandlung mit HAR auf den Volumenfluss in den Sinusoiden nach H/R?
5. Fällt der oxidative Schaden im Lebergewebe durch H/R nach Vorbehandlung mit HAR geringer aus?
6. Welchen Einfluss hat die Vorbehandlung mit HAR auf die Zytokinantwort von TNF- α und IL-10 nach H/R?

4. Material und Methodik

4.1. Versuchstiere

Alle Tierversuche wurden nach den Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes und nach Zustimmung durch die örtliche Tierschutzbehörde durchgeführt. Als Versuchstiere dienten insgesamt 48 männliche Sprague-Dawley-Ratten (Charles River, Fa. Wiga, Sulzfeld, Deutschland) mit einem Gewicht zwischen 200 und 300g, entsprechend einem Alter von 8 – 10 Wochen. Die Tiere befanden sich bis zum Tag des Versuches unter klimatisierten Bedingungen (Lufttemperatur: 22-24 °C, relative Luftfeuchtigkeit: ca. 60%) in der Versuchstierhaltung des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie, Universität des Saarlandes, Homburg/Saar (Tierschutzbeauftragte Frau Dr. med. vet. M. Frings). Die Fütterung erfolgte mit Standardlaborfutter sowie Wasser ad libitum.

Nur Versuchstiere, die keine Anzeichen von Erkrankungen aufwiesen, wurden in die Versuchsserien aufgenommen.

4.2 Versuchsdesign

4.2.1 Versuchsgruppen

Alle in die Untersuchungen eingeschlossenen Tiere wurden auf 6 Versuchsgruppen randomisiert verteilt (Tabelle 1).

Vorbehandlung	Anzahl der Tiere
Keine (Sham)	n = 8
Vollelektrolytlösung (Vehikel)	n = 8
Vollelektrolytlösung (Vehikel) + SnMP-IX	n = 8
HAR	n = 8
HAR + SnMP IX	n = 8
HAR + SnMP IX + DCM	n = 8
Gesamt	n = 48

Tabelle 1: Einteilung der Versuchsgruppen

Als Referenzgruppe (Sham) dienten Tiere, welche nicht vorbehandelt und nach der Präparation keinem Schock unterzogen wurden.

Vor Versuchsbeginn wurde jedes Versuchstier gewogen, um eine gewichtsadaptierte Applikation der entsprechenden Substanzen gewährleisten zu können.

4.2.2 Versuchsprotokolle

Die Versuchstiere der Schock-Gruppen wurden 24 Stunden vor Einleitung des hämorrhagischen Schocks mit 30 ml/kg Vollelektrolytlösung (Vehikel) oder 5 mg/kg Häminarginat gelöst in 30 ml/kg Vollelektrolytlösung (HAR, Orphan Europe, Dietzenbach, Deutschland) intravenös in Äthernarkose vorbehandelt. 24 Stunden nach Vorbehandlung wurden die Tiere (Vehikel, HAR, jeweils n=8) einem einstündigen hämorrhagischen Schock und nachfolgend einer zweistündigen Reperfusion unterzogen. Anschließend erfolgte die intravitalmikroskopische Beurteilung der Mikrozirkulation. Zur Quantifizierung der HO-1 Proteinexpression im Lebergewebe wurde in Kontrollexperimenten (Vehikel, HAR, jeweils n=4) 24 Stunden nach Vorbehandlung die Lebern entnommen, sofort im flüssigen Stickstoff schockgefroren und bis zur Durchführung der Western-Blot Analyse bei -24°C im Kühlschrank gelagert.

In weiteren Versuchsgruppen erfolgte die Beurteilung der physiologischen Bedeutung der induzierten HO-1 für die Regulation der Mikrozirkulation nach hämorrhagischem Schock. Hierzu wurde 24 Stunden nach Vorbehandlung mit Vollelektrolytlösung oder HAR die HO-Aktivität durch intravenöse Injektion des falschen Substrats Zinn-Mesoporphyrin-IX (SnMP-IX, Porphyrin-Products, Logan, UT, 10µmol/kg) 15 min vor Beginn des hämorrhagischen Schocks blockiert (Vehikel+SnMP-IX; HAR+SnMP-IX; jeweils n=8).

Um die Bedeutung von Kohlenmonoxid nach HAR-vermittelter HO-1-Induktion zu ermitteln, erhielten in einer weiteren Versuchsgruppe die mit SnMP-IX blockierten HAR-vorbehandelten Tiere 100 mg/kg des CO-Donors Dichlormethan (DCM). Zur Gewährleistung einer ausreichenden endogenen CO-Produktion aus DCM erfolgte die Gabe 3 Stunden vor Einleitung des hämorrhagischen Schocks über eine Magensonde (HAR+SnMP-IX+DCM, n=8). Der CO-Gehalt im Blut wurde vor Gabe von DCM und vor Induktion des hämorrhagischen Schocks durch spektrophotometrische CO-Hb-Bestimmung gemessen.

Zum Vergleich wurden scheinoperierte Tiere (Sham) analog der untersuchten Schock-Gruppen präpariert und intravital mikroskopiert, wobei in diesen Gruppen keine vorangehende Vorbehandlung und kein hämorrhagischer Schock durchgeführt wurde.

Vor Einleitung des hämorrhagischen Schocks (t^0), zum Ende des hämorrhagischen Schocks (t^1) und am Ende der Reperfusionphase (t^2) wurden direkt nach Blutentnahme Blutgasanalysen durchgeführt.

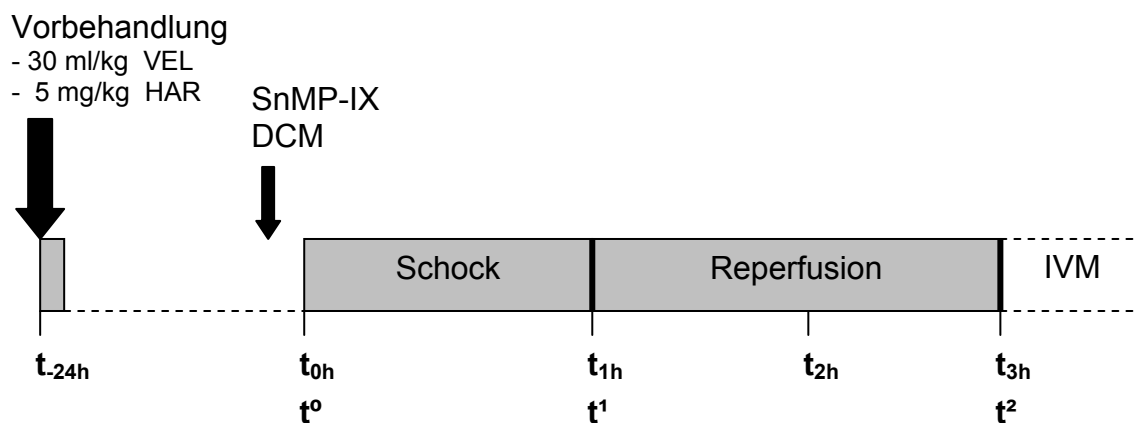


Abbildung 5: Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Versuche.

VEL: Vollelektrolytlösung; HAR: Häminarginat; SnMP-IX: Zinn-Mesoporphyrin-IX; DCM: Dichlormethan. Schock: hämorrhagischer Schock; IVM: Intravitalmikroskopie; t^0 , t^1 , t^2 : Zeitpunkte der Blutgasanalysen.

4.3 Versuchsdurchführung

4.3.1 Anästhesie der Versuchstiere

Die pharmakologische Vorbehandlung der Versuchstiere und die Durchführung aller invasiven Eingriffe erfolgten unter Allgemeinanästhesie.

Dabei wurde die Vorbehandlung mit HAR bzw. Vollelektrolytlösung unter Ethernarkose mit entsprechend kurzer Anästhesiedauer bei guter Analgesie und erhaltener Spontanatmung durchgeführt.

Die Hauptversuche mit anschließender Intravitalmikroskopie erfolgten dagegen unter Pentobarbitalnarkose, wobei das Anästhetikum zunächst intraperitoneal (initial 50 mg/kg KG i.p.) und nach Anlage des zentralvenösen Zugangs intravenös verabreicht

wurde. Diese Methode wurde gewählt, um eine lang dauernde wirksame Anästhesie und Analgesie bei vorhandener Spontanatmung erreichen zu können.

4.3.2 Pharmakologische Vorbehandlung

Nach Anlage einer sterilen Venenverweilkanüle (24 G, Optiva W, Medex Medical Ltd., Rossendale, Großbritannien) in eine Schwanzvene erfolgte über diese 24 Stunden vor Beginn der Schockversuche eine pharmakologische Vorbehandlung. Den Tieren wurde insgesamt 30 ml/kg KG Flüssigkeit langsam injiziert, wobei je nach Zuteilung zur Versuchsgruppe entweder nur Vollelektrolytlösung (Vehikel) oder HAR (5 mg/kg KG) gelöst in Vollelektrolytlösung appliziert wurde.

Anschließend wurde die Venenverweilkanüle entfernt und die Tiere unter Futterentzug bei freiem Zugang zu Wasser gehalten.

Die Tiere der Sham-Gruppe wurden nicht vorbehandelt, sondern 24 Stunden bis zum Versuchsbeginn bei freiem Zugang zu Wasser nüchtern gehalten.

4.3.3 Chirurgische Präparation

Nach Induktion der Allgemeinnarkose wurden die Versuchstiere zur Durchführung der Präparation bei rekliniertem Kopf auf dem Rücken gelagert und die Extremitäten seitlich mit Pflaster fixiert.

Nach medianem Hautschnitt zwischen Mandibula und Manubrium sterni wurde die Trachea stumpf frei präpariert und anschließend im oberen Drittel quer inzidiert. Hierdurch konnte zur Sicherung der Atemwege bei erhaltener Spontanatmung ein ca. 5 cm langer Kunststofftubus (PE-Schlauch, Portex Limited, Hythe, Kent, Großbritannien) intratracheal platziert werden, der nachfolgend durch vorgelegte Fäden zweifach distal und einfach proximal der Eröffnungsstelle fixiert wurde.

Im nächsten Schritt erfolgte die stumpfe Präparation der rechten Vena jugularis externa. Anschließend wurde nach kranialer Ligatur das Gefäß eröffnet und der Zentralvenenkatheter (ZVK; Polyethylen (PE) 50-Kunststoffschlauch) platziert, der durch vorgelegte Fäden proximal der Punktionsstelle einfach und distal zweifach gesichert wurde. Nach Anlage des ZVK wurden über diesen für die weitere Dauer der Präparation Vollelektrolytlösung zur Sicherung des Basisbedarfs (10ml/kg KG/h) über einen Perfusor (Perfusor® segura FT, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) appliziert. Über den ZVK erfolgte außerdem die weitere

Pentobarbitalgabe zur Aufrechterhaltung der Narkose sowie später die Retransfusion des Blutes und der Vollelektrolytlösung während der Reperfusionphase.

Im nächsten Arbeitsschritt folgte zunächst die stumpfe Präparation der linken Arteria carotis communis. Nach anschließender kranialer Ligatur und distalem Abklemmen wurde über eine quere Inzision ein PE 50 Katheter platziert. Dieser wurde nach Lösen der Gefäßklemme weiter vorgeschoben und anschließend ebenfalls kranial und distal der Eröffnungsstelle durch Fäden fixiert.

Über den arteriellen Katheter erfolgten nun die kontinuierliche Überwachung des mittleren arteriellen Drucks (MAP) und der Herzfrequenz des Versuchstieres (Monitor: Hewlett Packard M1166A, Model 66S, Hewlett Packard GmbH, Böblingen, Deutschland) sowie die Entnahmen der arteriellen Blutproben zur Analyse der Blutgase und die Blutentnahme zur Induktion und zum Aufrechterhalten des hämorrhagischen Schocks.

Nach Anlage aller Zugänge und deren Sicherung wurde der Hautschnitt zur Reduzierung des Flüssigkeitsverlustes mittels Wundnaht verschlossen.

An die operative Vorbereitungsphase von etwa 30-45 min schloss sich eine 15-minütige Erholungsphase an, in deren Anschluss eine arterielle Blutprobe zur Blutgasanalyse ($t^{\circ} = 0,3 \text{ ml}$) entnommen wurde. Danach wurde der hämorrhagische Schock eingeleitet.



Abbildung 6: Hals-Situs nach Einlage von Trachealkanüle, Katheter in V. jugularis ext. (rechts) und Arteria carotis communis (links)

4.3.3.1 Besonderheit Gruppe HAR + SnMP-IX

In dieser Gruppe erfolgte nach beendeter Präparation des Halses 15 Minuten vor Induktion des hämorrhagischen Schocks die intravenöse Injektion von SnMP-IX.

4.3.3.2 Besonderheit Gruppe HAR + SnMP-IX + DCM

In dieser Gruppe wurde die Präparation aufgrund der DCM-Gabe modifiziert. Hierbei wurde nach Anlage der Trachealkanüle zunächst eine Magensonde peroral eingeführt, über die die DCM-Lösung appliziert werden konnte. 10 Minuten später wurde die Magensonde entfernt und danach die Präparation analog dem Vorgehen in den anderen Gruppen fortgeführt.

3 Stunden nach Gabe der DCM-Lösung wurde SnMP-IX intravenös appliziert und anschließend der hämorrhagische Schock induziert. Die zeitliche Latenz war notwendig, um eine ausreichende endogene Produktion von CO aus DCM zu gewährleisten.

4.3.4 Hämorrhagischer Schock und Reperfusion

Die Induktion und Aufrechterhaltung des hämorrhagischen Schocks erfolgte in Anlehnung an das isobare, heparinfreie Schockmodell nach WIGGERS und INGRAHAM (1946): Die Infusion von Vollelektrolytlösung (10 ml/kg KG/h) wurde beendet und der mittlere arterielle Blutdruck durch raschen arteriellen Blutentzug auf 35 ± 5 mmHg gesenkt und für die Dauer von 60 Minuten in diesem Bereich konstant gehalten, wobei endogenen Kompensationsversuchen durch weitere Blutentnahmen begegnet wurde. Das entzogene Blut wurde mit Zitrat-Phosphat-Dextrose (0,14ml/ml Blut) antikoaguliert und in den Entnahmespritzen (5ml) zur Retransfusion aufbewahrt. Nach Ende der 60-minütigen Schockphase wurde zunächst eine arterielle Blutprobe ($t^1 = 0,3$ ml) zur Blutgasanalyse entnommen. Im Anschluss daran begann die Reperfusionphase. Zunächst wurden 60% des entnommenen und antikoagulierten Blutes über 10 Minuten langsam retransfundiert. Des Weiteren erfolgte über die nächste Stunde die Infusion von Vollelektrolytlösung entsprechend der Menge von 200% des entnommenen Blutvolumens und in der sich anschließenden 2. Stunde der Reperfusionphase die Infusion von Vollelektrolytlösung entsprechend der Menge von 100% des entnommenen Blutvolumens mittels Perfusor.

Nach Beendigung der zweistündigen Reperfusionphase wurde eine weitere arterielle Blutprobe zur Blutgasanalyse ($t^2 = 0,3$ ml) entnommen und daraufhin die Infusion zur Deckung des Basisbedarfs mit 10 ml/kg KG/h bis zum Beginn der Intravitalmikroskopie fortgeführt.

4.3.5 Intravitalmikroskopie

Der intravitalmikroskopische Arbeitsplatz setzte sich wie folgt zusammen:

1. Mikroskop Zeiss Axiovert 135 (Carl Zeiss Inc., Göttingen, Deutschland) mit 5-fach Objektivrevolver bestückt mit zwei Objektiven (Zeiss A-Plan 5x NA 0.12 / 40x NA 0.50).
2. Beleuchtungseinheit, die sich zusammensetzte aus einer 100 W Quecksilberlampe (HBO 100W OFR, Osram, Augsburg, Deutschland) und verschiedenen Filtersätzen (Exzitation 485 nm, diachronischer Spiegel 510 nm, Emission 515-565 nm)
3. Rechner-Einheit zur Bildaufnahme, bestehend aus einer hochauflösenden digitalen Kamera (C 4742-95, Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Herrsching, Deutschland), angeschlossen an einen Standard-PC (Pentium 4, 3.0 GHz). Alle Bilder wurden mittels hochauflösender Software (SimplePCI, Version 5.3, Compix Inc. Imaging Systems, Cranberry Township, USA) aufgenommen.

4.3.5.1 Chirurgische Vorbereitung

Nach Beendigung der zweistündigen Reperfusionphase und Entnahme der Blutprobe t^2 erfolgte die Präparation der Versuchstiere für die Intravitalmikroskopie.

Hierzu wurde zunächst eine Laparatomie durchgeführt. Die Inzision erfolgte distal des Xyphoids und wurde nach links lateral bis über die Axillarlinie und nach rechts über etwa 2 cm geführt. Die Arteriae epigastricae superiores wurden durch Fadenligatur unterbunden und weitere Blutungsquellen mit einem Elektrokauter (Erbe Kauter B, Erbe, Tübingen, Deutschland) verödet.

Anschließend erfolgte die Mobilisierung des linken Leberlappens, indem das Lig. Falciforme und weitere Bänder zwischen den Leberlappen vorsichtig durchtrennt wurden. Hiernach wurde das Versuchstier auf der linken Körperseite liegend auf der vorbereiteten Arbeitsplatte fixiert und der linke Leberlappen auf einem in die Arbeitsplatte eingearbeiteten Objektträger ausgelagert (Abbildung 7).



Abbildung 7: Versuchstier mit ausgelagerter Leber auf der Mikroskopierplatte. Linker Leberlappen mit Kontakt zu Objektträger.

Zur Verhinderung einer Austrocknung und Minimierung von atemabhängigen Bewegungen des Leberlappens wurde die Leber mit Vollelektrolytlösung benetzt und mit Cellophanfolie bedeckt.

4.3.5.2 Durchführung

Nach Positionierung des Tieres unter dem Mikroskop erfolgten zunächst die Aufnahmen der NAD(P)H-Autofluoreszenz zur Beurteilung des mitochondrialen Redox-Status. Hierzu wurde das 5-fache Objektiv und der entsprechende Filtersatz (Exzitation 365 nm, Emission 397 nm) eingesetzt. Pro Tier wurden 5 verschiedene Blickfelder aufgenommen, wobei vor den jeweiligen Aufnahmen diese für wenige Sekunden belichteten wurden, um die Autofluoreszenz der Ito-Zellen zu unterdrücken (Abbildung 8).

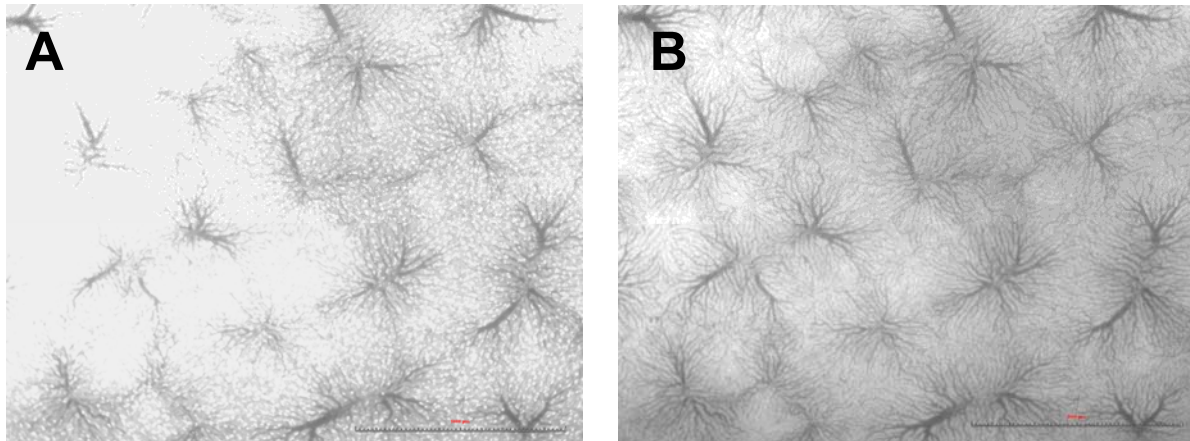


Abbildung 8: *Aufnahmen zur NAD(P)H-Autofluoreszenz. a) Zu Beginn der Belichtung, zahlreiche Ito-Zellen b) nach wenigen Sekunden Belichtung keine Ito-Zellen mehr sichtbar, zu diesem Zeitpunkt wurden die Aufnahmen zur Messung der NAD(P)H-Autofluoreszenz angefertigt.*

Anschließend erfolgten die Aufnahmen der sinusoidalen Mikrozirkulation. Hierzu wurde den Versuchstieren über die Vena jugularis 0,05 ml Fluorescein-Lösung zur Kontrastverstärkung, sowie 0,3 ml FITC-Erythrozyten-Suspension verabreicht. Für die Aufnahme wurde das 40-fache Objektiv mit dem entsprechenden Filtersatz (Exzitation 485 nm, diachronischer Spiegel 510 nm, Emission 515 – 565 nm) verwendet, wobei pro Tier fünf Gesichtsfelder aufgezeichnet wurden.

Zur Vorbeugung einer Phototoxizität wurde die Leber zwischen den einzelnen Aufnahmen durch das Schließen einer Blende vor unnötiger Lichtexposition geschützt.

Nach den intravitalmikroskopischen Aufnahmen wurde den Versuchstieren über den arteriellen Zugang 3 ml Blut für die Gewinnung von Serum entnommen. Das abgenommene Blut wurde zentrifugiert (10 min. bei 10000 u/min und 4°C), die Serumüberstände abpipetiert und tiefgefroren bis zur Analyse aufbewahrt. Unmittelbar danach erfolgte eine vollständige Entnahme der Leber, die sofort in flüssigem Stickstoff gefroren wurde, wodurch das Tier durch Ausbluten verstarb.

4.4 Applizierte Lösungen

4.4.1 Vollelektrolytlösung

Verwendet wurde Sterofundin®ISO (B. Braun, Melsungen, Deutschland), eine sterile und pyrogenfreie isotone Fertig-Infusionslösung.

4.4.2 Häminarginat (HAR)

Die im Kühlschrank lichtgeschützt gelagerte sterile Häminarginatlösung (Normosang®, Orphane Europe, Dietzenbach, Deutschland) wurde unmittelbar vor der Applikation mit Sterofundin®ISO auf 30ml/kg KG verdünnt. Die Applikation von HAR erfolgte in den entsprechenden Gruppen durch intravenöse Injektion in einer Dosierung von 5 mg/kg Körpergewicht.

4.4.3 Zinn-Mesoporphyrin-IX (SnMP-IX)

In drei Versuchsgruppen erfolgte eine spezifische Blockade der Hämoxygenase-Aktivität durch den kompetitiven Inhibitor Zinn-Mesoporphyrin-IX (SnMP-IX). Die Lösung wurde im eigenen Labor aus Zinn-Mesoporphyrin-IX-Dichlorid (Porphyrin Products INC, Logan, USA), Natrium-Hydrogencarbonat (8,4%, Delta Pharma GmbH, Pfullingen, Deutschland) und PBS-Puffer (Phosphate Buffered Saline, Life Technologies Inc., Gaithersburg, USA) in einem lichtgeschützten Gefäß hergestellt. Die Applikation von SnMP-IX erfolgte direkt nach Herstellung in den entsprechenden Gruppen durch langsame intravenöse Injektion (über 10 min) zur Vermeidung von hämodynamischen Reaktionen unmittelbar vor Schockinduktion in einer Dosierung von 5,7 mg/kg KG.

4.4.4 Dichlormethan (DCM)

Der CO-Donor Dichlormethan wurde unmittelbar vor der Applikation im Verhältnis 1:1 mit Speiseöl gemischt. Die Applikation von jeweils 0,6 ml dieser Lösung erfolgte über eine Magensonde.

4.4.5 Fluorescein-Isothiocyant-Lösung

Der Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein-Isothiocyant (FITC, 5%, 0,2 ml, MG 150.000, Exzitationsmaximum 492 nm, Fluka 46946; SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH,

Steinheim, Deutschland) wurde gemäß Herstellerangaben mit Wasser für Injektionszwecke aufgelöst. Die intravenöse Applikation von jeweils 0,05 ml der Lösung erfolgte während der Intravitalmikroskopie unmittelbar nach Anfertigung der NAD(P)H-Bilder jedoch vor Aufnahme der sinusoidalen Mikrozirkulation.

Bedingt durch die rasche Extravasation der FITC-Lösung führt dieses Vorgehen zur einer Kontrastanhebung des Gewebes und somit zur Hervorhebung der dunklen Sinusoide, so dass die Mikrozirkulation anhand des Verlaufes FITC-markierter Erythrozyten (siehe 4.5) leicht erfasst werden konnte.

4.5 Fluoreszenz-Zell-Markierung

Zur Beurteilung der sinusoidalen Perfusion wurden Erythrozyten mit Fluorescein–isothiocyanat-isomer-I-Celite (FITC, SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) markiert. Hierzu wurden Erythrozyten eines Spendertieres dreimal in einem Glucose-Citrat-Puffer (Alsevers Puffer; pH 6,2) und einmal in einem Bicine-Saline-Puffer (pH 8,3) über je 3 min. bei 2000 u/min und 20°C gewaschen. Anschließend wurden die gewaschenen Erythrozyten mit Bicine-Saline Puffer auf einen Hämatokrit von 50% suspendiert. Pro ml Erythrozyten-Puffer-Gemisch wurden daraufhin 4 mg FITC, in N,N-Dimethylformamid gelöst, hinzugegeben. Anschließend wurde das Gemisch für 3 Stunden bei 25°C im Wasserbad unter Lichtabschluss inkubiert.

Nach Inkubation wurden die Erythrozyten einmal mit Bicine-Saline Puffer und viermal mit 0,9%iger physiologischer Kochsalzlösung für je 4 min bei 20°C und 2000 u/min gewaschen und mit Kochsalzlösung auf einen Hämatokrit von 50% suspendiert. Die markierten Erythrozyten wurden nach Zugabe von Citrat-Phosphat-Dextrose-Lösung (1,4 ml/10 ml) bis zum Gebrauch für maximal 7 Tage im Kühlschrank unter Lichtabschluss aufbewahrt.

4.6 Erfassung der Untersuchungsparameter

4.6.1 Western Blot

Die Expression von HO-1 im Lebergewebe wurde mittels Western-Blot-Analyse überprüft. Das Lebergewebe wurde nach der Entnahme sofort in flüssigem Stickstoff (-196°C) Schock gefroren und anschließend in einer Tiefkühltruhe (-80°C) bis zur Analyse gelagert.

Etwa 50 mg Gewebe wurde im zehnfachen Volumen Zellysepuffer homogenisiert (10 mM Tris pH 7,5, 10 mM Natriumchlorid, 0,1mM EDTA, 0,5% Triton X100, 0,02% Natriumazid, 2mM Phenylmethansulfonylfluorid). Nach dem Abzentrifugieren der unlöslichen Bestandteile (10 min bei 18.000 X g) wurde die Konzentration an löslichem Gesamtprotein im Überstand bestimmt. Dazu wurde eine spektralphotometrische Messung durchgeführt, die auf dem Prinzip beruht, dass das Absorptionsmaximum einer sauren Lösung von Comassie Brilliant Blau G-250 bei der Bindung an Proteine von 465 nm nach 595 nm verschoben wird. Als Referenz diente BSA (BioRad Protein Assay Kit II, BioRad, Hercules, NY, USA). Anschließend wurden die Proben in Probenpuffer (62,5 mM Tris, pH 6,8, 2% SDS, 10% Glycerin, 5% 2- Mercaptoethanol, 0,0025% Bromphenolblau) 5 min gekocht. Gleiche Mengen Protein (50µg) pro Probe wurden durch SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) in 12% Tris-Glycin Gelen aufgetrennt. Als Elektrophoresepuffer fand ein denaturierender Puffer nach Lämmli Verwendung (25 mM Tris, pH 8,3, 192 mM Glycin, 0,1% SDS). Als positive Kontrolle für HO-1 diente aufgereinigtes rekombinantes HO-1 Protein aus der Ratte (StressGen Biotechnologies Corp., Sidney, BC, Canada). Die Gele wurden mittels Elektrophorese (12 mM Tris Base, 96 mM Glycin, pH 8,3) auf Polyvinylidendifluorid-Membranen geblottet (Westran, Schleicher + Schüll, Dassel) und anschließend bei 4°C bis zur Antigendetektion für maximal 24 Stunden aufbewahrt. Eine Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur in 5% fettfreier Trockenmilch in Tween-haltiger Tris-gepufferter Kochsalzlösung (20 mM Tris, pH 7,5, 0,5 M Natriumchlorid, 0,1% Tween20) diente zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen auf der Membran. Im Anschluss wurde die Membran mit einem polyklonalen Kaninchen anti-Ratte HO-1 Primärantikörper (Verdünnung 1:1000) (StressGen) 90 min bei Raumtemperatur inkubiert. Ungebundener Primärantikörper wurde durch Waschen der Membran mit Tween-haltiger Tris-gepufferter Kochsalzlösung entfernt. Im nächsten Schritt wurde die Membran mit einem Meerrettichperoxidase-gekoppelten Esel anti-Kaninchen Sekundärantikörper (Verdünnung 1:10000) 90 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach mehrfachem Waschen der Membran mit Tween-haltiger Tris-gepufferter Kochsalzlösung fand nun die Detektion des Antigen-Antikörper Konjugates mittels verstärkter Chemielumineszenz (ECL Western Blot Analysis System, Amersham Buchler, Braunschweig) nach Anleitung des Herstellers statt. Das Signal wurde nach kurzem Kontakt (1-5 min) der Membran mit einem Röntgenfilm (Hyperfilm ECL,

Amersham Buchler, Braunschweig) in einer mit Verstärkerfolien ausgekleideten Röntgenkassette sichtbar.

4.6.2 Hämodynamik

Während der gesamten Versuchsdauer (Schock, Reperfusion, IVM) erfolgte eine kontinuierliche Überwachung des mittleren arteriellen Druckes (MAP) und der Herzfrequenz (HF), wobei die Werte alle 15 Minuten dokumentiert wurden.

Gewährleistet wurde dies durch den Anschluss des Karotiskatheters an einen Druckwandler (Becton Dickinson, Singapur), über den die Pulskurve und der numerische Wert des Blutdrucks auf einem Monitor (Hewlett Packard M1166A, Model 66S, Hewlett Packard GmbH, Böblingen, Deutschland) dargestellt wurde. Die Bestimmung der Herzfrequenz erfolgte durch Auszählung der Pulskurve auf dem Monitor, wodurch eine Berechnung der Herzschläge pro Minute möglich wurde.

4.6.3 Intravitalmikroskopische Auswertung

Die digital aufgenommenen Bilder wurden off-line verblindet analysiert. Die Auswertung der Aufnahmen erfolgte mittels einer hochauflösenden Software (SimplePCI, Version 5.3, Compix Inc. Imaging Systems, Cranberry Township, USA), wobei die Einstellungen der Kalibrierung und der Kontrastwerte bei den entsprechenden Bildern identisch belassen wurden.

4.6.3.1 Mitochondrialer Redox-Status

Zur intravitalmikroskopischen Beurteilung des mitochondrialen Redox-Status des Lebergewebes wurden die einzelnen Azini markiert und die NAD(P)H-Autofluoreszenz in den markierten Feldern densitometrisch bestimmt. Pro Gesichtsfeld wurde die NAD(P)H-Autofluoreszenz in mindestens 6 Azini gemessen. Die Darstellung erfolgte als Durchschnitts-Intensität pro Leberazinus.

4.6.3.2 Anzahl der perfundierten Sinusoide (pS)

Zur Bestimmung der Anzahl der perfundierten Sinusoide wurde in einem Abstand von 100 μm von einer Zentralvene die perfundierten Sinusoide auf einem Abschnitt von 200 μm Länge gezählt. Diese Messung erfolgte in fünf Gesichtsfeldern pro Tier.

4.6.3.3 Mittlerer sinusoidaler Durchmesser (Ds)

Zur Bestimmung des mittleren sinusoidalen Durchmessers wurde in mindestens 20 Sinusoiden pro Perizentralfeld der quere Abstand der Sinusoidwände markiert und anschließend hieraus die mittlere sinusoidale Weite pro Gesichtsfeld errechnet. Diese Messung erfolgte in fünf Gesichtsfeldern pro Tier.

4.6.3.4 Erythrozyten-Geschwindigkeit (V_{Ery})

Die Messung der Erythrozyten-Geschwindigkeit erfolgte an fünf markierten Sinusoiden pro Perizentralfeld. Hierbei wurde die Länge der einzelnen Sinusoidabschnitte gemessen (Vgl. Abbildung 9) und anschließend die Zeit bestimmt, die ein markierter Erythrozyt benötigte, um die Strecke zurückzulegen. Aus diesen Werten konnten die einzelnen Geschwindigkeiten der Erythrozyten nach der Formel $V_{\text{Ery}} = \text{Strecke}/\text{Zeit}$ errechnet werden.

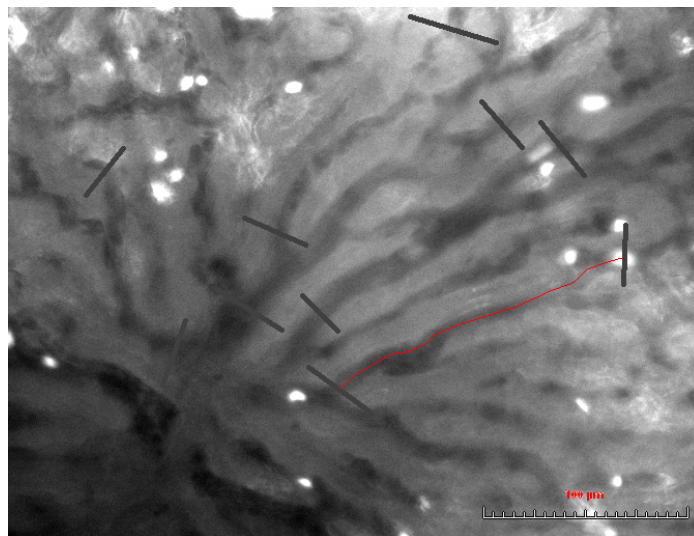


Abbildung 9: Messung der Erythrozyten-Geschwindigkeit. Rot markiert: Pfad des Erythrozyten im Sinusoidabschnitt

4.6.3.5 Volumetrischer Blutfluss (VBF)

Der VBF wurde aus den gemessenen Werten gemäß der Formel

$$\text{VBF} = V_{\text{Ery}} * \pi * (\text{Ds}/2)^2$$

berechnet.

Aus der Geschwindigkeit der Erythrozyten sowie der Querschnittsfläche der einzelnen Sinusoide konnte somit das Blutvolumen pro Zeiteinheit bestimmt werden, welches den Sinusoid durchfließt.

4.6.4 Bestimmung der Zytokinspiegel im Serum

Die Zytokinspiegel von TNF- α und IL-10 im gewonnenen Blutserum wurden mittels spezifischer „enzyme linked immunabsorbent assay“ (ELISA) innerhalb von 3 Monaten nach Blutentnahme quantifiziert.

Die verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders erwähnt, von Sigma Chemicals (St. Louis, MO) oder Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen und waren von der höchsten erhältlichen Reinheit.

Bei den Zytokinassays handelte es sich um kommerziell erhältliche ELISA-Kits (BD OptiEIA™; BD Biosciences, Pharmingen, Heidelberg) die alle nach dem „Sandwichprinzip“ (Abbildung 10) arbeiten. Das zu bestimmende Zytokin wird dabei zwischen zwei Antikörpern eingebettet. Diese beiden Antikörper binden an zwei verschiedenen Epitopen des zu messenden Zytokins. Nur bei spezifischer Bindung des Zytokins an den Antikörper 1 kann auch der mit dem Enzym für die Farbreaktion gekoppelte Antikörper 2 binden. Unspezifische Bindungen werden durch mehrfache Waschschriffe gelöst. Somit ist die Intensität der Farbreaktion proportional zur Menge des gebundenen Zytokins.

Die Messung wurde gemäß der vom Hersteller der ELISA-Kits angegebenen Analysetechnik durchgeführt. Kurz gefasst ergaben sich folgende Arbeitsschritte:

- Beschichtung der 96-Well-Mikrotiterplatten (Nunc immunoplate; Fa. Nunc; Wiesbaden) mit 50 μ l/well Beschichtungspuffer, einem 0,1 molaren Carbonat/Bicarbonat- Puffer, der 4 μ l/ml capture antibody (monoklonaler Antikörper) enthielt.
- Inkubation der beschichteten Platten bei 4°C für mindestens 12 Stunden
- Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Platte sechs Mal mit Waschlösung gewaschen. Diese Waschlösung wurde aus phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) unter Zugabe von 0,05% Tween hergestellt.
- Durch Zugabe von in PBS gelöstem fetalen Kälberserum (10%FCS/ PBS-Blockierungspuffer) wurden noch unbesetzte freie Bindungsstellen des Kunststoffes 1h bei Raumtemperatur abgesättigt.

- Nach erneutem dreimaligem Waschen mit der Waschlösung erfolgte dann das Auftragen der Standardverdünnungsreihen und der zu analysierenden Proben mit einer sich anschließenden Inkubation bei 27°C über zwei Stunden. Während dieses Schrittes geht der am Boden der Platte gebundene Antikörper eine Verbindung mit dem zu messenden Zytokin ein.
- Durch sechsmaliges Waschen werden alle ungebundenen Proteine entfernt.
- Nach Auftragen von 100µl/well eines Sekundärantikörpers, der an ein weiteres Epitop des Zytokins bindet und Peroxidase gekoppelt ist, wird die Platte erneut bei 27°C eine Stunde lang inkubiert.
- Zugabe von 100µl/well Substratlösung (Tetramethylbenzidin (TMB) in Dimethylformamid (DMF)) und Inkubation der Platte im Dunkeln.
- Stoppen des Reaktionsschrittes nach ausreichender Farbreaktion nach etwa 20min mit 50µl 1-molarer Schwefelsäure (H₂SO₄).
- Anschließend folgt die photometrische Messung der Extinktion bei 450nm gegen Verdünnungspuffer (Referenzwellenlänge 620nm), die der umgesetzten Menge Substrat und damit der Zytokinkonzentration der Probe proportional ist.

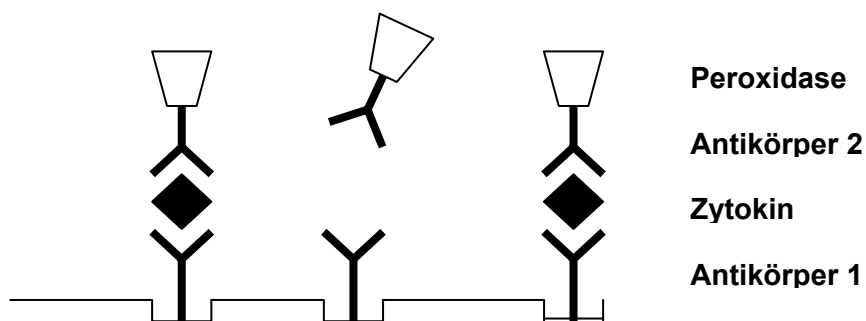


Abbildung 10: Schematische Darstellung des "Sandwich-Prinzips" der ELISA-Messsysteme. Nur wenn das Zytokin an Antikörper 1 gebunden hat, kann auch Antikörper 2, der mit dem Enzym für die Farbreaktion gekoppelt ist, binden. Die beiden Antikörper binden an zwei verschiedene Epitope des Zytokins. Die Intensität der Farbreaktion ist proportional zur Menge der gebundenen Zytokine, da unspezifische Bindungen in mehrfachen Waschsritten gelöst werden.

Für jede Testserie wurden Standards mit bekannten Konzentrationen mitgeführt und eine Bezugskurve durch Auftragen von Extinktion gegen Konzentration erstellt. Anhand dieser konnten dann die exakten Zytokinkonzentrationen der Proben bestimmt werden.

Die Absorption wurde für alle Assays mittels eines ELISA-Readers (Mikrotek-Laborsysteme GmbH, Overath) gemessen, die Daten mit dem dazu passenden „MikroWin“-Softwarepaketes (Mikrotek-Laborsysteme GmbH, Overath) ausgewertet und die exakten Standardkurven und Zytokinkonzentrationen ermittelt.

4.6.5 Bestimmung der Leberenzyme im Serum

Die quantitative Bestimmung der leberspezifischen Enzyme Aspartat-Aminotransferase (ASAT), Alanin-Aminotransferase (ALAT) und Glutamat-Dehydrogenase (GLDH) erfolgte im chemischen Zentrallabor des Universitätsklinikums aus den am Versuchsende entnommenen Blutproben mittels kommerziell verfügbarer Kits (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland).

4.7 Blutgasanalyse

Aus den zu den Zeitpunkten t^0 (vor Schockbeginn), t^1 (Ende Schockphase vor Reperfusion) und t^2 (nach Beendigung der Reperfusion) entnommenen arteriellen Blutproben wurden nach Entnahme maschinell (Nova pHox®plus L, Nova Biomedical Corporation, Waltham, USA) paO_2 , Hämatokrit und Laktat bestimmt.

4.8 Statistik

4.8.1 Berechnung der Versuchstierzahl und Nullhypothesen

Die Berechnung der Gesamtstierzahl erfolgte unter Berücksichtigung von Erfahrungswerten früherer Studien, nach der von KASTENBAUM et al. (1970) beschriebenen Methode. Hierbei wurde ein α -Fehler von 0,05 und ein β -Fehler von 0,1 zugrunde gelegt.

Folgende Nullhypothesen wurden festgelegt:

- Die Vorbehandlung mit HAR führt nicht zu einer HO-1-Induktion.
- Die Vorbehandlung mit HAR führt nicht zu einer Verbesserung der sinusoidalen Mikrozirkulation nach H/R
- Die Vorbehandlung mit HAR führt nicht zu einer Veränderung der Leberenzyme nach H/R.
- Die Vorbehandlung mit HAR führt nicht zu einer veränderten Zytokin-Antwort nach H/R.
- Eine Veränderung der oben genannten Parameter ist nicht HO-1-abhängig.
- Eine Veränderung der oben genannten Parameter ist nicht CO-abhängig.

4.8.2. Statistische Auswertung

Die statistische Analyse der Daten wurde unter Zuhilfenahme des Softwarepaketes SigmaStat[®] (Version 2.0, Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA) vorgenommen. Bei normal verteilten Daten kam die One way Analysis of Variance (ANOVA) zur Anwendung. Bei Durchführung multipler statistischer Tests wurde zusätzlich der Student-Newman-Keuls post-hoc Test eingesetzt. Als Signifikanzniveau wurde ein p-Wert von $< 0,05$ festgelegt.

4.8.3. Grafische Darstellung der Ergebnisse

Die grafische Aufarbeitung erfolgte unter Zuhilfenahme des Softwarepaketes SigmaPlot[®] (Version 5.02, Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA). Die Daten wurden als Mittelwert \pm Standard Error of the Mean (SEM) angegeben.

5. Ergebnisse

5.1 HO-1-Proteinexpression im Lebergewebe

24 Stunden nach Vorbehandlung führte HAR, jedoch nicht Vollelektrolytlösung (Vehikel) im Lebergewebe zu einer signifikanten Induktion der HO-1-Proteinexpression im Vergleich zu nicht vorbehandelten Tieren (Sham).

(Abbildung 11 A, B)

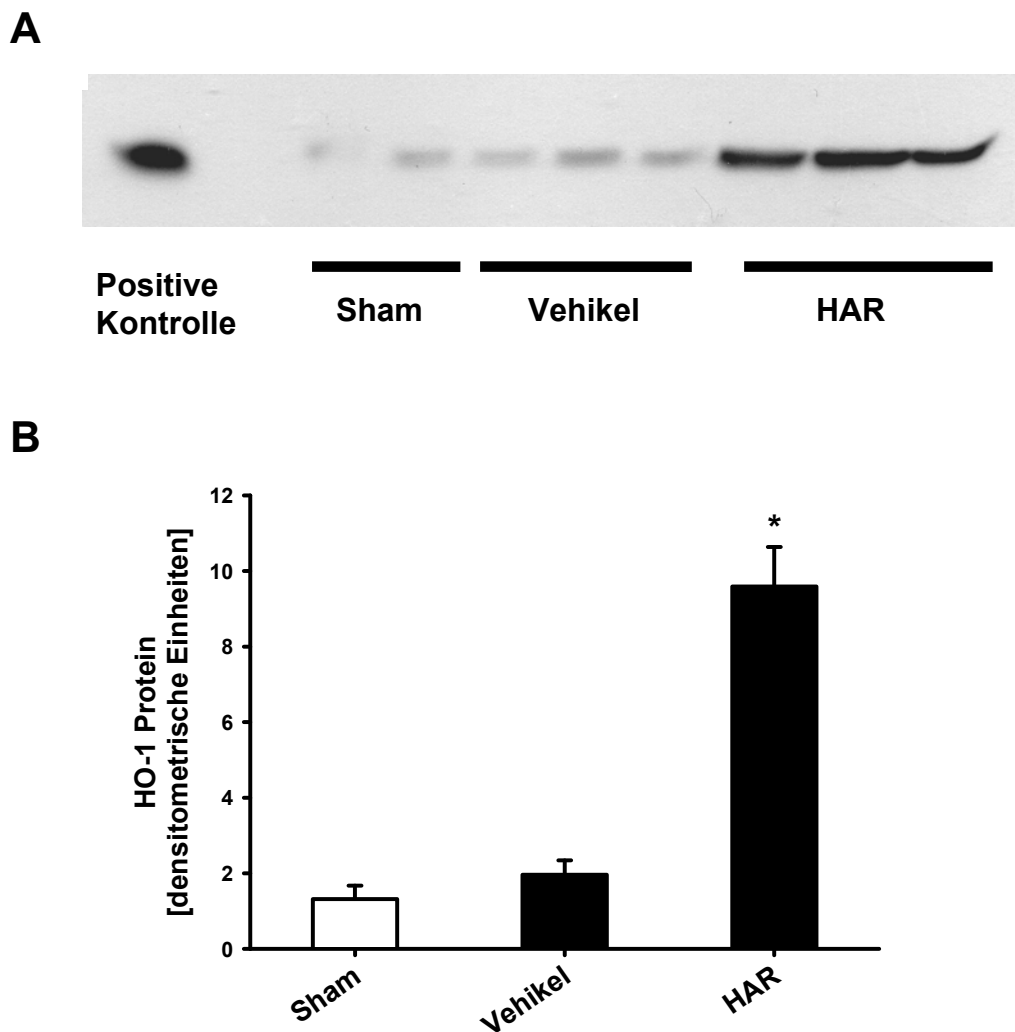


Abbildung 11: Western-Blot (A) und densitometrische Analyse (B) der HO-1-Protein-Expression im Lebergewebe 24h nach Vorbehandlung mit HAR (5mg/kg) oder Vollelektrolytlösung (Vehikel; 30ml/kg). * $p < 0,05$ vs. Sham; Mittelwerte \pm SA von $n=4$ /Gruppe. ANOVA und Student-Newman-Keuls.

5.2 Makrohämodynamik

Die Ausgangswerte des mittleren arteriellen Drucks (MAP) und der Herzfrequenz (HF) waren in allen Gruppen vergleichbar. Die Tiere der Sham-Gruppe wiesen über die gesamte Versuchsdauer normale und stabile hämodynamische Parameter auf.

Die Einleitung des hämorrhagischen Schocks führte zu einem initial starken Abfall des MAP und der HF. Die Retransfusion von 60% des entnommenen Blutes am Ende der Schockperiode und die anschließende Reperfusionphase führten zu einer kompletten Erholung der hämodynamischen Parameter in fast allen Gruppen. Lediglich die mit DCM behandelten Tiere wiesen auch bei Versuchsende noch einen gegenüber dem Ausgangswert signifikant erniedrigten MAP auf. (Tabelle 2)

	Ausgangswert	Schockende	Beginn Reperfusion	Ende Reperfusion
Sham				
MAP	128±8	120±5	117±5	127±8
HF	334±18	379±25	405±17	382±15
Vehikel + H/R				
MAP	128±6	35±1*	109±4*	116±6
HF	327±15	282±27	293±14	321±17
Vehikel+SnMP-IX+H/R				
MAP	138±7	34±2*	104±11	128±11
HF	411±23	300±18*	354±13	351±9
HAR + H/R				
MAP	128±5	34±1*	118±5	127±7
HF	347±12	274±17*	327±19	364±18
HAR+SnMP-IX + H/R				
MAP	125±4	35±1*	101±3*	126±4
HF	320±7	224±13*	270±9*	311±14
HAR+SnMP-IX +DCM + H/R				
MAP	125±6	37±1*	107±4*	108±5*
HF	327±9	277±14*	287±13*	334±8

Tabelle 2: Tabellarische Darstellung der hämodynamischen Daten der Versuchstiere während des Versuchsablaufs. Zum Vergleich dient die scheinoperierte Gruppe ohne Schockbehandlung (Sham). HAR: Häminarginat; SnMP-IX: Zinn-Mesoporphyrin-IX; DCM: Dichlormethan; MAP: Mittlerer arterieller Druck [mmHg]; HF: Herzfrequenz [Schläge/min]. Daten sind Mittelwerte ± SA von n=8/Gruppe. *p<0,05 vs. Ausgangswert. ANOVA und Student-Newman-Keuls.

5.3 Blutgasanalyse

Die Ausgangswerte der respiratorischen Parameter (pO_2 , pCO_2) und des Säure-Basen-Haushaltes (pH, Basenüberschuss) lagen in allen Gruppen in den Normbereichen.

Der hämorrhagische Schock führte in allen Schockgruppen zu einer ausgeprägten metabolischen Azidose, welche sich in einem signifikanten Abfall des Basenüberschusses widerspiegelte. Diese wurde durch Hyperventilation der Tiere respiratorisch kompensiert, so dass am Ende der Schockphase reduzierte pCO_2 – bei unveränderten pH-Werten zu beobachten waren. Die Reperfusion führte zur weitgehenden Normalisierung der respiratorischen und metabolischen Parameter in allen Schockgruppen. (Tabelle 3)

Die zusätzliche Gabe von SnMP-IX bzw. DCM führte zu keiner weiteren Veränderung dieser Parameter im Vergleich zu den entsprechenden Referenzgruppen. (Tabelle 3)

Die Verabreichung von DCM vor Einleitung des hämorrhagischen Schocks führte zu einem signifikanten Anstieg des CO-Hämoglobins (von $3,3 \pm 0,6\%$ auf $12,2 \pm 3,7\%$, $p < 0,05$, Daten nicht präsentiert).

Tabelle 3 (folgende Seite): Tabellarische Darstellung der Blutgasanalysen der untersuchten Gruppen zu Beginn des Versuches (Ausgangswert), am Ende der Schockphase (Ende Schock) und am Ende des Versuches direkt vor Intravitalmikroskopie (Ende Reperfusion). Zum Vergleich dient die scheinoperierte Gruppe ohne Schockbehandlung (Sham). HAR: Häminarginat; SnMP-IX: Zinn-Mesoporphyrin-IX; DCM: Dichlormethan; H/R: hämorrhagischer Schock + Reperfusion. Daten sind Mittelwerte \pm SA von $n=8$ /Gruppe. * $p < 0,05$ vs. Ausgangswert.

	Ausgangswert	Ende Schock	Ende Reperfusion
Sham			
pH	7.39±0.02	7.36±0.01	7.36±0.02
Basenüberschuss [mmol/l]	-1.11±0.53	-0.55±0.56	-0.79±0.45
pCO ₂ [mmHg]	42.1±1.5	39.4±2.5	36.0±3.8
pO ₂ [mmHg]	75.9±2.3	72.8±4.2	80.3±4.8
pH			
Vehikel + H/R	7.34±0.01	7.36±0.02	7.42±0.04
Vehikel + SnMP-IX + H/R	7.41±0.01	7.43±0.02	7.36±0.02
HAR + H/R	7.37±0.01	7.34±0.02	7.47±0.02
HAR + SnMP-IX + H/R	7.39±0.01	7.42±0.01	7.43±0.01
HAR + SnMP-IX + DCM + H/R	7.42±0.02	7.40±0.03	7.46±0.02
Basenüberschuss [mmol/l]			
Vehikel + H/R	-1.63±0.96	-9.75±1.51*	1.83±1.42
Vehikel + SnMP-IX + H/R	1.70±0.80	-4.70±0.10*	-1.55±0.35
HAR + H/R	-0.46±0.63	-11.86±1.24*	1.00±1.11
HAR + SnMP-IX + H/R	-1.73±0.54	-7.42±1.22*	3.44±0.56
HAR + SnMP-IX + DCM + H/R	-0.91±0.88	-13.28±1.78*	1.55±1.40
pCO₂ [mmHg]			
Vehikel + H/R	45.2±2.4	27.9±2.9*	42.5±5.2
Vehikel + SnMP-IX + H/R	47.3±1.6	30.6±1.6*	47.3±1.4
HAR + H/R	43.7±2.5	25.4±1.5*	35.2±3.6
HAR + SnMP-IX + H/R	37.2±2.7	27.1±2.1*	41.6±2.4
HAR + SnMP-IX + DCM + H/R	37.8±2.6	19.1±2.6*	32.2±1.6
pO₂ [mmHg]			
Vehikel + H/R	76.8±2.9	116.1±6.8*	87.6±15.2
Vehikel + SnMP-IX + H/R	73.6±4.7	117.2±11.5*	82.0±7.2
HAR + H/R	71.4±3.6	138.9±8.5*	87.0±8.3
HAR + SnMP-IX + H/R	78.7±5.3	131.1±11.6*	89.1±7.9
HAR + SnMP-IX + DCM + H/R	87.3±3.2	147.7±2.5*	91.1±5.8

(Tabelle 3, Blutgasanalysen)

5.4 Hepatozellulärer Schaden nach Hämorrhagie und Reperfusion

Die Abschätzung des hepatozellulären Schadens erfolgte durch Messung des Enzym-Gehalts von ASAT, ALAT und GLDH im Blutserum. Hämorrhagischer Schock und anschließende Reperfusion erhöhten signifikant ASAT, ALAT und GLDH gegenüber Sham in allen Schockgruppen. Obwohl die Gruppen Vehikel und HAR+SnMP-IX eine geringere Freisetzung von Leberenzymen aufwiesen, konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Schockgruppen beobachtet werden. (Tabelle 4)

	ALAT	ASAT	GLDH
Sham	55±5.3	92±8.9	5.4±0.3
Vehikel + H/R	98±28.7 ^{\$}	191±33.1 ^{\$}	11.9±2.5 ^{\$}
Vehikel +SnMP-IX + H/R	91.7±21.8 ^{\$}	291.3±68.9 ^{\$}	15.7±4.0 ^{\$}
HAR + H/R	111±23.5 ^{\$}	286±46.1 ^{\$}	17.8±5.6 ^{\$}
HAR+SnMP-IX + H/R	91±14.6 ^{\$}	174±45.3 ^{\$}	10.8±2.9 ^{\$}
HAR+SnMP-IX +DCM + H/R	75±12.1 ^{\$}	205±38.0 ^{\$}	18.8±5.1 ^{\$}

Tabelle 4: Hepatozellulärer Schaden in den untersuchten Gruppen am Versuchsende. Zum Vergleich dient die scheinoperierte Gruppe ohne Schockbehandlung (Sham). ALAT: Alaninaminotransferase [Einheiten/L]; ASAT: Aspartataminotransferase [Einheiten/L]; GLDH: Glutamatdehydrogenase [Einheiten/L]; HAR: Häminarginat; SnMP-IX: Zinn-Mesoporphyrin-IX; DCM: Dichlormethan; H/R: Hämorrhagischer Schock + Reperfusion. Daten sind Mittelwerte ± SA von n=8/Gruppe. ^{\$}p<0,05 vs. Sham.

5.5 Intravitalmikroskopische Auswertung

5.5.1 Parameter der sinusoidalen Perfusion

5.5.1.1 Sinusoidaler Durchmesser

Im Vergleich zu Sham führte der hämorrhagische Schock mit anschließender Reperfusion zu einer signifikanten Reduktion der sinusoidalen Durchmesser in der Gruppe Vehikel. (Abbildung 12 A; 13 A, B)

Die Vorbehandlung mit HAR verhinderte eine schockinduzierte sinusoidale Konstriktion und führte gegenüber Vehikel zu einer signifikanten Dilatation der Sinusoide. (Abbildung 12 A; 13 D)

Die Blockade der HO-Aktivität mit SnMP-IX führte zu keiner weiteren Veränderung der sinusoidalen Durchmesser in der Gruppe Vehikel, hob jedoch die HAR-vermittelte Wirkung komplett auf. (Abbildung 12 A; 13 C, E)

Die zusätzliche Gabe von DCM nach HAR-Vorbehandlung mit SnMP-IX-Applikation kehrte die beobachtete SnMP-IX Wirkung wieder um, so dass vergleichbare sinusoidale Durchmesser wie nach alleiniger HAR-Vorbehandlung resultierten. (Abbildung 12 A; 13 F)

5.5.1.2 Anzahl der perfundierten Sinusoide

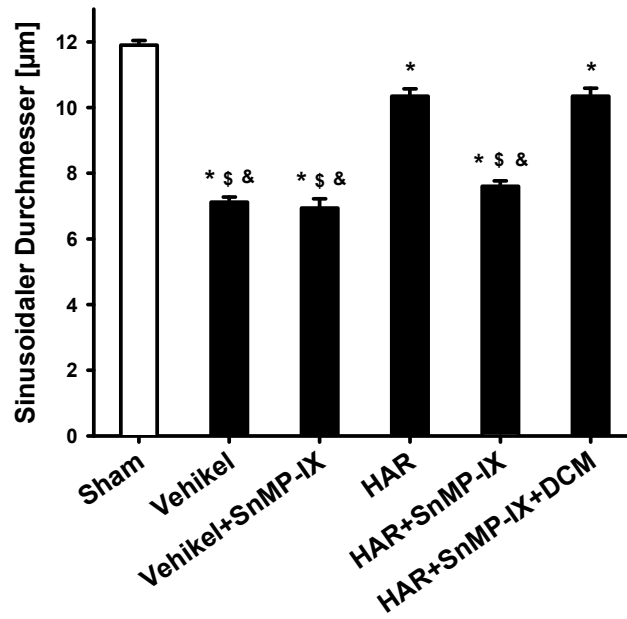
Im Vergleich zu Sham führte der hämorrhagische Schock mit anschließender Reperfusion zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl der perfundierten Sinusoide in der Gruppe Vehikel. (Abbildung 12 B; 13 A, B)

Die Vorbehandlung mit HAR verhinderte eine schockinduzierte Abnahme der Anzahl der perfundierten Sinusoide und führte gegenüber Vehikel zur signifikanten Zunahme der Anzahl der perfundierten Sinusoide. (Abbildung 12 B; 13 D)

Die Blockade der HO-Aktivität mit SnMP-IX führte zu keiner weiteren Veränderung der Anzahl der perfundierten Sinusoide in der Gruppe Vehikel, hob jedoch die HAR-vermittelte Wirkung komplett auf. (Abbildung 12 B; 13 C, E)

Die zusätzliche Gabe von DCM nach HAR-Vorbehandlung mit SnMP-IX Applikation kehrte die beobachtete SnMP-IX Wirkung wieder um, so dass eine vergleichbare Anzahl der perfundierten Sinusoide wie nach alleiniger HAR-Vorbehandlung resultierte. (Abbildung 12 B; 13 F)

A



B

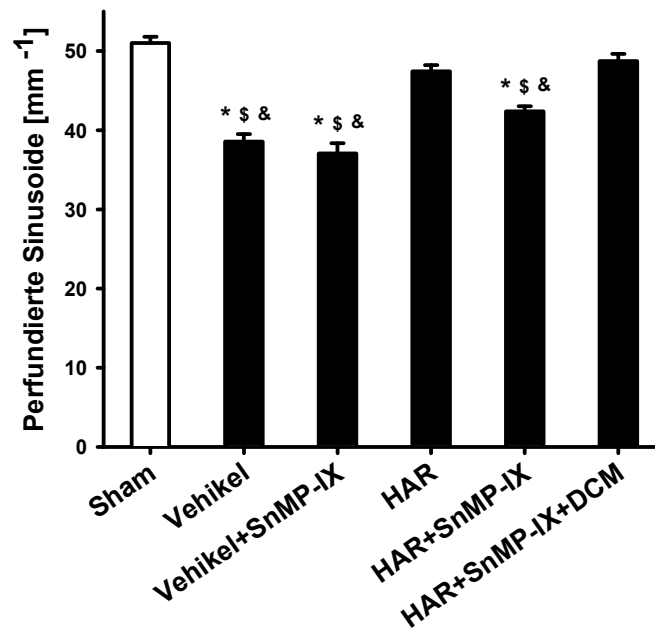


Abbildung 12: Veränderungen der sinusoidalen Durchmesser (A) und der Zahl der perfundierten Sinusoide (B) am Ende des Versuchsablaufs.

□ kein Schock, ■ Häorrhagischer Schock+Reperfusion. Sham: scheinoperierte Tiere, HAR: Häminarginat, SnMP-IX: Zinn-Mesoporphyrin-IX, DCM: Dichlormethan. * $p < 0,05$ vs. Sham, \$ $p < 0,05$ vs. HAR, & $p < 0,05$ vs. HAR+SnMP-IX+DCM, Daten sind Mittelwerte \pm SA von $n=8$ /Gruppe. ANOVA und Student-Newman-Keuls.

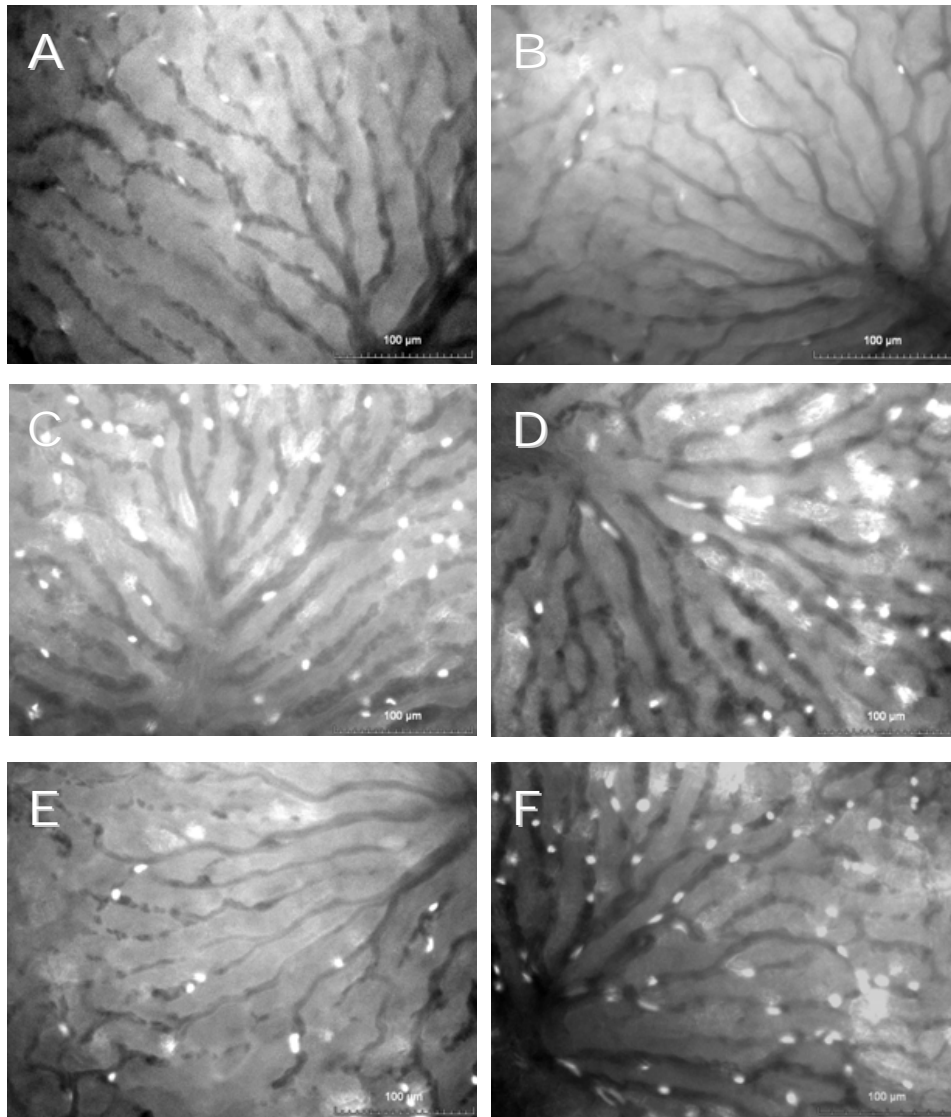


Abbildung 13: Repräsentative intravitalmikroskopische Aufnahmen des sinusoidalen Netzwerks. Dargestellt sind Aufnahmen von scheinoperierten Tieren, die keinem Schock unterzogen wurden (Sham; A), mit Vollelektrolytlösung vorbehandelten Tieren (Vehikel; B) und zusätzlich blockiertem HO-Stoffwechsel mittels SnMP-IX (Vehikel+SnMP-IX; C) sowie von mit HAR vorbehandelten Tieren (HAR; D), mit zusätzlicher SnMP-IX- (HAR+SnMP-IX; E) und DCM-Gabe (HAR+SnMP-IX+DCM; F). Kontrastverstärkung durch Fluorescein-Isothiocyanat und FITC-markierte Erythrozyten. 150x Vergrößerung.

5.5.1.3 Mittlere Erythrozytengeschwindigkeit

Die mittlere Erythrozytengeschwindigkeit variierte zwischen den Gruppen.

Im Vergleich zu Sham führte der hämorrhagische Schock mit anschließender Reperfusion zu keiner signifikanten Veränderung der mittleren Erythrozytengeschwindigkeit in der Gruppe Vehikel. (Abbildung 14 A)

Die Vorbehandlung mit HAR erhöhte signifikant die mittlere Erythrozytengeschwindigkeit im Vergleich zu Sham und Vehikel. (Abbildung 14 A)

Die Blockade der HO-Aktivität mit SnMP-IX führte zu keiner weiteren Veränderung der mittleren Erythrozytengeschwindigkeit in der Gruppe Vehikel, hob jedoch die HAR-vermittelte Wirkung teilweise auf. (Abbildung 14 A)

Die zusätzliche Gabe von DCM nach HAR-Vorbehandlung mit SnMP-IX Applikation kehrte die beobachtete SnMP-IX Wirkung wieder um, so dass eine vergleichbare mittlere Erythrozytengeschwindigkeit wie nach alleiniger HAR-Vorbehandlung resultierte. (Abbildung 14 A)

5.5.1.4 Volumetrischer Blutfluss

Im Vergleich zu Sham führte der hämorrhagische Schock mit anschließender Reperfusion zu einer signifikanten Reduktion des volumetrischen Blutflusses in der Gruppe Vehikel. (Abbildung 14 B)

Die Vorbehandlung mit HAR verhinderte eine schockinduzierte Reduktion des volumetrischen Blutflusses und führte gegenüber Vehikel und sogar gegenüber Sham zu einer signifikanten Zunahme des volumetrischen Blutflusses. (Abbildung 14 B)

Die Blockade der HO-Aktivität mit SnMP-IX führte zu keiner weiteren Veränderung des volumetrischen Blutflusses in der Gruppe Vehikel, hob jedoch die HAR-vermittelte Wirkung komplett auf. (Abbildung 14 B)

Die zusätzliche Gabe von DCM nach HAR-Vorbehandlung mit SnMP-IX Applikation kehrte die beobachtete SnMP-IX Wirkung wieder um, so dass ein vergleichbarer volumetrischer Blutfluss wie nach alleiniger HAR-Vorbehandlung resultierte. (Abbildung 14 B)

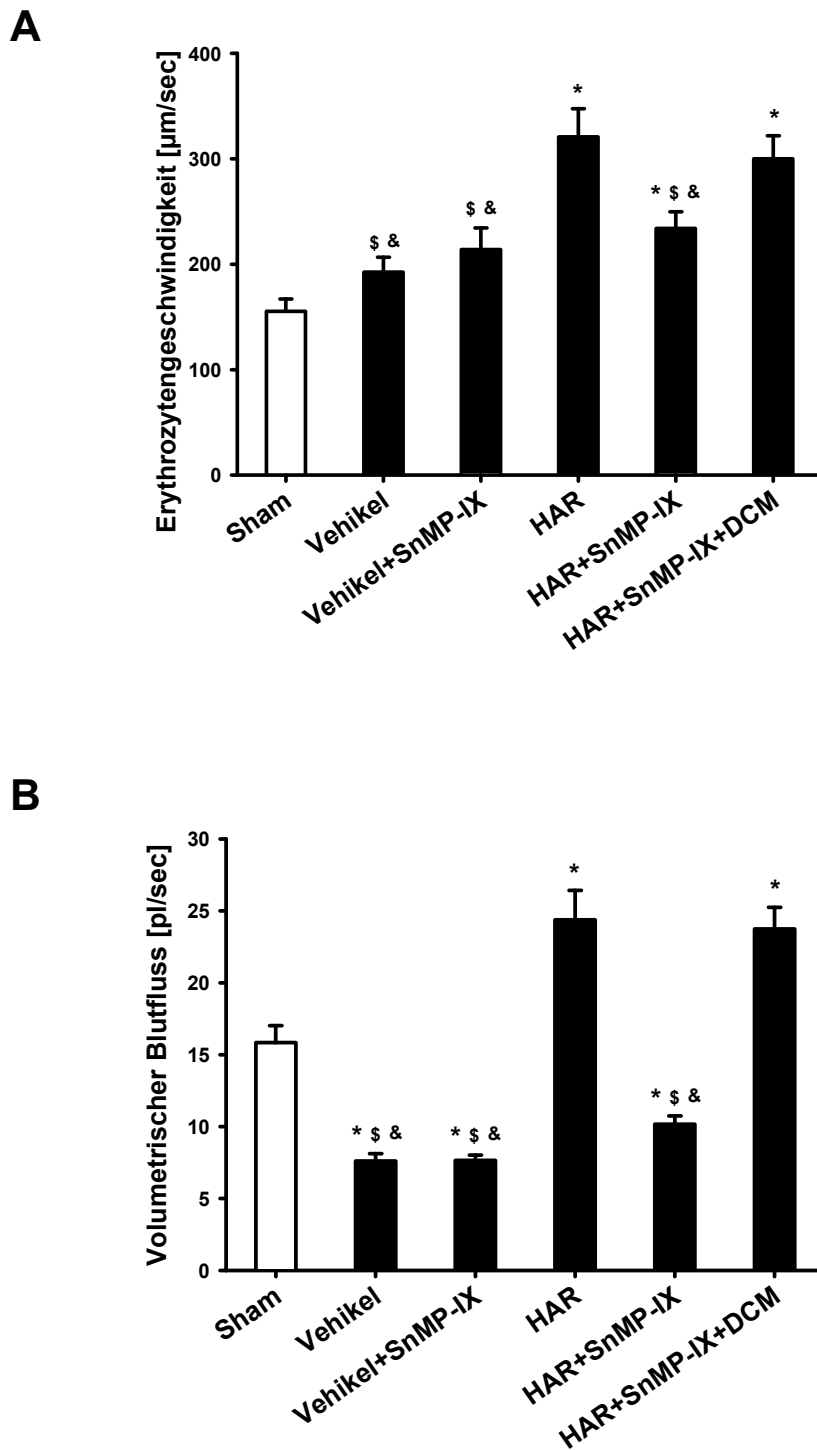


Abbildung 14: Veränderungen der mittleren Erythrozytengeschwindigkeit (A) und des volumetrischem Blutflusses (B) am Ende des Versuchsablaufs.

□ kein Schock, ■ Hämorrhagischer Schock+Reperfusion. Sham: scheinoperierte Tiere, HAR: Häminarginat, SnMP-IX: Zinn-Mesoporphyrin-IX, DCM: Dichlormethan. * $p < 0,05$ vs. Sham, \$ $p < 0,05$ vs. HAR, & $p < 0,05$ vs. HAR+SnMP-IX+DCM, Daten sind Mittelwerte \pm SA von $n=8$ /Gruppe. ANOVA und Student-Newman-Keuls.

5.5.2 Mitochondrialer Redox-Status

Im Vergleich zu Sham führte der hämorrhagische Schock mit anschließender Reperfusion zu einer signifikanten Zunahme der NAD(P)H-Autofluoreszenz als Marker des mitochondrialen Redox-Status in der Gruppe Vehikel. (Abbildung 15,16)

Die Vorbehandlung mit HAR verhinderte eine schockinduzierte Zunahme der NAD(P)H-Autofluoreszenz und führte gegenüber Vehikel zu einer signifikanten Abnahme der NAD(P)H-Autofluoreszenz. (Abbildung 15,16)

Die Blockade der HO-Aktivität mit SnMP-IX führte zu keiner weiteren Veränderung der NAD(P)H-Autofluoreszenz in der Gruppe Vehikel, hob jedoch die HAR-vermittelte Wirkung komplett auf. (Abbildung 15,16)

Die zusätzliche Gabe von DCM nach HAR-Vorbehandlung mit SnMP-IX-Applikation kehrte die beobachtete SnMP-IX Wirkung wieder um, wobei die NAD(P)H-Autofluoreszenz nicht die Werte wie nach alleiniger HAR-Vorbehandlung erreichte. (Abbildung 15,16)

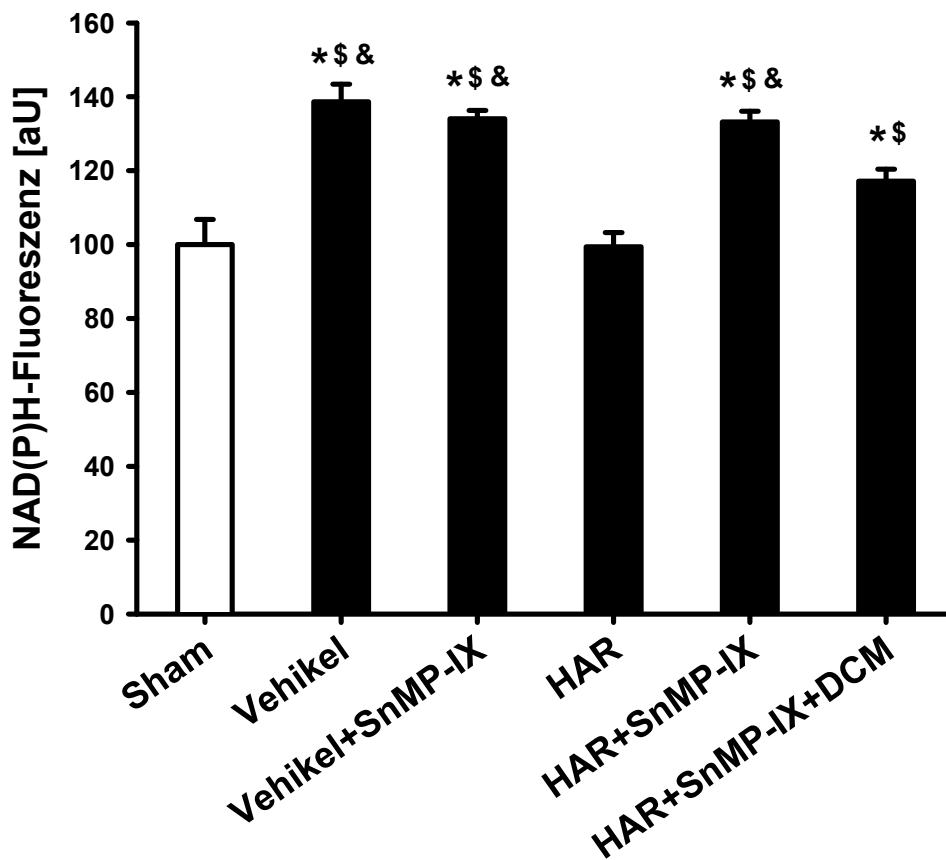


Abbildung 15: Mitochondrialer Redox-Status des Lebergewebes (NAD(P)H-Autofluoreszenz) am Ende des Versuchsablaufs.

□ kein Schock, ■ Hämorrhagischer Schock+Reperfusion. Sham: scheinoperierte Tiere, HAR: Häminarginat, SnMP-IX: Zinn-Mesoporphyrin-IX, DCM: Dichlormethan. * $p < 0,05$ vs. Sham, \$ $p < 0,05$ vs. HAR, & $p < 0,05$ vs. HAR+SnMP-IX+DCM, Daten sind Mittelwerte \pm SA von $n=8$ /Gruppe. ANOVA und Student-Newman-Keuls.

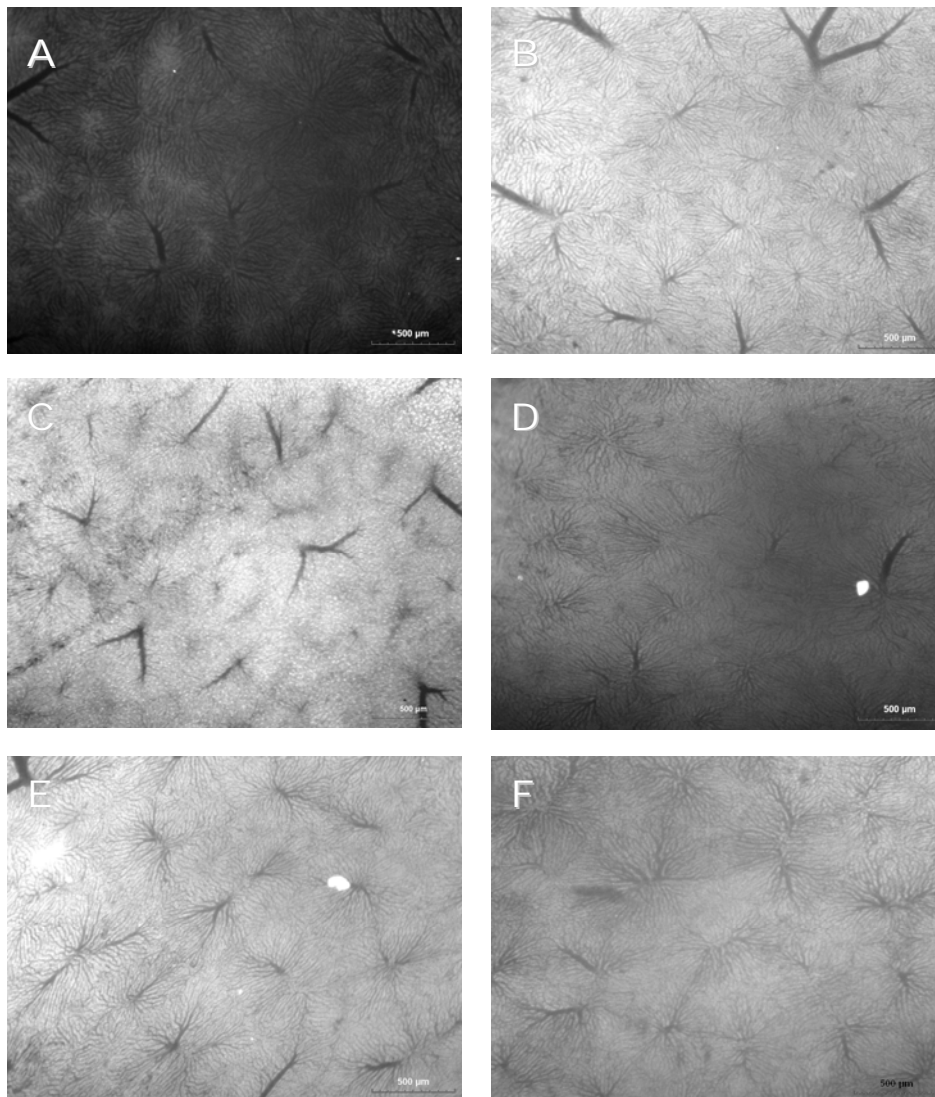


Abbildung 16: Repräsentative intravitalmikroskopische Aufnahmen der NAD(P)H-Autofluoreszenz der Leberoberfläche. Dargestellt sind Aufnahmen von scheinoperierten Tieren, die keinem Schock unterzogen wurden (Sham; A), mit Vollelektrolytlösung vorbehandelten Tieren (Vehikel; B) und zusätzlich blockiertem HO-Stoffwechsel mittels SnMP-IX (Vehikel+SnMP-IX; C) sowie von mit HAR vorbehandelten Tieren (HAR; D), mit zusätzlicher SnMP-IX- (HAR+SnMP-IX; E) und DCM-Gabe (HAR+SnMP-IX+DCM; F). 20x Vergrößerung.

5.6 Zytokinspiegel im Serum (TNF- α und IL-10)

Im Vergleich zu Sham führte der hämorrhagische Schock mit anschließender Reperfusion zu einer signifikanten Erhöhung der Serumspiegel von TNF- α und IL-10 in allen Gruppen. (Abbildung 17 A, B)

Die Vorbehandlung mit HAR veränderte die Freisetzung dieser Zytokine und führte gegenüber Vehikel zu einer tendentiellen Verminderung der proinflammatorischen TNF- α - und einer signifikanten Erhöhung der antiinflammatorischen IL-10-Freisetzung. (Abbildung 17 A, B)

Die Blockade der HO-Aktivität mit SnMP-IX führte zu keiner weiteren Veränderung der Zytokinspiegel im Serum in der Gruppe Vehikel, hob jedoch die HAR-vermittelte Wirkung komplett auf, resultierend in Werten vergleichbar der Gruppe Vehikel. (Abbildung 17 A, B)

Die zusätzliche Gabe von DCM nach HAR-Vorbehandlung mit SnMP-IX Applikation kehrte die beobachtete SnMP-IX Wirkung wieder um, so dass vergleichbare Zytokinspiegel wie nach alleiniger HAR-Vorbehandlung resultierten.

(Abbildung 17 A, B)

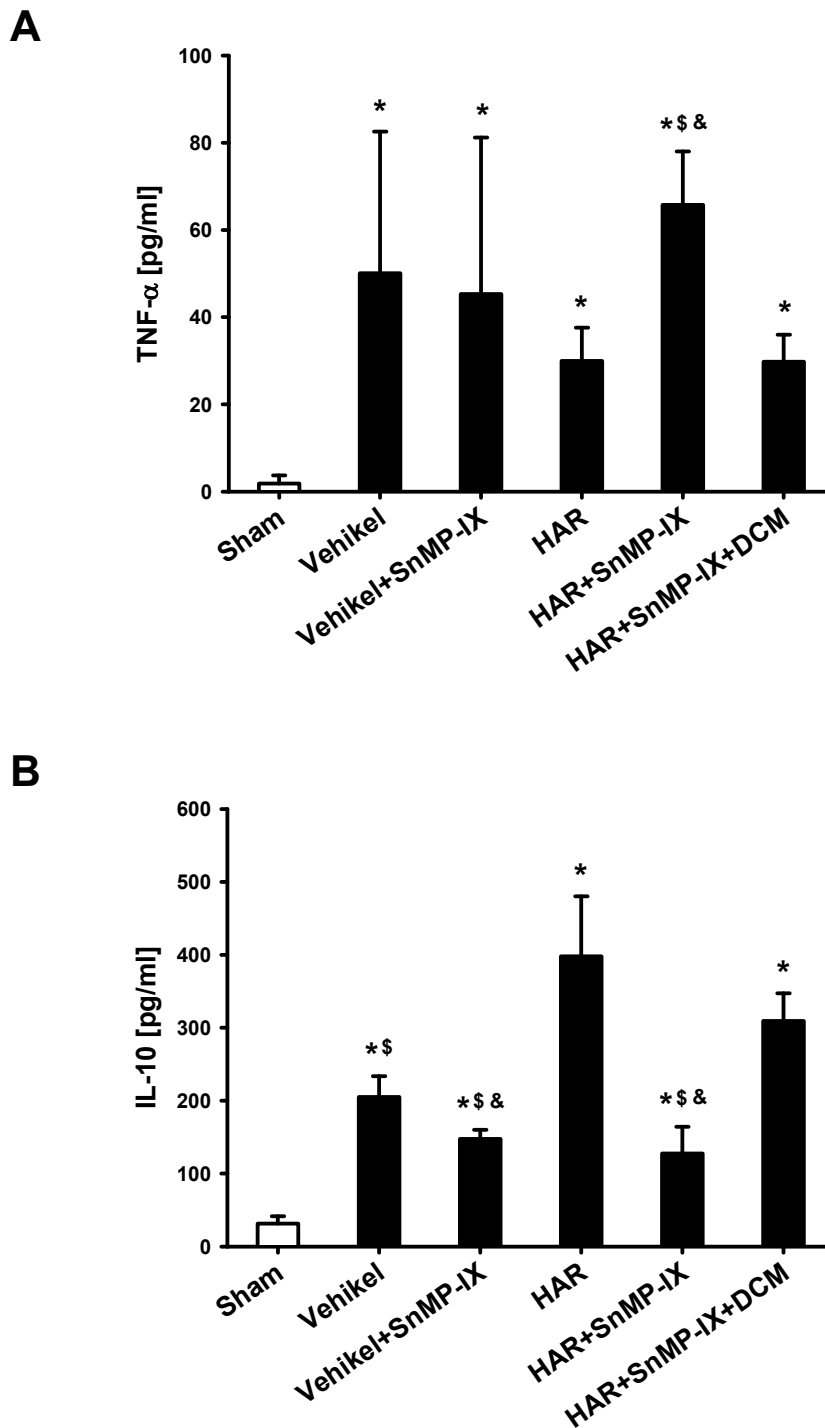


Abbildung 17: Serumspiegel der Zytokine TNF- α (A) und IL-10 (B) am Ende des Versuchsablaufs.

□ kein Schock, ■ Hämorrhagischer Schock+Reperfusion. Sham: scheinoperierte Tiere, HAR: Häminarginat, SnMP-IX: Zinn-Mesoporphyrin-IX, DCM: Dichlormethan. * $p < 0,05$ vs. Sham, \$ $p < 0,05$ vs. HAR, & $p < 0,05$ vs. HAR+SnMP-IX+DCM, Daten sind Mittelwerte \pm SA von $n=6$ /Gruppe. ANOVA und Student-Newman-Keuls

5.7 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Vorbehandlung mit HAR nicht aber mit Vollelektrolytlösung (Vehikel) induzierte eine signifikante HO-1 Proteinexpression im Lebergewebe.

Hämorrhagischer Schock und anschließende Reperfusion führten nach Vehikel-Vorbehandlung durch eine signifikante Verringerung der sinusoidalen Durchmesser und der Anzahl der perfundierten Sinusoide zu einer signifikanten Reduktion der sinusoidalen Gesamtperfusion, die eine Zunahme der NAD(P)H-Autofluoreszenz zur Folge hatte. Darüber hinaus bewirkte die Vehikel-Vorbehandlung eine Zunahme der TNF- α und IL-10 Zytokinspiegel im Serum.

Die Vorbehandlung mit HAR verhinderte die schockinduzierte Reduktion der sinusoidalen Durchmesser, der Anzahl der perfundierten Sinusoide und führte zu einer erhöhten mittleren Erythrozytengeschwindigkeit resultierend in einer Verbesserung der sinusoidalen Gesamtperfusion und entsprechender Reduzierung der NAD(P)H-Autofluoreszenz gegenüber Schock-Kontrolle. Zusätzlich führte die Vorbehandlung mit HAR zu einer antiinflammatorischen Zytokinantwort mit Erhöhung des IL-10-Serumspiegels und einer tendenziellen Verminderung des TNF- α -Serumspiegels gegenüber Vehikel.

Die Blockade des HO-Stoffwechsels durch SnMP-IX nach Vorbehandlung mit Vollelektrolytlösung beeinflusste keinen der gemessenen Parameter gegenüber reiner Vorbehandlung mit Vollelektrolytlösung, führte nach Vorbehandlung mit HAR jedoch zu einer Aufhebung aller HAR-vermittelten Effekte.

Die zusätzliche Gabe des CO-Donors DCM nach HAR-Vorbehandlung und Blockade des HO-Stoffwechsels kehrte die SnMP-IX Wirkung wieder um, so dass Ergebnisse ähnlich wie nach alleiniger HAR-Vorbehandlung resultierten.

6. Diskussion

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass eine Präkonditionierung mit Häminarginat über die Induktion der HO-1 zu einer Verbesserung der sinusoidalen Perfusion und Sauerstoffversorgung des Lebergewebes sowie zu einer anti-inflammatorischen Zytokinantwort nach hämorrhagischem Schock führt.

6.1 Problemstellung

Akuter Blutverlust mit nachfolgendem Schock stellt trotz verbesserter Therapiemöglichkeiten eine gravierende Erkrankung mit hoher Letalität dar (Keel 2005). Die Behandlung mit adäquatem Volumenersatz, inklusive Blutersatz mit Erythrozytenkonzentraten ist hierfür von entscheidender Bedeutung (Carrico 2002). Im Gegensatz zu akuten, unvorhersehbaren Blutungen mit der Notwendigkeit einer raschen Erythrozytensubstitution, können im Rahmen von elektiven chirurgischen Eingriffen entsprechende Maßnahmen getroffen werden, um eine Gefährdung des Patienten durch mögliche Blutverluste und die damit hervorgerufene Ischämie zu minimieren. Neben einem adäquaten operativen Management werden hierzu auch Möglichkeiten zur Präkonditionierung untersucht, um durch präoperative Vorbehandlung eine höhere Stresstoleranz des Gewebes gegenüber nachfolgenden, potentiell schädigenden Ereignissen zu erreichen. Da chirurgische Techniken (Kubulus 2005) oft schwierig durchzuführen und aufwendig sind, wäre eine effektive pharmakologische Vorbehandlung hierfür von besonderem Interesse.

In diesem Zusammenhang gibt es Hinweise, dass für die durch Präkonditionierung hervorgerufene Gewebeprotektion die Induktion der HO-1-Expression und der damit einhergehenden Generierung von vasodilatierenden (CO) und antioxidativen (Biliverdin) Produkten von entscheidender Bedeutung ist (Naito 2004). Zusätzlich scheint die HO-1 die Zytokinexpression zugunsten einer anti-inflammatorischen Antwort zu verändern (Drechsler 2006), so dass hierdurch eine weitere Organprotektion vermittelt wird. Aufgrund der Spezifität des Hämoxxygenasesystems zu Häm sind Häm-haltige Lösungen die potentesten Induktoren der HO-1.

Entsprechend könnte eine durch Häminarginat induzierte HO-1 Expression im Rahmen einer pharmakologischen Präkonditionierung zu einer Gewebeprotektion bei ischämischen Stressereignissen beitragen.

6.2 Diskussion von Material und Methodik

6.2.1 Tiermodell

Die Wahl des zu benutzenden Modells hat problembezogen zu erfolgen (Wortha 1992), also abhängig von den der Studie zugrunde liegenden Fragestellungen und Hypothesen.

Die Untersuchung der hepatischen Mikrozirkulation nach einer kontrollierten Hämorrhagie ist am Menschen aufgrund der notwendigen Invasivität und der möglichen lebensbedrohlichen Risiken ethisch und moralisch nicht möglich. Deshalb wurde zur Beantwortung der Fragestellungen in dieser Studie ein Tiermodell verwendet.

Aufgrund der in dieser Arbeit untersuchten Wirkung einer Vorbehandlung auf die sinusoidale Mikrozirkulation, bot dieses Modell die entscheidenden Vorteile einer Simulation eines hämorrhagischen Schocks mit nachfolgender objektiver Beobachtungsmöglichkeit der mikroskopischen Veränderungen der hepatischen Perfusion. Dagegen erlauben Studien, welche durch indirekte Methoden zur Aufklärung einzelner zellulärer Mechanismen oder Zell-Zell-Interaktionen (Schmid-Schonbein 1980) durch die Reduktion des Modells auf isolierte Zellen, Zellverbände, Gewebe oder Organe eine eher deterministische Betrachtungsweise (Wortha 1992), d.h. die Analyse spezifischer Ursache-Wirkungs-Beziehungen. Der Nachteil solcher Modelle liegt jedoch in der mangelhaften Berücksichtigung der innerhalb eines Organismus typischen Interaktionen zwischen den einzelnen Organsystemen, welche durch makro- und mikrozirkulatorische Parameter, neuronale Steuerungsmechanismen, metabolische Faktoren sowie humorale Kaskadensysteme vermittelt werden (McCuskey, 1986). In-vivo-Modelle, wie das in der vorliegenden Arbeit gewählte, berücksichtigen demgegenüber die interferierenden lokalen und systemischen, positiven und negativen Rückkopplungsmechanismen in der Regulation und Kontrolle komplexer physiologischer oder pathophysiologischer Prozesse (Menger 1993).

In der vorliegenden Studie wurden ausschließlich männliche Sprague-Dawley-Ratten untersucht. Hierdurch sollte vermieden werden, dass das Stadium des Reproduktionszyklus weiblicher Tiere einen Einfluss auf das Outcome nach hämorrhagischem Schock hat, da Östrogene im Rahmen des hämorrhagischen

Schocks protektiv wirken sollen (Jarrar 2000; Jarrar 2000; Mizushima 2000; Kuebler 2003; Ba 2005).

Als Nachteil muss erwähnt werden, dass die Übertragbarkeit der gewonnenen Ergebnisse, ähnlich wie bei allen experimentellen Modellen, aufgrund der vorhandenen physiologischen Unterschiede zwischen Ratte und Mensch limitiert ist. Die vorliegende Arbeit untersucht die Auswirkung einer Hämorrhagie auf die Leberperfusion unter standardisierten Bedingungen, so dass keine Aussagen bezüglich der Interaktionen im gesamten Organismus und somit auch eine direkte Übertragung der gewonnenen Daten auf andere Organe nur eingeschränkt möglich sind. Jedoch verläuft eine akzidentelle Hämorrhagie eher unter unkontrollierten Bedingungen, so dass die Vergleichbarkeit der einzelnen Ergebnisse nicht im gleichen Ausmaß möglich gewesen wäre wie in der vorliegenden standardisierten Studie (Lomas-Niera 2005).

6.2.2 Hämorrhagischer Schock

Die Tiere der Vehikel- und der HAR-Gruppen zeigten nach Ende der Präparation, d.h. vor Beginn der Schockphase, bezüglich der Makrohämodynamik und der Blutgase keine signifikant voneinander verschiedenen Werte. Die Werte entsprachen den Normalwerten für Laborratten.

Entsprechend des Schockmodells nach WIGGERS und INGRAM (1946), unterschied sich der mittlere arterielle Blutdruck aller Gruppen während des hämorrhagischen Schocks nicht signifikant voneinander. Während der Schockphase mussten in der Regel noch mehrmals kleinere Mengen Blut (0,2 - 0,4 ml) entnommen werden, um den Blutdruck aufgrund funktionierender endogener Kompensationsmechanismen im gewünschten Niveau (30 - 40 mmHg) zu halten („Phase der Kompensation“). Als Zeichen der irreversiblen Dekompensation gilt nach WIGGERS und INGRAM (1946) in diesem Modell u.a. das spontane weitere Abfallen des Blutdrucks während der Hypotensionsphase, sowie der, trotz vollständiger Rücktransfusion des vorher entzogenen Blutes, nicht längerfristig ansteigende Blutdruck mit nachfolgend eintretendem Tod des Versuchstieres. In einer vorhergehenden Studie konnte gezeigt werden, dass die Vehikel-Tiere einen mittleren Dekompensationszeitpunkt von 68 min nach Schockbeginn aufwiesen. Im Gegensatz dazu führte die HAR-Vorbehandlung zu einem späteren Auftreten des Dekompensationszeitpunktes, so

dass von einer substanzspezifischen Auswirkung auf die Schocktoleranz ausgegangen werden muss (Kubulus 2005).

Die hämorrhagische Hypotension führt zu einem Abfall des Herzzeitvolumens, der wesentlich durch die verminderte Vorlast bedingt ist. Kompensatorisch entwickelt sich dabei jedoch nicht die beim Menschen typische Tachykardie, sondern eine bei den verwendeten Versuchstieren charakteristische Bradykardie.

Durch den hämorrhagischen Schock entsteht im Organismus eine azidotische Stoffwechsellage, die sich durch den sinkenden pH-Wert und die negative Basenabweichung ausdrückt. Bedingt ist die Azidose durch den infolge des Sauerstoffmangels vermehrt anaerob ablaufenden Glukosestoffwechsel und das daraus entstehende Laktat. Der während der Schockphase stark absinkende paCO_2 (im Mittel unter 25 mmHg) reflektiert respiratorische Kompensationsmechanismen. Der Abfall des pH-Wertes bei begleitendem Abfall der Pufferbasen sowie des paCO_2 , spiegelt daher eine respiratorisch teilkompensierte, metabolische Azidose wieder (Larsen 1995). Parallel zum sinkenden Kohlendioxidpartialdruck stieg der Sauerstoffpartialdruck während des Schocks an. Eine Rolle spielten hierbei die Zunahme der Ventilation durch Erhöhung der Atemfrequenz und möglicherweise ein verbessertes Ventilations/Perfusionsverhältnis (Larsen 1995).

Im Anschluss an die einstündige Hypotensionsphase führte die Retransfusion von 60% des entnommenen Blutes in der Vehikel- und HAR-Gruppe zu einem zügigen Ansteigen des Blutdrucks auf Ausgangswerte sowie zu einer Normalisierung des Säure-Basenhaushalts, so dass man hierbei von einem kompensierten, voll reversiblen Schockmodell ausgehen kann.

6.2.3 Intravitalmikroskopie

Als Methode zur Untersuchung der hepatischen Mikrozirkulation wurde die Intravitalmikroskopie gewählt.

Die Intravitalmikroskopie ist eine so genannte direkte Technik zur detaillierten, qualitativen und quantitativen Analyse dynamischer Phänomene.

Indirekte Verfahren wie Laser-Doppler-Flowmetrie (Arvidsson 1988; Almond 1992; Krejci 2000), der Einsatz von radioaktiven Mikrosphären (Vollmar 1992), Wasserstoff-Gas-Clearance (Metzger 1992; Oda 2003) und Platinium-multiwire-Oberflächen-Elektroden zur Bestimmung der Gewebeoxygenierung (Spiegel 1987) ermöglichen

lediglich indirekte Rückschlüsse auf den Zustand der Mikrozirkulation des zu beobachtenden Gewebes und die Messung von Einzelaspekten, sowie eine ungenügende Aufdeckung der pathogenetischen Mechanismen der hepatischen Mikrozirkulation während Hypovolämie, Sepsis, Transplantation und Ischämie/Reperfusion.

Über die direkte Visualisierung des mikrozirkulatorischen Gefäßbetts bietet die Intravitalmikroskopie für die Analyse der Mikrozirkulation der Leber somit Vorteile gegenüber den indirekten Verfahren und ist diesen hinsichtlich der Fragestellung dieser Arbeit überlegen (Menger 1991; Uhlmann 1999).

Eine Echtzeit-Messung der verschiedenen Parameter der Mikrozirkulation ist aufgrund ihrer Vielzahl und der Geschwindigkeit, mit der diese Vorgänge ablaufen nahezu unmöglich. Durch das verwendete Setup des intravitalmikroskopischen Arbeitsplatzes können die durch die hochauflösende Digitalkamera aufgenommenen Sequenzen direkt digital gespeichert und später off-line verblindet analysiert werden. Die digitale Speicherung und Verarbeitung der Aufnahmen erlaubt eine wiederholte Analyse der Bildsequenzen, wobei durch Zuhilfenahme von Zeitlupe, Bild zu Bild-Analyse oder Standbildern auch komplexe, rasch ablaufende Vorgänge mit hoher Genauigkeit erfasst werden können. Außerdem ermöglicht die digitale Verarbeitung eine rationelle Quantifizierung der Parameter, wodurch große Datenmengen in kurzer Zeit ausgewertet werden können. Zudem können nachträglich Kontrastverhältnisse verstärkt werden, was die genaue Abgrenzung der verschiedenen Strukturen erleichtert.

Die Intravitalmikroskopie erlaubt bei gleichen Vergrößerungen und Kalibrierungen des Mikroskops und der Software eine direkte Messung von Sinusoiddurchmessern, Flussgeschwindigkeiten und NAD(P)H-Autofluoreszenz.

Um die Veränderungen der Mikrozirkulation nach hämorrhagischem Schock und Vorbehandlung mit Häminarginat möglichst umfassend und genau zu analysieren, wurde in der vorliegenden Studie die Epifluoreszenz-Intravitalmikroskopie mit invertiertem Mikroskop eingesetzt (Takei 1991). Hierbei sind das Filtersystem und die Lampe oberhalb des ausgelagerten Leberlappens lokalisiert. Durch den Einsatz einer Epiillumination der Leberoberfläche kann das Gewebe unabhängig von seiner Dicke analysiert werden, da die Durchleuchtung des Gewebes nicht nötig ist. Nachteilig bei dieser Methode ist, dass nur die Analyse des an der Leberoberfläche gelegenen

Gewebes möglich ist. Es ist nicht auszuschließen, dass diese Daten daher nicht für die gesamte Leber repräsentativ sind. Diese Methode erlaubt auch nicht die Visualisierung von hepatischen Arteriolen und portalen Venolen. Da die Hauptfragestellungen dieser Arbeit jedoch die Veränderungen der sinusoidalen Mikrozirkulation betreffen, und diese in dem vorgestellten Setup gut beurteilbar ist, ist dies hier von untergeordneter Bedeutung.

Wichtige Voraussetzung für die Intravitalmikroskopie ist die Verfügbarkeit einer planen Oberfläche, um klare und scharfe Bilder zu erzielen, ohne dabei Teile des Gewebes zu schädigen und damit die Perfusion zu stören (Uhlmann 1999). Um dies in der vorliegenden Arbeit zu gewährleisten erfolgte die abdominale Präparation der Versuchstiere unter größter Vorsicht. Berührungen des Lebergewebes wurden vermieden und die Leberoberfläche regelmäßig mit steriler NaCl-Lösung gespült. Bei der Auslagerung der Leber wurden mit NaCl getränkte Wattestäbchen verwendet, um das Lebergewebe zu schonen. Nach der Auslagerung wurde ein möglicher trockenheitsbedingter Gewebeschaden durch Befeuchtung und Abdeckung der Leber mit Folie weitestgehend verhindert (Clemens 1985; Vollmar 1994; Vollmar 1994; Bauer 1995). Zusätzlich wurde eine potentielle phototoxische Schädigung des unter dem Mikroskop beleuchteten Gewebes durch möglichst kurze Belichtungszeiten auf ein Minimum reduziert. Fluoreszenzfarbstoff und markierte Erythrozyten wurden in gewichtsadaptierter Dosis appliziert. Da alle Versuchstiere den gleichen standardisierten Abläufen ausgesetzt waren, kann eine gruppenspezifische Beeinflussung der Ergebnisse durch Präparation oder Untersuchungen nicht angenommen werden.

6.2.4 Messmethoden

Die intravitalmikroskopisch gewonnenen Aufnahmen wurden off-line verblindet analysiert. Wesentliche Voraussetzung für eine exakte Bestimmung der erhobenen Parameter ist eine scharfe und kontrastreiche Aufzeichnung der einzelnen, am Intravitalmikroskop durchgeführten Untersuchungen. Mit Ausnahme einiger weniger Tiere, die teilweise eine verstärkte atemabhängige Bewegung des Leberlappens und Extravasation von Erythrozyten zeigten und damit einhergehend durch eine verminderte Bildqualität auffielen, erfüllten die Aufzeichnungen alle notwendigen Anforderungen für eine exakte Bestimmung der zu untersuchenden Parameter. Dabei

erlaubte die Gabe des Fluoreszenzfarbstoffs Natrium-Fluorescein eine genauere Differenzierung zwischen dunklen Sinusoiden und hellen Hepatozyten (Uhlmann 1999).

Zur Bestimmung des mittleren sinusoidalen Durchmessers wurden die Querdurchmesser von mindestens 20 zufällig gewählten Sinusoiden pro Perizentralfeld gemessen und daraus der mittlere Durchmesser berechnet. Diese Messung erfolgte in 5 Perizentralfeldern je Versuchstier. Die Anzahl von mindestens 20 Sinusoiden je Perizentralfeld konnte in allen Versuchstieren erreicht werden und ließ somit die Berechnung eines repräsentativen Mittelwertes für den sinusoidalen Durchmesser zu.

Die Erythrozytengeschwindigkeit konnte nur in solchen Sinusoiden bestimmt werden, in welchen die Erythrozyten deutlich voneinander abgrenzbar waren und über den gesamten Verlauf des Sinusoids verfolgt werden konnten. Gemessen wurde die Erythrozytengeschwindigkeit in jeweils 5 Sinusoiden in 5 Perizentralfeldern je Versuchstier. Aus diesen Werten konnte eine repräsentative mittlere Erythrozytengeschwindigkeit errechnet werden.

Die Auswertung der NAD(P)H-Autofluoreszenz erfolgte bei gleichen Kontrast- und Helligkeitseinstellungen. Durch die Markierung der möglichst konstanten Anzahl an Perizentralfeldern pro Aufnahme durch den immer gleichen Untersucher konnte eine hohe Genauigkeit des Mittelwertes der Autofluoreszenz erreicht werden.

Zur Vermeidung eines interindividuellen Messfehlers erfolgte die Auswertung der einzelnen Parameter immer durch den gleichen Untersucher. Durch die hohe Anzahl an Tieren und die randomisierte Zuteilung der Tiere zu den Gruppen sollte darüber hinaus ein systematischer Fehler gering gehalten werden.

6.3 Diskussion der Ergebnisse

24 Stunden nach der Präkonditionierung mit Häminarginat zeigte die Western Blot Analyse eine Zunahme der HO-1-Proteinexpression im Lebergewebe. Die benutzte Dosierung von Häminarginat wurden in Übereinstimmung mit anderen Studien (Martasek 1991) und klinischen Anwendungen gewählt (Tokola 1986; Mustajoki 1986; Tenhunen 1987; Mustajoki 1993). Häminarginat ist ein bereits etabliertes Medikament zur Behandlung der akuten Porphyrie (Mustajoki 1986; Mustajoki 1993). Häminarginat induziert eine HO-1 Protein Expression (Tenhunen 1987). Jedoch, kann auch ein oxidativer Stress, verursacht z.B. durch einen hämorrhagischen Schock, selbst die HO-1 induzieren (Rensing 1999). Die HO-1-Proteinexpression beginnt 3 Stunden nach Schock und erreicht ihr Maximum nach weiteren 3 Stunden (Rensing 1999). Um eine Verfälschung der gewonnenen Ergebnisse durch „de novo“-Proteinsynthese aufgrund der direkten Schockwirkung zu verhindern, wurde in dieser Studie die Reperfusionphase auf zwei Stunden begrenzt. Dadurch sollte eine adäquate Reperfusion ohne eine „de novo“-HO-1 Proteinsynthese durch den hämorrhagischen Schock gewährleistet werden.

Der Grund für die selektive Expression von HO-1 nach Präkonditionierung mit HAR scheint das Molekül Häm als Basis dieser Lösung zu sein. HO-1, als Schlüsselenzym der Hämdegradation, wird durch das abzubauen Substrat am stärksten induziert. Durch die HO-1 wird der Abbau von Häm zu Eisen, Biliverdin und Kohlenmonoxid (CO) katalysiert (Tenhunen 1968; Docherty 1984; Kutty 1988).

Biliverdin wird durch die Bilirubinreduktase zu Bilirubin, einem antioxidativ wirkenden Molekül reduziert (Stocker 1987; Neuzil 1993; Neuzil 1994), wodurch eine weitere toxische Zelldestruktion nach Hämorrhagie und Reperfusion minimiert wird. Kohlenmonoxid (CO) besitzt neben seiner Potenz die Plättchenaggregation zu inhibieren (Brune 1987), auch eine vasodilatierende Wirkung (Furchgott 1991; Utz 1991; Verma 1993; Morita 1995). Entsprechend ist die HO-1 in der Lage durch die Generierung von Kohlenmonoxid eine Vasodilatation von Gefäßen zu induzieren (Levere 1990; Graser 1990; Johnson 1995; Zakhary 1996). CO zeigt einen vergleichbaren Wirkmechanismus wie Stickstoffmonoxid (NO), einem second messenger, der über die Regulierung des zellulären zyklischen Guanosin-Monophosphat (cGMP) den vaskulären Tonus beeinflussen kann (Ignarro 1987; Palmer 1987; Kubes 1992; Schmidt 1992; Suematsu 1996). CO aktiviert ebenso das

zelluläre cGMP (Ramos 1989; Schmidt 1992; Morita 1995; Christodoulides 1995; Kharitonov 1995). Die durch cGMP vermittelte Öffnung von Ionenkanälen (Schmidt 1992) führt zu einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumionenkonzentration, die eine Verkürzung der kontraktilen Elemente in der glatten Gefäßmuskulatur und somit eine Gefäßdilatation nach sich zieht. Diese gefäßerweiternde Eigenschaft wurde vielfach bestätigt (Levere 1990; Graser 1990; Johnson 1995; Zakhary 1996). Sie ist nicht nur in präkapillären Gefäßen, sondern auch in der Leber auf Höhe der Sinusoide beobachtet worden. Die Erweiterung der Sinusoide, die dem Aufbau und der Funktion von Kapillaren entsprechen, wird dabei von den Ito-Zellen vermittelt. Die Ito-Zellen wiederum entsprechen den Pericyten der Kapillaren (Suematsu 1993). Pericyten sind perivaskuläre Zellen, welche bereits Ende des 19. Jahrhunderts beschrieben wurden (Eberth 1871), und von ROUGET (1873, 1879) und ZIMMERMAN (1923) als solche benannt wurden. Diese Zellen umgeben die Endothelzellen der Kapillaren, wobei sie die Fortführung der glatten Muskelzellen der Arteriolen und Venolen darstellen. Aufgrund ihrer zahlreichen zytoplasmatischen Ausläufer stehen sie mit den umgebenden Zellverbänden in enger Beziehung (Hirschi 1996). Ein Pericyt ist damit in der Lage gleich mehrere umliegende Kapillaren zu beeinflussen (Weibel 1974; Williamson 1980; Mazanet 1982). Das Zytoplasma dieser Zellen beinhaltet muskelspezifische Actinfilamente (Herman 1985; Skalli 1989; Nehls 1991), welche auch cGMP empfindlich sind (Joyce 1984; Kelley 1988; Haefliger 1994). Dadurch werden diese Zellen in die Lage versetzt, den kapillären Querschnitt beeinflussen zu können (Hirschi 1996). In Anbetracht dieser Eigenschaften ist es durchaus vorstellbar, dass die Hämoxxygenase-1 über die Produktion von CO die Itozell- und Pericytengröße verändern kann. Das wiederum hätte eine Dilatation von Kapillaren und Sinusoiden mit nachfolgender Verbesserung des Blutflusses in den Organen zur Folge (Pannen 1998; Rensing 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurde besonderes Augenmerk auf die Häminarginat-vermittelte Modulation der Mikrozirkulation der Leber gelegt. Das nach H/R auftretende mikrovaskuläre Perfusionsversagen ist durch eine sinusoidale Perfusionsheterogenität gekennzeichnet, die zu einem Ungleichgewicht zwischen Sauerstoffangebot und Sauerstoffbedarf führt, was wiederum zu Organdysfunktion und Organversagen beiträgt (Clemens 1997). Vorangehende Studien konnten bereits positive Effekte von Häminarginat auf die Organfunktion mittels HO-1-Induktion

zeigen (Liu 2003; Kubulus 2005; Maeshima 2005). Dabei blieben die Mechanismen, die zu diesen positiven Effekten auf die Organfunktion führten jedoch unklar. Eine Beeinflussung der Mikrozirkulation durch HO-1-Induktion könnte jedoch eine entscheidende Rolle spielen.

Die Daten dieser Studie belegen die wichtige Rolle der Häminarginat-vermittelten HO-1-Induktion für das Aufrechterhalten der Integrität der Mikrozirkulation nach H/R. In dieser Studie verhinderte die Vorbehandlung mit Häminarginat eine schockinduzierte Störung der Lebermikrozirkulation im Gegensatz zu Vorbehandlung mit Vollelektrolytlösung, welche nach hämorrhagischem Schock eine ausgeprägte sinusoidale Konstriktion und Reduktion des nutritiven Blutflusses nach sich zog. Die positiven Effekte der Vorbehandlung mit Häminarginat führten zu sinusoidalen Parametern ähnlich denen der nicht geschockten Sham-Tiere. Häminarginat verhinderte eine Schock-induzierte Kontraktion der Sinusoide im Gegensatz zur Vorbehandlung mittels Vollelektrolytlösung (Vehikel). Dies führte in Kombination mit der erhöhten Flussgeschwindigkeit zu einem verbesserten volumetrischen Blutfluss. Diese Verbesserung ist als Folge der Häminarginat-vermittelten HO-1-Induktion anzusehen, da die Häminarginat-vermittelte Protektion nach Blockade der HO-Aktivität mittels des falschen Substrats SnMP-IX komplett verhindert wurde. Im Gegensatz dazu führt die Blockade von HO in den mit Vollelektrolytlösung vorbehandelten Tieren der Vehikel-Gruppe, die keine HO-1-Induktion aufwiesen, zu keiner Verbesserung der sinusoidalen Mikrozirkulation. Von entscheidender Bedeutung für die durch HAR vermittelte Protektion scheint die Freisetzung von CO nach HO-1-Induktion zu sein, da die SnMP-IX vermittelte Blockade der positiven Häminarginat-Effekte nach zusätzlicher Gabe des CO-Donors Dichlormethan wieder rückgängig gemacht wurde. Zusätzlich zur Wirkung des freigesetzten CO könnte die antioxidative Wirkung des vermehrt anfallenden Bilirubins einer Endothelschädigung, die wiederum zu einer Zellschwellung und damit Gefäßobliteration führen kann, entgegenwirken.

Die Präkonditionierung mit Häminarginat führte über die Verbesserung der Mikrozirkulation insgesamt zu einer verbesserten Sauerstoffversorgung des Gewebes, was sich in einer Reduktion der NAD(P)H-Autofluoreszenz als Ausdruck des mitochondrialen Redox-Potentials widerspiegelte.

Es gibt Hinweise, dass trotz einer Stabilisierung der Hämodynamik nach hämorrhagischem Schock, in den Organen des Splanchnikusgebiets, vor allem im Darm, eine Vasokonstriktion mit nachfolgender Minderdurchblutung persistiert (Fruchterman 1998; Zakaria 2005). Die zugrunde liegenden Mechanismen sind nicht vollständig geklärt. Möglicherweise könnte eine Störung der Endothelium-abhängigen Dilatationsreaktion und eine verminderte Freisetzung von NO vorliegen (Fruchterman 1998; Zakaria 2005). Als Konsequenz führt die Minderdurchblutung des Splanchnikusgebietes zu einer Reduzierung der hepatische Perfusion (Edouard 1994; Riddez 1997; Bracht 2005), welche die sinusoidale Erythrozyten-geschwindigkeit reduzieren könnte. Allerdings präsentierten in der gegenwärtigen Studie die mit Vollelektrolytlösung vorbehandelte Tiere (Vehikel) eine nahezu unbeeinflusste Flussgeschwindigkeit. Verantwortlich hierfür scheint die reduzierte Dichte an funktionellen Sinusoiden in diesen Gruppen zu sein. Hierdurch verringert sich insgesamt der Gefäßquerschnitt der Leber, so dass trotz erniedrigten Blutflusses eine konstante Flussgeschwindigkeit resultiert.

Im Gegensatz dazu scheint die Vorbehandlung mit Häminarginat zu einer Verbesserung der Durchblutung des Splanchnikusgebiets zu führen. Diese Tiere zeigten trotz unbeeinträchtigter funktioneller sinusoidaler Dichte eine signifikant erhöhte Erythrozytengeschwindigkeit in den Sinusoiden. Eine Ursache dafür könnte sein, dass die HO-1-Induktion durch Häminarginat nicht auf das Lebergewebe beschränkt ist, sondern in den meisten Geweben erfolgt (Liu 2003; Kubulus 2005; Maeshima 2005). Daher könnten die durch Häminarginat vermittelten protektiven Effekte auch zu einer verbesserten Perfusion des Splanchnikusgebiets führen (Attuwaybi 2004). Dies wiederum hätte einen erhöhten prähepatischen Blutfluss zur Folge und würde damit die beobachtete erhöhte Geschwindigkeit der Erythrozyten in den Sinusoiden erklären.

Die Häminarginat-vermittelte HO-1-Induktion führt neben der Verbesserung der Mikrozirkulation zu einem deutlichen Anstieg des IL-10-Spiegels und zu einem tendenziellen Abfall des TNF- α -Spiegels im Serum. Dies spricht für einen immunmodulatorischen Effekt der Präkonditionierung mit Häminarginat zugunsten einer anti-inflammatorischen Zytokinantwort.

Die Immunantwort auf H/R äußert sich vor allem in der Freisetzung von Zytokinen und Adhäsionsmolekülen. Die Höhe der Substanzlevel korreliert mit der Schwere des Traumas und ist eng mit der Entwicklung eines MODS nach hämorrhagischem

Schock verknüpft (Roumen 1993; Seekamp 1998; Schneider 2004). Ihnen könnte bei der MODS-Risikoeinschätzung eines traumatisierten Patienten sogar eine prognostische Funktion zukommen (Seekamp 1998).

In dieser Studie führte die Induktion der HO-1 durch Vorbehandlung mit Häminarginat zu einer veränderten Immunantwort mit Supprimierung des pro-inflammatorischen TNF- α und verstärkter Freisetzung des anti-inflammatorischen IL-10 nach hämorrhagischem Schock.

Dieser HAR-abhängige anti-inflammatorische Effekt scheint vorrangig durch die HO-1-Induktion und der damit einhergehenden CO-Freisetzung hervorgerufen zu sein, da diese Veränderungen nach Blockade der HO durch SnMP-IX verhindert und nach Gabe des CO-Donors DCM wieder vermittelt wurden.

Der anti-inflammatorische Effekt nach HAR-Vorbehandlung scheint auf einer Modulation von Transkriptionsfaktoren mittels HO-1 induzierter CO-Freisetzung zu beruhen. Insbesondere die Transkriptionsfaktoren Nukleärer Faktor- κ B (NF- κ B) und p38-Mitogen-aktivierte Proteinkinase (p38MAPK) sind hierbei von herausragender Bedeutung (Brouard 2002; Drechsler 2006; Sasaki 2006).

Dabei induziert CO über eine Phosphorylierung der p38MAPK eine anti-inflammatorische Wirkung (Drechsler 2006). Dagegen wird NF- κ B, ein Transkriptionsfaktor der hauptsächlich an der Regulation von TNF- α beteiligt ist (Drechsler 2006), durch die Induktion von HO-1 verringert (Sasaki 2006).

Die vorliegende Studie zeigt eine Prävention des schock-induzierten mikrovaskulären Perfusionsversagens durch Vorbehandlung mit Häminarginat. Obwohl HAR die hepatische Sauerstoffverfügbarkeit verbesserte, wurden die Serumkonzentrationen der Leberenzyme ALAT, ASAT und GLDH, als Marker einer hepatozellulären Schädigung, nicht verringert. Einerseits könnte als mögliche Ursache der verbesserte mikrovaskuläre Fluss nach Vorbehandlung mit Häminarginat zu einem effizienteren Auswaschen der Enzyme aus der Leber führen (Paxian 2001). Andererseits könnte der verbesserte mikrovaskuläre Fluss nach HAR-Vorbehandlung auch aufgrund des so genannten „Reflow-Paradoxons“ zu einer Verstärkung des Reperfusionsschaden führen (Horie 1998). Weiterhin weisen die Leberenzyme unterschiedliche zeitliche Maxima auf. Während GLDH nach 6 Stunden Reperfusion eine maximale Aktivität aufweist, ist diese für ASAT und ALAT erst nach 18 Stunden am höchsten. Jedoch wurden in der gegenwärtigen Studie die Leberenzyme nach 2 Stunden Reperfusion

beurteilt. Zusätzlich können die durch HO-1 erzeugten Produkte selbst toxisch wirken (Bauer 2002). Hierzu gehören die toxischen Effekte der Gallepigmente Biliverdin bzw. Bilirubin, der freien Eisen-Ione sowie des Kohlenmonoxids. Biliverdin bzw. Bilirubin können einerseits zu einer neuronalen Störung durch Ablagerung in den Basalganglien führen (Schenker 1966), andererseits weisen sie durch Zerstörung der Doppellipidmembranen von Zellen eine generelle zelltoxische Wirkung auf (Wennberg 1991). Eisen-Ione katalysieren über die Haber-Weiss- oder Fenton-Reaktion die Entstehung von Sauerstoffradikalen, vor allem des am stärksten toxisch wirkenden Hydroxyl-Radikals OH^\cdot (Halliwell 1978). Durch eine verstärkte Eisen-Ionen Produktion kann dadurch die antioxidative Potenz von Bilirubin limitiert (Bauer 2002) sowie eine Zelldestruktion beschleunigt werden (Suttner 1999).

HO-1 weist somit sowohl pro- als auch antioxidative Eigenschaften (Ryter 2000) auf. Welche dabei bei der Induktion primär wirken, hängt scheinbar von der Größe des Aktivitätsanstieges ab. So soll eine moderate Proteinexpression von HO-1 eher zum Überwiegen der protektiven, dagegen eine starke, überproportionale eher der destruktiven Eigenschaften führen, wobei aufgrund der komplexen Interaktionen auch Überschneidungen möglich sind (Bauer 2002).

6.4 Schlussfolgerung

Die Ergebnisse dieser Studie demonstrieren, dass die Vorbehandlung mit Häminarginat die Mikrozirkulation über eine HO-1-vermittelte Zunahme des sinusoidalen Durchmessers und der Erythrozytengeschwindigkeit nach Hämorrhagie und Reperfusion deutlich verbessert und damit zu einer verbesserten hepatozellulären Sauerstoffverfügbarkeit führt. Zusätzlich zum positiven Effekt auf die Mikrozirkulation führte in dieser Studie die Vorbehandlung mit Häminarginat zu einem anti-inflammatorischen Effekt nach hämorrhagischem Schock. Vorwiegend verantwortlich für diese Effekte scheint die vermehrte CO-Freisetzung durch Induktion der HO-1 zu sein.

Die Ergebnisse dieser Studie könnten die Resultate vorhergehender Studien, in denen die HAR-vermittelte HO-1-Induktion zu einer verbesserten Organvitalität und reduzierter Mortalität nach Schock führte, (Liu 2003; Kubulus 2005; Maeshima 2005) erklären.

Im Hinblick auf die klinische Anwendung von Präkonditionierungsmethoden könnten die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse hilfreich sein. Unter Umständen könnte der Einsatz von Häminarginat als medikamentöse Präkonditionierung mit nachfolgender perioperativ erhöhter Ischämietoleranz zum Einsatz kommen, um die Gefahr eines schockinduzierten Leberversagens nach intraoperativer Hämorrhagie zu vermindern.

7. Literaturverzeichnis

1. Adams HA, Baumann G, Gansslen A, Janssens U, Knoefel W, Koch T, Marx G, Muller-Werdan U, Pape HC, Prange W, Roesner D, Standl T, Teske W, Werner G, Zander R (2001) [Definition of shock types]. *Anesthesiol.Intensivmed.Notfallmed.Schmerzther.* S140-S143
2. Almond NE, Wheatley AM (1992) Measurement of hepatic perfusion in rats by laser Doppler flowmetry. *Am.J.Physiol* 2 Pt 1: G203-G209
3. Applegate LA, Luscher P, Tyrrell RM (1991) Induction of heme oxygenase: a general response to oxidant stress in cultured mammalian cells. *Cancer Res.* 3: 974-978
4. Arvidsson D, Svensson H, Haglund U (1988) Laser-Doppler flowmetry for estimating liver blood flow. *Am.J.Physiol* 4 Pt 1: G471-G476
5. Attuwaybi BO, Kozar RA, Moore-Olufemi SD, Sato N, Hassoun HT, Weisbrodt NW, Moore FA (2004) Heme oxygenase-1 induction by hemin protects against gut ischemia/reperfusion injury. *J.Surg.Res.* 1: 53-57
6. Ba ZF, Shimizu T, Szalay L, Bland KI, Chaudry IH (2005) Gender differences in small intestinal perfusion following trauma hemorrhage: the role of endothelin-1. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol* 5: G860-G865
7. Bahrami S, Yao YM, Leichtfried G, Redl H, Marzi I, Schlag G (1997) Significance of TNF in hemorrhage-related hemodynamic alterations, organ injury, and mortality in rats. *Am.J.Physiol* 5 Pt 2: H2219-H2226
8. Baue AE, Durham R, Faist E (1998) Systemic inflammatory response syndrome (SIRS), multiple organ dysfunction syndrome (MODS), multiple organ failure (MOF): are we winning the battle? *Shock* 2: 79-89
9. Bauer C, Marzi I, Bauer M, Fellger H, Larsen R (1995) Interleukin-1 receptor antagonist attenuates leukocyte-endothelial interactions in the liver after hemorrhagic shock in the rat. *Crit.Care Med.* 6: 1099-1105

10. Bauer I, Rensing H, Florax A, Ulrich C, Pistorius G, Redl H, Bauer M (2003) Expression pattern and regulation of heme oxygenase-1/heat shock protein 32 in human liver cells. *Shock* 2003.Aug.;20.(2.):116.-22. 2: 116-122
11. Bauer I, Wanner GA, Rensing H, Alte C, Miescher EA, Wolf B, Pannen BH, Clemens MG, Bauer M (1998) Expression pattern of heme oxygenase isoenzymes 1 and 2 in normal and stress-exposed rat liver. *Hepatology* 3: 829-838
12. Bauer M, Bauer I (2002) Heme oxygenase-1: redox regulation and role in the hepatic response to oxidative stress. *Antioxid.Redox.Signal.* 5: 749-758
13. Bickell WH, Wall-MJ J, Pepe PE, Martin RR, Ginger VF, Allen MK, Mattox KL (1994) Immediate versus delayed fluid resuscitation for hypotensive patients with penetrating torso injuries [see comments]. *N.Engl.J.Med.* 17: 1105-1109
14. Bone RC, Sibbald WJ, Sprung CL (1992) The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure. *Chest* 6: 1481-1483
15. Bonkovsky HL, Lincoln B, Healey JF, Ou LC, Sinclair PR, Muller-Eberhard U (1986) Hepatic heme and drug metabolism in rats with chronic mountain sickness. *Am.J.Physiol* 4 Pt 1: G467-G474
16. Bouwens L, De BP, Vanderkerken K, Geerts B, Wisse E (1992) Liver cell heterogeneity: functions of non-parenchymal cells. *Enzyme* 1-3: 155-168
17. Bracht H, Takala J, Tenhunen JJ, Brander L, Knuesel R, Merasto-Minkkinen M, Jakob SM (2005) Hepatosplanchnic blood flow control and oxygen extraction are modified by the underlying mechanism of impaired perfusion. *Crit Care Med.* 3: 645-653
18. Braet F, Wisse E (2002) Structural and functional aspects of liver sinusoidal endothelial cell fenestrae: a review. *Comp Hepatol.* 1(1): 1
19. Brouard S, Berberat PO, Tobiasch E, Seldon MP, Bach FH, Soares MP (2002) Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide requires the activation of transcription factor NF-kappa B to protect endothelial cells from tumor necrosis factor-alpha-mediated apoptosis. *J.Biol.Chem.* 20: 17950-17961

20. Brune B, Ullrich V (1987) Inhibition of platelet aggregation by carbon monoxide is mediated by activation of guanylate cyclase. *Mol.Pharmacol.* 4: 497-504
21. Carrico CJ, Holcomb JB, Chaudry IH (2002) Scientific Priorities and Strategic Planning for Resuscitation Research and Life Saving Therapy Following Traumatic Injury: Report of the PULSE Trauma Work Group. *Shock* 3: 165-168
22. Choi AM, Alam J (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.* 1: 9-19
23. Christodoulides N, Durante W, Kroll MH, Schafer AI (1995) Vascular smooth muscle cell heme oxygenases generate guanylyl cyclase-stimulatory carbon monoxide. *Circulation* 9: 2306-2309
24. Chun K, Zhang J, Biewer J, Ferguson D, Clemens MG (1994) Microcirculatory failure determines lethal hepatocyte injury in ischemic/reperfused rat livers. *Shock* 1: 3-9
25. Clemens MG, Bauer M, Pannen BH, Bauer I, Zhang JX (1997) Remodeling of hepatic microvascular responsiveness after ischemia/reperfusion. *Shock* 2: 80-85
26. Clemens MG, McDonagh PF, Chaudry IH, Baue AE (1985) Hepatic microcirculatory failure after ischemia and reperfusion: improvement with ATP-MgCl₂ treatment. *Am.J.Physiol* 6 Pt 2: H804-H811
27. Deitch EA (1992) Multiple organ failure. Pathophysiology and potential future therapy. *Ann.Surg.* 2: 117-134
28. Docherty JC, Firneisz GD, Schacter BA (1984) Methene bridge carbon atom elimination in oxidative heme degradation catalyzed by heme oxygenase and NADPH-cytochrome P-450 reductase. *Arch.Biochem.Biophys.* 2: 657-664
29. Drechsler Y, Dolganiuc A, Norkina O, Romics L, Li W, Kodys K, Bach FH, Mandrekar P, Szabo G (2006) Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effects of acute alcohol on IL-10 induction involving p38 MAPK activation in monocytes. *J.Immunol.* 4: 2592-2600

30. Durham RM, Moran JJ, Mazuski JE, Shapiro MJ, Baue AE, Flint LM (2003) Multiple organ failure in trauma patients. *J.Trauma* 4: 608-616
31. Edouard AR, Degremont AC, Duranteau J, Pussard E, Berdeaux A, Samii K (1994) Heterogeneous regional vascular responses to simulated transient hypovolemia in man. *Intensive Care Med.* 6: 414-420
32. Eberth CJ: *Handbuch der Lehre von den Geweben des Menschen und der Tiere.* Leipzig, 1871
33. Enomoto K, Nishikawa Y, Omori Y, Tokairin T, Yoshida M, Ohi N, Nishimura T, Yamamoto Y, Li Q (2004) Cell biology and pathology of liver sinusoidal endothelial cells. *Med.Electron Microsc.* 4: 208-215
34. Ertel W, Friedl HP, Trentz O (1994) Multiple organ dysfunction syndrome (MODS) following multiple trauma: rationale and concept of therapeutic approach. *Eur.J.Pediatr.Surg.* 4: 243-248
35. Ertel W, Trentz O (1994) [Polytrauma and multi-organ failure syndrome. Definition--pathophysiology--therapy]. *Zentralbl.Chir* 3: 159-167
36. Fruchterman TM, Spain DA, Matheson PJ, Martin AW, Wilson MA, Harris PD, Garrison RN (1998) Small intestinal production of nitric oxide is decreased following resuscitated hemorrhage. *J.Surg.Res.* 1: 102-109
37. Fruchterman TM, Spain DA, Wilson MA, Harris PD, Garrison RN (1998) Selective microvascular endothelial cell dysfunction in the small intestine following resuscitated hemorrhagic shock. *Shock* 6: 417-422
38. Furchgott RF, Jothianandan D (1991) Endothelium-dependent and -independent vasodilation involving cyclic GMP: relaxation induced by nitric oxide, carbon monoxide and light. *Blood Vessels* 1-3: 52-61
39. Garrison RN, Spain DA, Wilson MA, Keelen PA, Harris PD (1998) Microvascular changes explain the "two-hit" theory of multiple organ failure. *Ann.Surg.* 6: 851-860
40. Goda N, Suzuki K, Naito M, Takeoka S, Tsuchida E, Ishimura Y, Tamatani T, Suematsu M (1998) Distribution of heme oxygenase isoforms in rat liver.

- Topographic basis for carbon monoxide-mediated microvascular relaxation. *J.Clin.Invest.* 3: 604-612
41. Graser T, Vedernikov YP, Li DS (1990) Study on the mechanism of carbon monoxide induced endothelium-independent relaxation in porcine coronary artery and vein. *Biomed.Biochim.Acta* 4: 293-296
 42. Gutierrez G, Brown SD (1993) Response of the macrocirculation. In *Pathophysiology of Shock, Sepsis and Organ Failure*. Edited by: Schlag G, Redl H. New York: Springer-Verlag; 215-229.
 43. Haefliger IO, Zschauer A, Anderson DR (1994) Relaxation of retinal pericyte contractile tone through the nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 3: 991-997
 44. Halliwell B (1978) Biochemical mechanisms accounting for the toxic action of oxygen on living organisms: the key role of superoxide dismutase. *Cell Biol.Int.Rep.* 2: 113-128
 45. 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.* 2: 321-326
 46. Harris BH, Gelfand JA (1995) The immune response to trauma. *Semin.Pediatr.Surg.* 2: 77-82
 47. Hayashi S, Omata Y, Sakamoto H, Higashimoto Y, Hara T, Sagara Y, Noguchi M (2004) Characterization of rat heme oxygenase-3 gene. Implication of processed pseudogenes derived from heme oxygenase-2 gene. *Gene* 2: 241-250
 48. Heckbert SR, Vedder NB, Hoffman W, Winn RK, Hudson LD, Jurkovich GJ, Copass MK, Harlan JM, Rice CL, Maier RV (1998) Outcome after hemorrhagic shock in trauma patients. *J.Trauma* 3: 545-549
 49. Herman IM, D'Amore PA (1985) Microvascular pericytes contain muscle and nonmuscle actins. *J.Cell Biol.* 1: 43-52

50. Herrick A, McColl KE, McLellan A, Moore MR, Brodie MJ, Goldberg A (1987) Effect of haem arginate therapy on porphyrin metabolism and mixed function oxygenase activity in acute hepatic porphyria. *Lancet* 8569: 1178-1179
51. Hildebrand F, Pape HC, Krettek C (2005) [The importance of cytokines in the posttraumatic inflammatory reaction]. *Unfallchirurg* 10: 793-803
52. Hirano K, Kobayashi T, Watanabe T, Yamamoto T, Hasegawa G, Hatakeyama K, Suematsu M, Naito M (2001) Role of heme oxygenase-1 and Kupffer cells in the production of bilirubin in the rat liver. *Arch.Histol.Cytol.* 2: 169-178
53. Hirschi KK, D'Amore PA (1996) Pericytes in the microvasculature. *Cardiovasc.Res.* 4: 687-698
54. Horie Y, Wolf R, Flores SC, McCord JM, Epstein CJ, Granger DN (1998) Transgenic mice with increased copper/zinc-superoxide dismutase activity are resistant to hepatic leukostasis and capillary no-reflow after gut ischemia/reperfusion. *Circ.Res.* 7: 691-696
55. Ignarro LJ, Byrns RE, Buga GM, Wood KS (1987) Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circ.Res.* 6: 866-879
56. Jarrar D, Chaudry IH, Wang P (1999) Organ dysfunction following hemorrhage and sepsis: mechanisms and therapeutic approaches (Review). *Int.J.Mol.Med.* 6: 575-583
57. Jarrar D, Wang P, Cioffi WG, Bland KI, Chaudry IH (2000) The female reproductive cycle is an important variable in the response to trauma-hemorrhage. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 3: H1015-H1021
58. Jarrar D, Wang P, Knoferl MW, Kuebler JF, Cioffi WG, Bland KI, Chaudry IH (2000) Insight into the mechanism by which estradiol improves organ functions after trauma-hemorrhage. *Surgery* 2: 246-252
59. Jarrar D, Wang P, Song GY, Cioffi WG, Bland KI, Chaudry IH (2000) Inhibition of tyrosine kinase signaling after trauma-hemorrhage: a novel approach for

- improving organ function and decreasing susceptibility to subsequent sepsis. *Ann.Surg.* 3: 399-407
60. Johnson RA, Lavesa M, Askari B, Abraham NG, Nasjletti A (1995) A heme oxygenase product, presumably carbon monoxide, mediates a vasodepressor function in rats. *Hypertension* 2: 166-169
61. Joyce NC, DeCamilli P, Boyles J (1984) Pericytes, like vascular smooth muscle cells, are immunocytochemically positive for cyclic GMP-dependent protein kinase. *Microvasc.Res.* 2: 206-219
62. Kastenbaum MA, Hoel DG, Bowman KO (1970) Sample size requirements: one-way analysis of variance. *Biometrika* 57(2): 421-430
63. Kawada N, Tran-Thi TA, Klein H, Decker K (1993) The contraction of hepatic stellate (Ito) cells stimulated with vasoactive substances. Possible involvement of endothelin 1 and nitric oxide in the regulation of the sinusoidal tonus. *Eur.J.Biochem.* 2: 815-823
64. Keel M, Trentz O (2005) Pathophysiology of polytrauma. *Injury* 6: 691-709
65. Kelley C, D'Amore P, Hechtman HB, Shepro D (1988) Vasoactive hormones and cAMP affect pericyte contraction and stress fibres in vitro. *J.Muscle Res.Cell Motil.* 2: 184-194
66. Khadaroo RG, Fan J, Powers KA, Fann B, Kapus A, Rotstein OD (2004) Impaired induction of IL-10 expression in the lung following hemorrhagic shock. *Shock* 4: 333-339
67. Kharitonov VG, Sharma VS, Pilz RB, Magde D, Koesling D (1995) Basis of guanylate cyclase activation by carbon monoxide. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 7: 2568-2571
68. Kmiec Z (2001) Cooperation of liver cells in health and disease. *Adv.Anat.Embryol.Cell Biol.* 161: III-XIII, 1-151
69. Kobayashi T, Hirano K, Yamamoto T, Hasegawa G, Hatakeyama K, Suematsu M, Naito M (2002) The protective role of Kupffer cells in the ischemia-reperfused rat liver. *Arch.Histol.Cytol.* 3: 251-261

70. Kobelt F, Schreck U, Henrich HA (1994) Involvement of liver in the decompensation of hemorrhagic shock. *Shock* 4: 281-288
71. Koo A, Liang IY (1977) Blood flow in hepatic sinusoids in experimental hemorrhagic shock in the rat. *Microvasc.Res.* 3: 315-325
72. Krejci V, Hildebrand L, Banic A, Erni D, Wheatley AM, Sigurdsson GH (2000) Continuous measurements of microcirculatory blood flow in gastrointestinal organs during acute haemorrhage. *Br.J.Anaesth.* 4: 468-475
73. Kubes P, Granger DN (1992) Nitric oxide modulates microvascular permeability. *Am.J.Physiol* 2 Pt 2: H611-H615
74. Kubulus D, Rensing H, Paxian M, Thierbach JT, Meisel T, Redl H, Bauer M, Bauer I (2005) Influence of heme-based solutions on stress protein expression and organ failure after hemorrhagic shock. *Crit Care Med.* 3: 629-637
75. Kuebler JF, Toth B, Rue LW, III, Wang P, Bland KI, Chaudry IH (2003) Differential fluid regulation during and after soft tissue trauma and hemorrhagic shock in males and proestrus females. *Shock* 2: 144-148
76. Kutty RK, Daniel RF, Ryan DE, Levin W, Maines MD (1988) Rat liver cytochrome P-450b, P-420b, and P-420c are degraded to biliverdin by heme oxygenase. *Arch.Biochem.Biophys.* 2: 638-644
77. Kutty RK, Maines MD (1981) Purification and characterization of biliverdin reductase from rat liver. *J.Biol.Chem.* 8: 3956-3962
78. Larsen R (1995) *Anästhesie*, Verlag U&S: 5.Auflage
79. Levere RD, Martasek P, Escalante B, Schwartzman ML, Abraham NG (1990) Effect of heme arginate administration on blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *J.Clin.Invest* 1: 213-219
80. Levine JH, Durham RM, Moran J, Baue A (1996) Multiple organ failure: is it disappearing? *World J.Surg.* 4: 471-473

81. Liu X, Yang C, He X (2003) Expression of HO-1 in chronic renal insufficiency. Rat kidney and implication. *J.Huazhong.Univ Sci.Technolog.Med.Sci.* 3: 271-274
82. Liu X, Yang C, He X (2003) Expression of HO-1 in chronic renal insufficiency. Rat kidney and implication. *J.Huazhong.Univ Sci.Technolog.Med.Sci.* 3: 271-274
83. Lomas-Niera JL, Perl M, Chung CS, Ayala A (2005) Shock and hemorrhage: an overview of animal models. *Shock* 24 Suppl 1:33-9
84. Maeshima K, Takahashi T, Uehara K, Shimizu H, Omori E, Yokoyama M, Tani T, Akagi R, Morita K (2005) Prevention of hemorrhagic shock-induced lung injury by heme arginate treatment in rats. *Biochem.Pharmacol.* 11: 1667-1680
85. Maines MD (1988) Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *FASEB J.* 10: 2557-2568
86. Maines MD, Mayer RD, Ewing JF, McCoubrey WK, Jr. (1993) Induction of kidney heme oxygenase-1 (HSP32) mRNA and protein by ischemia/reperfusion: possible role of heme as both promotor of tissue damage and regulator of HSP32. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 1: 457-462
87. Malarkey DE, Johnson K, Ryan L, Boorman G, Maronpot RR (2005) New insights into functional aspects of liver morphology. *Toxicol.Pathol.* 1: 27-34
88. Martasek P, Schwartzman ML, Goodman AI, Solangi KB, Levere RD, Abraham NG (1991) Hemin and L-arginine regulation of blood pressure in spontaneous hypertensive rats. *J.Am.Soc.Nephrol.* 6: 1078-1084
89. Marzi I (1994) Bedeutung der Leber für den Verlauf des SIRS nach Schock, Trauma und bei Sepsis. [The significance of the liver for the course of SIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrome) following shock, trauma and during sepsis]. *Anesthesiol.Intensivmed.Notfallmed.Schmerzther.* 1: 41-46
90. Mazanet R, Franzini-Armstrong C (1982) Scanning electron microscopy of pericytes in rat red muscle. *Microvasc.Res.* 3: 361-369

91. McCuskey RS (1986) Microscopic studies for studying the microvasculature of internal organs, in *Physical Techniques in Biology and Medicine Microvascular Technology* (Eds. Baker CH, Nastuk WL). Academic Press, New York, pp 247-64
92. Menger MD, Lehr HA (1993) Scope and perspectives of intravital microscopy--bridge over from in vitro to in vivo. *Immunol.Today* 11: 519-522
93. Menger MD, Marzi I, Messmer K (1991) In vivo fluorescence microscopy for quantitative analysis of the hepatic microcirculation in hamsters and rats. *Eur.Surg.Res.* 3-4: 158-169
94. Metzger HP, Schywalsky M (1992) Intraorgan differences of blood flow, oxygen supply and glycogen content in the multilobular liver of normal and hemorrhagic rats. *Int.J.Microcirc.Clin.Exp.* 1: 67-83
95. Mizushima Y, Wang P, Jarrar D, Cioffi WG, Bland KI, Chaudry IH (2000) cardiovascular and hepatocellular functions in male animals. *Ann.Surg.* 5: 673-679
96. Moncada S, Higgs A (1993) The L-arginine-nitric oxide pathway. *N.Engl.J.Med.* 27: 2002-2012
97. Morita T, Kourembanas S (1995) Endothelial cell expression of vasoconstrictors and growth factors is regulated by smooth muscle cell-derived carbon monoxide. *J.Clin.Invest.* 6: 2676-2682
98. Morita T, Perrella MA, Lee ME, Kourembanas S (1995) Smooth muscle cell-derived carbon monoxide is a regulator of vascular cGMP. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 5: 1475-1479
99. Mustajoki P, Nordmann Y (1993) Early administration of heme arginate for acute porphyric attacks. *Arch.Intern.Med.* 17: 2004-2008
100. Mustajoki P, Tenhunen R, Tokola O, Gothoni G (1986) Haem arginate in the treatment of acute hepatic porphyrias. *Br.Med.J.(Clin.Res.Ed)* 6546: 538-539
101. Naito M, Hasegawa G, Ebe Y, Yamamoto T (2004) Differentiation and function of Kupffer cells. *Med.Electron Microsc.* 1: 16-28

102. Naito Y, Takagi T, Yoshikawa T (2004) Heme oxygenase-1: a new therapeutic target for inflammatory bowel disease. *Aliment.Pharmacol.Ther.* 20 Suppl 1:177-84
103. Nehls V, Drenckhahn D (1991) Heterogeneity of microvascular pericytes for smooth muscle type alpha-actin. *J.Cell Biol.* 1: 147-154
104. Neuzil J, Stocker R (1994) Free and albumin-bound bilirubin are efficient co-antioxidants for alpha-tocopherol, inhibiting plasma and low density lipoprotein lipid peroxidation. *J.Biol.Chem.* 24: 16712-16719
105. Neuzil J, Stocker R (1993) Bilirubin attenuates radical-mediated damage to serum albumin. *FEBS Lett.* 3: 281-284
106. Nunes G, Blaisdell FW, Margaretten W (1970) Mechanism of hepatic dysfunction following shock and trauma. *Arch.Surg.* 5: 546-556
107. Nuytinck HK, Offermans XJ, Kubat K, Goris JA (1988) Whole-body inflammation in trauma patients. An autopsy study. *Arch.Surg.* 12: 1519-1524
108. Oda M, Yokomori H, Han JY (2003) Regulatory mechanisms of hepatic microcirculation. *Clin.Hemorheol.Microcirc.* 3-4: 167-182
109. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 6122: 524-526
110. Pannen BH, Bauer M (1998) Differential regulation of hepatic arterial and portal venous vascular resistance by nitric oxide and carbon monoxide in rats. *Life Sci.* 22: 2025-2033
111. Pannen BH, Bauer M, Noldge-Schomburg GF, Zhang JX, Robotham JL, Clemens MG, Geiger KK (1997) Regulation of hepatic blood flow during resuscitation from hemorrhagic shock: role of NO and endothelins. *Am.J.Physiol.* 6 Pt 2: H2736-H2745
112. Pannen BH, Kohler N, Hole B, Bauer M, Clemens MG, Geiger KK (1998) Protective role of endogenous carbon monoxide in hepatic microcirculatory dysfunction after hemorrhagic shock in rats. *J.Clin.Invest.* 6: 1220-1228

113. Paxian M, Rensing H, Bauer I, Bauer M (2001) Molecular mechanisms of hepatocellular injury after hemorrhagic shock (abstract). *Shock*, 15 (Suppl 1): 17
114. Ramos KS, Lin H, McGrath JJ (1989) Modulation of cyclic guanosine monophosphate levels in cultured aortic smooth muscle cells by carbon monoxide. *Biochem.Pharmacol.* 8: 1368-1370
115. Rensing H, Bauer I, Datene V, Patau C, Pannen BH, Bauer M (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.* 12: 2766-2775
116. Rensing H, Bauer I, Peters I, Wein T, Silomon M, Jaeschke H, Bauer M (1999) Role of reactive oxygen species for hepatocellular injury and heme oxygenase-1 gene expression after hemorrhage and resuscitation. *Shock* 4: 300-308
117. Rensing H, Bauer I, Zhang JX, Paxian M, Pannen BH, Yokoyama Y, Clemens MG, Bauer M (2002) Endothelin-1 and heme oxygenase-1 as modulators of sinusoidal tone in the stress-exposed rat liver. *Hepatology* 6: 1453-1465
118. Rensing H, Bauer M (2001) [Multiple organ failure. Mechanisms, clinical manifestations and treatment strategies]. *Anaesthesist* 2001 Nov. 50 (11):819-41
119. Riddez L, Hahn RG, Brismar B, Strandberg A, Svensen C, Hedenstierna G (1997) Central and regional hemodynamics during acute hypovolemia and volume substitution in volunteers. *Crit Care Med.* 4: 635-640
120. Rouget C (1873) Memoire sur le developpement, la structure et les proprietes physiologiques des capillaires sanguines et lymphatiques. *Arch Physiol Normale Pathol*, 5: 603-661
121. Rouget C (1879) Sur la contractilité des capillaires sanguines. *CR Acad Sci*, 88:916-918
122. Roumen RM, Hendriks T, van d, V, Nieuwenhuijzen GA, Sauerwein RW, van der Meer JW, Goris RJ (1993) Cytokine patterns in patients after major vascular surgery, hemorrhagic shock, and severe blunt trauma. Relation with subsequent

- adult respiratory distress syndrome and multiple organ failure. *Ann.Surg.* 6: 769-776
123. Ryter SW, Tyrrell RM (2000) The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties. *Free Radic.Biol.Med.* 2: 289-309
124. Sasaki T, Takahashi T, Maeshima K, Shimizu H, Toda Y, Morimatsu H, Takeuchi M, Yokoyama M, Akagi R, Morita K (2006) Heme arginate pretreatment attenuates pulmonary NF-kappaB and AP-1 activation induced by hemorrhagic shock via heme oxygenase-1 induction. *Med.Chem.* 3: 271-274
125. Sato M, Suzuki S, Senoo H (2003) Hepatic stellate cells: unique characteristics in cell biology and phenotype. *Cell Struct.Funct.* 2: 105-112
126. Schenker S, McCandless DW, Zollman PE (1966) Studies of cellular toxicity of unconjugated bilirubin in kernicteric brain. *J.Clin.Invest* 7: 1213-1220
127. Schmid-Schonbein GW, Usami S, Skalak R, Chien S (1980) The interaction of leukocytes and erythrocytes in capillary and postcapillary vessels. *Microvasc.Res.* 1: 45-70
128. Schmidt HH (1992) NO., CO and .OH. Endogenous soluble guanylyl cyclase-activating factors. *FEBS Lett.* 1: 102-107
129. Schneider CP, Schwacha MG, Chaudry IH (2004) The role of interleukin-10 in the regulation of the systemic inflammatory response following trauma-hemorrhage. *Biochim.Biophys.Acta* 1: 22-32
130. Seekamp A, Jochum M, Ziegler M, van GM, Martin M, Regel G (1998) Cytokines and adhesion molecules in elective and accidental trauma-related ischemia/reperfusion. *J.Trauma* 5: 874-882
131. Shibahara S, Yoshida T, Kikuchi G (1978) Induction of heme oxygenase by hemin in cultured pig alveolar macrophages. *Arch.Biochem.Biophys.* 2: 243-250
132. Skalli O, Pelte MF, Pecllet MC, Gabbiani G, Gugliotta P, Bussolati G, Ravazzola M, Orci L (1989) Alpha-smooth muscle actin, a differentiation marker of smooth

- muscle cells, is present in microfilamentous bundles of pericytes. *J.Histochem.Cytochem.* 3: 315-321
133. Smedsrod B (2004) Clearance function of scavenger endothelial cells. *Comp Hepatol.* 3 Suppl 1: S22
134. Sonin NV, Garcia-Pagan JC, Nakanishi K, Zhang JX, Clemens MG (1999) Patterns of vasoregulatory gene expression in the liver response to ischemia/reperfusion and endotoxemia. *Shock* 3: 175-179
135. Spiegel HU, Hauss J, Schonleben K, Bunte H (1987) Theory and methods of local tissue-pO₂ monitoring in experimental angiology. *Angiology* 1 Pt 1: 1-12
136. Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN (1987) Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* 4792: 1043-1046
137. Suematsu M, Goda N, Sano T, Kashiwagi S, Egawa T, Shinoda Y, Ishimura Y (1995) Carbon monoxide: an endogenous modulator of sinusoidal tone in the perfused rat liver. *J.Clin.Invest* 5: 2431-2437
138. Suematsu M, Oda M, Suzuki H, Kaneko H, Watanabe N, Furusho T, Masushige S, Tsuchiya M (1993) Intravital and electron microscopic observation of Ito cells in rat hepatic microcirculation. *Microvasc.Res.* 1: 28-42
139. Suematsu M, Wakabayashi Y, Ishimura Y (1996) Gaseous monoxides: a new class of microvascular regulator in the liver. *Cardiovasc.Res* 4: 679-686
140. Suttner DM, Dennerly PA (1999) Reversal of HO-1 related cytoprotection with increased expression is due to reactive iron. *FASEB J.* 13: 1800-1809
141. Takei Y, Marzi I, Gao WS, Gores GJ, Lemasters JJ, Thurman RG (1991) Leukocyte adhesion and cell death following orthotopic liver transplantation in the rat. *Transplantation* 5: 959-965
142. Tenhunen R, Marver HS, Schmid R (1968) The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2: 748-755

143. Tenhunen R, Tokola O, Linden IB (1987) Haem arginate: a new stable haem compound. *J.Pharm.Pharmacol.* 10: 780-786
144. Tokola O, Tenhunen R, Volin L, Mustajoki P (1986) Pharmacokinetics of intravenously administered haem arginate. *Br.J.Clin.Pharmacol.* 3: 331-335
145. Uhlmann S, Uhlmann D, Spiegel HU (1999) Evaluation of hepatic microcirculation by in vivo microscopy. *J.Invest Surg.* 4: 179-193
146. Ulvik A, Kvale R, Wentzel-Larsen T, Flaatten H (2007) Multiple organ failure after trauma affects even long-term survival and functional status. *Crit Care* 11(5): R95
147. Utz J, Ullrich V (1991) Carbon monoxide relaxes ileal smooth muscle through activation of guanylate cyclase. *Biochem.Pharmacol.* 8: 1195-1201
148. Verma A, Hirsch DJ, Glatt CE, Ronnett GV, Snyder SH (1993) Carbon monoxide: a putative neural messenger. *Science* 5093: 381-384
149. Vollmar B (1995) [Microcirculation and oxygen supply to the liver in hemorrhagic shock and sepsis]. *Anesthesiol.Intensivmed.Notfallmed.Schmerzther.* 30 Suppl 1: S52-S54
150. Vollmar B, Corleta O, Habazettl H, Kreimeier U, Menger MD (1992) [Delay phenomenon of the jejunum. Studies of nutritional blood supply and oxygen supply of the jejunum of the rabbit]. *Zentralbl.Chir* 9: 495-501
151. Vollmar B, Lang G, Menger MD, Messmer K (1994) Hypertonic hydroxyethyl starch restores hepatic microvascular perfusion in hemorrhagic shock. *Am.J.Physiol.* 5 Pt 2: H1927-H1934
152. Vollmar B, Lang G, Post S, Menger MD, Messmer K (1993) [Microcirculation of the liver in hemorrhagic shock in the rat and its significance for energy metabolism and function]. *Zentralbl.Chir* 4: 218-225
153. Vollmar B, Menger MD, Glasz J, Leiderer R, Messmer K (1994) Impact of leukocyte-endothelial cell interaction in hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am.J.Physiol* 5 Pt 1: G786-G793

154. Wake K (2004) Karl Wilhelm Kupffer And His Contributions To Modern Hepatology. *Comp Hepatol.* 3 Suppl 1: S2
155. Wang P, Ayala A, Dean RE, Hauptman JG, Ba ZF, DeJong GK, Chaudry IH (1991) Adequate crystalloid resuscitation restores but fails to maintain the active hepatocellular function following hemorrhagic shock. *J.Trauma* 5: 601-607
156. Wang P, Hauptman JG, Chaudry IH (1990) Hepatocellular dysfunction occurs early after hemorrhage and persists despite fluid resuscitation. *J.Surg.Res.* 5: 464-470
157. Wang P, Hauptman JG, Chaudry IH (1990) Hemorrhage produces depression in microvascular blood flow which persists despite fluid resuscitation. *Circ.Shock* 4: 307-318
158. Weibel ER (1974) On pericytes, particularly their existence on lung capillaries. *Microvasc.Res.* 2: 218-235
159. Wennberg RP, Johansson BB, Folbergrova J, Siesjo BK (1991) Bilirubin induced changes in brain energy metabolism after osmotic opening of the blood-brain barrier. *Pediatr. Res.* 5: 473-478
160. Wiggers HC, Ingraham RC (1946) Hemorrhagic Shock:: Definition and criteria for its diagnosis. *J.Clin.Invest* 1: 30-36
161. Williamson JR, Tilton RG, Kilo C, Yu S (1980) Immunofluorescent imaging of capillaries and pericytes in human skeletal muscle and retina. *Microvasc.Res.* 2: 233-241
162. Wisse E (1970) An electron microscopic study of the fenestrated endothelial lining of rat liver sinusoids. *J.Ultrastruct.Res.* 1: 125-150
163. Wisse E, Braet F, Luo D, De ZR, Jans D, Crabbe E, Vermoesen A (1996) Structure and function of sinusoidal lining cells in the liver. *Toxicol.Pathol.* 1: 100-111
164. Wortha HP, Adams J. (1992) Die Rolle von Modellen in der Wissenschaft. In *Einführung in die medizinische Biometrie* (Ed. Adams J.), Gustav Fischer, Jena, pp. 18-19.

165. Yasui Y, Nakamura M, Onda T, Uehara T, Murata S, Matsui N, Fukuishi N, Akagi R, Suematsu M, Akagi M (2007) Heme oxygenase-1 inhibits cytokine production by activated mast cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2: 485-490
166. Zabel U, Kleinschnitz C, Oh P, Nedvetsky P, Smolenski A, Muller H, Kronich P, Kugler P, Walter U, Schnitzer JE, Schmidt HH (2002) Calcium-dependent membrane association sensitizes soluble guanylyl cyclase to nitric oxide. *Nat.Cell Biol.* 4: 307-311
167. Zakaria eR, Garrison RN, Kawabe T, Harris PD (2005) Direct peritoneal resuscitation from hemorrhagic shock: effect of time delay in therapy initiation. *J.Trauma* 3: 499-506
168. Zakhary R, Gaine SP, Dinerman JL, Ruat M, Flavahan NA, Snyder SH (1996) Heme oxygenase 2: endothelial and neuronal localization and role in endothelium-dependent relaxation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2: 795-798
169. Zhang JX, Bauer M, Clemens MG (1995) Vessel- and target cell-specific actions of endothelin-1 and endothelin-3 in rat liver. *Am.J.Physiol.* 2 Pt 1: G269-G277
170. Zhang JX, Pegoli W, Clemens MG (1994) Endothelin-1 induces direct constriction of hepatic sinusoids. *Am.J.Physiol.* 4 Pt 1: G624-G632
171. Zimmermann KW (1923) Der feine Bau der Blutkapillaren. *Z. f. ges. Anat.* 68: 29-109

8. Publikationen

1. EFFECT OF PRETREATMENT WITH HEME-BASED SOLUTIONS ON LIVER MICROCIRCULATION AFTER HEMORRHAGIC SHOCK
Inge Bauer, Sascha Pradarutti, Alexander Raddatz, Jochen Heiser, Daphne Pavlidis, Hauke Rensing and Darius Kubulus
SHOCK 26(4) (Supplement 1):40, October 2006 [Abstract]
2. HEMIN ARGINATE-INDUCED HEME OXYGENASE 1 EXPRESSION IMPROVES LIVER MICROCIRCULATION AND MEDIATES AN ANTI-INFLAMMATORY CYTOKINE RESPONSE AFTER HEMORRHAGIC SHOCK
Darius Kubulus, Alexander Mathes, Sascha Pradarutti, Alexander Raddatz, Jochen Heiser, Daphne Pavlidis, Beate Wolf, Inge Bauer, and Hauke Rensing
SHOCK 29(5) pp. 583-590, 2008
3. ENDOTHELIN-1 CONTRIBUTES TO HAEMOGLOBIN GLUTAMER-200 MEDIATED HEPATOCELLULAR DYSFUNCTION AFTER HEMORRHAGIC SHOCK.
Kubulus D, Mathes A, Reus E, Pradarutti S, Pavlidis D, Thierbach JT, Heiser J, Wolf B, Bauer I, Rensing H.
SHOCK 2008 Dec 22. [Epub ahead of print]

9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denjenigen ganz herzlich danken, ohne deren Unterstützung die Durchführung dieser Forschungsarbeit nicht möglich gewesen wäre.

Herrn Univ. Prof. Larsen danke ich für die Ermöglichung dieser Arbeit im Labor seiner Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin des Universitätsklinikums des Saarlandes, Homburg/Saar.

Des Weiteren danke ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Hauke Rensing für die Heranführung an das Thema dieser Dissertation und für die Möglichkeit, diese Arbeit in dem von ihm geleiteten Labor durchzuführen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Darius Kubulus für die hervorragende Betreuung während der Durchführung der praktischen Versuche, der Auswertung der Ergebnisse und nicht zuletzt während der schriftlichen Ausarbeitung der Dissertationsschrift. Seine Geduld, fachliche Expertise, Motivation und sein Humor trugen entscheidend zum Gelingen dieser Forschungsarbeit bei. Vielen Dank für die sorgfältige und schnelle Korrektur der Arbeit, die investierte Zeit und die angenehme Zusammenarbeit.

Vielen Dank auch an Frau Beate Wolf und Frau Dr. rer.-nat. Inge Bauer für die große tägliche Unterstützung bei der Laborarbeit und die angenehme Atmosphäre im Forschungslabor.

Frau Daphni Pavlidis, meiner Mitdotorandin im Forschungslabor, danke ich für die abwechslungsreiche und gesellige Zusammenarbeit an all den Tagen, Wochenenden und Abenden im Labor und für ihre Unterstützung bei meinen Versuchen.

Auf diesem Wege möchte ich auch meinen lieben Eltern ganz besonders danken, die mich nicht nur bei der Durchführung dieser Dissertation sondern auch während meines gesamten Studiums und allen meinen Vorhaben so uneingeschränkt unterstützten. Ihrer Unterstützung, ihrem Interesse und ihrer Großzügigkeit verdanke ich die Durchführbarkeit meines Studiums und dieser Forschungsarbeit.

10. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Jochen Heiser
Anschrift: Werderstr.55, D-76137 Karlsruhe
Geburtsdatum: 25.06.1978
Geburtsort: Konstanz
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung, Ausbildung, Studium

1985 - 1989 Grundschule Radolfzell/Böhringen
1989 - 1998 Friedrich-Hecker-Gymnasium Radolfzell, Abitur 1998
1995/1996 White Bear Lake High School, White Bear Lake, USA
Teilnahme an einem Austauschprogramm (10 Monate) und
Besuch der 12.Klasse der High School
1998/1999 DRK-Rettungswache Radolfzell, Zivildienst und Ausbildung zum
Rettungssanitäter
09/1999 - 11/2006 Universität des Saarlandes, medizinische Fakultät Homburg,
Studium der Humanmedizin, Approbation als Arzt 11/2006
09/2002- 07/2003 Universität von Valencia, Spanien, Teilnahme am ECTS-
Programm, zweisemestriges Studium an der medizinischen
Fakultät

Klinische Erfahrung, Berufstätigkeit als Arzt

10/2005 - 02/2006 Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar, Abteilung
für Innere Medizin, Robert-Koch-Klinik für Pneumologie, Klinik für
Kardiologie, internistisches PJ-Tertial
02/2006 - 06/2006 University of Cape Town, Groote Schuur Hospital, Kapstadt,
Südafrika, Trauma Unit – chirurgisches PJ-Tertial
06/2006 - 09/2006 Kantonsspital Chur, Schweiz, PJ-Tertial in der Abteilung für
Anästhesie
Seit 03/2007 Klinik für Anästhesie und Intensivmedizin, Städtisches Klinikum
Karlsruhe, Assistenzarzt in Weiterbildung zum Facharzt für
Anästhesiologie