

Aus der Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und
Schmerztherapie
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg / Saar
Direktor: Prof. Dr. med. R. Larsen

***Einfluss der Blockade der Hämoxygenase-
Aktivität auf den Leberschaden und die
differentielle hepatische Genexpression im
Modell des hämorrhagischen Schocks bei der
Ratte***

Dissertation zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2009

vorgelegt von: Björn Jung

geb. am: 17. Januar 1976 in St. Ingbert

INHALTSVERZEICHNIS

1	ZUSAMMENFASSUNG UND SUMMARY	4
1.1	Zusammenfassung	4
1.2	Summary	6
2	EINLEITUNG	9
2.1	Klinische Bedeutung	9
2.2	Hämorrhagischer Schock, SIRS, Sepsis	11
2.3	Bedeutung der Leber im hämorrhagischen Schock	13
2.4	Anatomische Grundlagen der Leber	16
2.5	Bedeutung der Hämoxxygenase im hämorrhagischen Schock	18
2.5.1	<i>Der Hämoxxygenase Stoffwechsel</i>	18
2.5.2	<i>Isoformen der Hämoxxygenase</i>	18
2.5.3	<i>Bedeutung der Stoffwechselprodukte des Hämoxxygenase-Stoffwechsels</i>	20
2.5.3.1	Bedeutung von Biliverdin und Bilirubin für den Organismus	20
2.5.3.2	Bedeutung von Eisen im Organismus	21
2.5.3.3	Bedeutung von Kohlenmonoxid	22
2.5.4	<i>Regulation der Hämoxxygenase-1-Genexpression</i>	23
2.5.4.1	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAP-Kinasen)	23
2.6	Aktivierung und Regulation der Hämoxxygenase-1	26
2.7	Leber und Apoptose	28
2.7.1	<i>Allgemeine Grundlagen</i>	28
2.7.1.1	Rolle der Caspasen	29
2.7.1.2	Auslösung der Apoptose	30
2.7.2	<i>Apoptosevorgang in der Leber</i>	30
2.8	Messung differentieller Genexpression mittels Mikroarray-Technologie	33
2.8.1	<i>Allgemeine Grundlagen der Mikroarray-Technologie</i>	34
2.8.2	<i>Genanalyse</i>	35
2.8.3	<i>Anwendungen</i>	35
2.9	Ziele/Fragestellung	36
3	MATERIAL UND METHODEN	37
3.1	Chemikalien	37
3.2	Tierexperimentelles Protokoll: Präoperative Phase und operative Phase	37
3.3	Versuchsablauf	38
3.4	Versuchsgruppen	39
3.4.1	<i>Zeitlicher Verlauf und zelltypspezifische Expressionsmuster der HO-1-Genexpression – Untersuchung auf Proteinebene mit Western Blot-Analyse und Immunhistochemie</i>	39
3.4.2	<i>Funktionelle Bedeutung des HO - Stoffwechsels – Untersuchung des Leberschadens und der differentiellen hepatischen Genexpression</i>	39
3.4.3	<i>Nachweis von HO-1-Protein mit Western Blot-Analyse</i>	40
3.4.4	<i>Immunhistochemie</i>	41
3.4.5	<i>α-GST-Konzentration (im Serum)</i>	42
3.4.6	<i>Statistische Auswertung</i>	42
3.4.7	<i>Mikroarray</i>	42
3.4.7.1	Ribonukleinsäure (RNA)-Isolierung	43
3.4.7.2	RNA Präparation	45
3.4.7.3	Weiterverarbeitung der Proben	47
3.4.7.4	Synthese der radioaktiv markierten cDNA	47
3.4.7.5	Aufreinigung der markierten cDNA mit Säulen-Chromatografie	48
3.4.8	<i>RT-PCR</i>	49

4	ERGEBNISSE	51
4.1	Makrohämodynamische Auswirkungen von Scheinoperation oder hämorrhagischem Schock mit Volumensubstitution.....	51
4.2	Basendefizit.....	54
4.3	Entnommenes Blutvolumen	56
4.4	α -GST Serumkonzentration als ein Marker der hepatozellulären Schädigung	56
4.5	Expression von HO-1-Protein in der Gesamtleber	57
4.6	Zelltypspezifische und räumliche HO-1/Hsp 32 Expressionsmuster	58
4.7	Untersuchung der durch Blockade der Hämoxygenase-Aktivität nach hämorrhagischem Schock mit Volumentherapie induzierten differentiellen hepatischen Genexpression	59
4.7.1	<i>RT-PCR-Analyse Apoptose-regulierender Gene</i>	<i>63</i>
5	DISKUSSION	69
5.1	Charakterisierung Schockmodell	70
5.1.1	<i>Arterielle Blutgase und Makrohämodynamik.....</i>	<i>70</i>
5.2	Expressionsmuster der Hämoxygenase-1	73
5.3	Auswirkungen der Hemmung der HO-1-Expression nach hämorrhagischem Schock und Volumentherapie auf den hepatozellulären Schaden	75
5.4	Protektionsmechanismen des HO-Stoffwechsels	77
5.5	Ergebnisse und Limitierung einer Mikroarrayanalyse.....	79
5.5.1	<i>Grenzen der Mikroarraytechnologie</i>	<i>79</i>
5.5.2	<i>Ergebnisse.....</i>	<i>80</i>
6	LITERATURVERZEICHNIS	89
7	DANKSAGUNG.....	110
8	LEBENS LAUF.....	111
9	ANHANG	112
10	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	116

1 Zusammenfassung und Summary

1.1 Zusammenfassung

Störungen in der zellulären Homöostase eines Organismus, die durch oxidative Stressereignisse wie z.B. einen hämorrhagischen Schock oder ein septisches Krankheitsbild ausgelöst werden, führen zur Aktivierung programmierter Stresskaskaden und sind Gegenstand der aktuellen Forschung. Eine oxidative Stressantwort bezeichnet Veränderungen auf zellulärer und molekularer Ebene durch den Anfall von reaktiven Sauerstoffspezies. Ziel des Individuums ist es, die zelluläre Integrität und Sauerstoffversorgung aufrechtzuerhalten. In der Pathogenese des Multiorganversagens nach hämorrhagischem Schock sind Störungen auf zellulärer Ebene einer der Hauptgründe für die Entstehung einer generalisierten inflammatorischen Reaktion des Organismus. Dieses „Systemic inflammatory response syndrome (SIRS)“ kann zu einem kompletten Organversagen führen. Ein zentrales, protektives Schlüsselenzym im Rahmen der oxidativen Stressantwort stellt die Hämoxxygenase-1 (HO-1), das induzierbare Isoenzym der Hämoxxygenase (HO), dar. Die HO liegt bis dato in drei Isoformen vor. Die induzierbare Form wird als HO-1 bezeichnet, die Hämoxxygenase-2 (HO-2) gilt als die konstitutiv exprimierte, nicht induzierbare Form. Die erst kürzlich beschriebene Hämoxxygenase-3 (HO-3) ist ein Enzym, welches keine katalytische Aktivität besitzt und wahrscheinlich ein prozessiertes Pseudogen darstellt, das vom HO-2-Gen stammt.

Die HO katalysiert den initialen und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt beim oxidativen Abbau von Häm. Hierbei entstehen äquimolare Mengen von Biliverdin, Kohlenmonoxid (CO) und Eisen. Das entstandene Biliverdin wird durch die im Zytosol vorliegende Biliverdinreduktase zu Bilirubin reduziert. CO ist in der Lage, durch Erhöhung der cGMP (cyclisches Guanosinmonophosphat)-Konzentration in die Tonusregulation der Blutgefäße einzugreifen.

Die stressinduzierbare Form der HO-1 spielt eine wichtige Rolle für den Erhalt der hepatozellulären Integrität nach hämorrhagischem Schock mit Volumentherapie, ihre funktionelle Bedeutung ist allerdings nur unzureichend geklärt.

Aus diesen Sachverhalten entstanden mehrere Fragestellungen, die mit Hilfe eines tierexperimentellen Modells des hämorrhagischen Schocks mit Volumentherapie an der Ratte untersucht werden sollten. Im Mittelpunkt der Untersuchungen stehen die Auswirkung eines hämorrhagischen Schocks mit konsekutiver Volumentherapie auf das

zelltypische Expressionsmuster der HO-1 in der Leber, Erkenntnisse über die funktionelle Bedeutung des Enzyms und schließlich Veränderungen in der Genexpression auf hepatozellulärer Ebene durch Blockade des HO-Stoffwechsels.

Nach Initialisierung eines hämorrhagischen Schocks (mittlerer arterieller Druck 35-40 mmHg für eine Stunde) und anschließender fünfstündiger Volumentherapie wurde der HO-Stoffwechselweg mit dem spezifischen Hemmstoff Zinn-Protoporphyrin-IX (SnPP-IX) blockiert. Dies entspricht dem Zeitpunkt der maximalen Induktion der Stressantwort und damit der HO-1-Expression auf Proteinebene.

Die Beurteilung des induzierten hepatozellulären Schadens erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten mit Hilfe der Bestimmung des Serummarkers α -Glutathion-S-Transferase (α -GST), einem sehr sensitiven leberspezifischen Marker. Nach Induktion des hämorrhagischen Schocks mit anschließender Volumentherapie kam es hauptsächlich in den perizentral gelegenen Hepatozyten zu einem deutlichen Anstieg der HO-1-Proteinexpression. Die Blockade des HO-Stoffwechselweges zum Zeitpunkt der maximalen HO-1-Induktion führte zu einer weiteren signifikanten Zunahme des Schock-induzierten Leberschadens.

Zur Untersuchung der Mechanismen, die die Zunahme des Leberschadens durch die Blockade der HO-Aktivität nach hämorrhagischem Schock mit Volumentherapie vermitteln, stand im Mittelpunkt der Arbeit die Untersuchung der differentiellen hepatischen Genexpression. Da der HO-Stoffwechsel anti-apoptotische Eigenschaften besitzt, lag der Schwerpunkt hier insbesondere auf der Untersuchung von Genen, die an der Regulation der Apoptose beteiligt sind. Die Untersuchungen erfolgten in Lebergewebe von Tieren nach hämorrhagischem Schock mit Volumentherapie ohne und mit spezifischer Blockade der HO-Aktivität. Es konnten nach der Blockade der HO-Aktivität insgesamt 69 differentiell exprimierte Gene identifiziert werden. Die Veränderungen, gemessen anhand der x-fachen Hoch- oder Herunterregulierung waren hierbei eher gering ausgeprägt.

Es wurden vier Gene näher charakterisiert, die in der Apoptose-Kaskade beteiligt sind und durchaus eine wichtige Rolle unter den untersuchten pathophysiologischen Bedingungen einnehmen könnten.

Es handelte sich bei den untersuchten Apoptosemarkern um Annexin-V, Fas-Ligand, Tumornekrosefaktor (TNF)-Rezeptor und die Caspase-3. Eine eindeutige Aussage, ob diese aufgrund der Blockade der HO-Aktivität unterschiedlich exprimierte Gene, eine entscheidende Rolle für die beobachtete Zunahme des Leberschadens spielen, lässt sich

aufgrund der zum Teil nicht signifikanten Hoch- bzw. Herunterregulierung und der geringen Anzahl der untersuchten Proben (n=1) aus jeder Versuchsgruppe nicht endgültig treffen. Zur weiteren Charakterisierung der ermittelten Daten des Mikroarray wurde daher mit einer größeren Anzahl an Proben (je n=5) eine RT-PCR zum Nachweis der o.g. vier spezifischen Apoptosemarker durchgeführt. Ein signifikanter Anstieg der Induktion konnte hier für einen Marker bestätigt werden. Hier handelte es sich um den unter Blockade des Hämoxxygenasestoffwechsels verstärkt exprimierten TNF-Rezeptor. Für die anderen drei untersuchten Marker konnte keine signifikante Veränderung in der Genexpression gezeigt werden. Hier müssen weitere Untersuchungen, möglicherweise zu einem früheren Zeitpunkt nach Blockade des HO-Stoffwechsels und auch an größeren Populationen, durchgeführt werden, damit weitere Rückschlüsse zur Rolle der Induktion von HO-1 für den durch hämorrhagischen Schock mit Volumentherapie induzierten Leberschaden gezogen werden können.

1.2 Summary

Severe disturbances of cellular homeostasis, like hemorrhagic shock or sepsis, may lead to oxidative stress and predefined cellular responses within the organism. During such events, ischemia and reperfusion commonly triggers the formation of reactive oxygen species, which typically results in the activation of signal transduction cascades and specific molecular modifications. These responses aid the protection of cellular oxygenation, organ integrity and the survival of the organism.

Multi organ dysfunction syndrome following hemorrhagic shock is thought to be due to a generalized inflammatory response on a cellular level. This systemic inflammatory response syndrome (SIRS) may lead to terminal organ malfunction and death. Heme oxygenase-1 (HO-1), the inducible isoform of heme oxygenase (HO), has been identified to be a key protective enzyme in such oxidative stress responses.

So far, three isoforms of HO have been described: the inducible form, HO-1, a constitutively expressed form, (heme oxygenase 2) HO-2, and (heme oxygenase 3) HO-3, which is thought to be a processed pseudogene of HO-2 without any catalytic activity. HO is the rate limiting enzyme that catalyses the initial step of oxidative degradation of heme, resulting in equimolar quantities of biliverdin, iron and carbon monoxide (CO). Biliverdin itself is reduced to bilirubin by cytosolic biliverdin reductase. CO produced by HO-1 may interfere with vasomotor regulation by increasing the concentration of cyclic guanosine monophosphate in hepatic stellate cells, resulting in sinusoidal vasodilatation.

The stress inducible form of HO, HO-1, appears to play a critical role for hepatocellular integrity after hemorrhagic shock and resuscitation. Yet, the functional relevance of HO-1 during hemorrhagic shock has not been fully understood. Therefore, this study was designed to clarify the role of HO-1 in a rat model of hemorrhagic shock and resuscitation. With special emphasis on potential hepatoprotective effects of HO-1, we evaluated the spatial expression pattern of HO-1 in rat liver lobules, and investigated hepatic gene expression after blockade of the HO metabolic pathway after hemorrhage in rats. After one hour of pressure controlled hemorrhagic shock (mean arterial pressure: 35 - 40 mm Hg) and five hours of reperfusion, the HO metabolic pathway was inhibited by using the false substrate tin protoporphyrin-IX (SnPP-IX). The chosen time point reflects the observed maximum activation of HO-1 on the protein level.

Analysis of hepatocellular damage was performed by measuring serum enzyme activity of alpha glutathione-S-transferase (α -GST), a sensitive and specific marker of liver injury. After hemorrhagic shock and resuscitation, expression of HO-1 protein was enhanced in the pericentral area of liver lobules. Inhibition of the HO pathway at the time of maximum HO-1 induction resulted in an increase in liver damage after hemorrhagic shock. To identify the underlying mechanisms that may lead to liver damage after hemorrhagic shock and blockade of the HO pathway, an analysis of hepatic differential gene expression was performed. As heme oxygenase is known to induce anti-apoptotic effects, this evaluation was focused on genes that are involved in the regulation of apoptotic mechanisms. Differential gene expression was investigated in rat liver of animals who underwent hemorrhagic shock and resuscitation with or without pharmacological interference with the HO pathway. After inhibition of HO activity, a total of 69 differentially regulated hepatic genes were recognized; however, the differential up- or downregulation of these genes was generally weak. In the following, four genes with important influence within apoptotic cascades and potential impact on hepatocellular pathophysiological alterations were identified: annexin-V, fas-ligand, tumor necrosis factor receptor, and caspase-3.

As this investigation was based on one sample ($n = 1$), and since differential gene expression of the abovementioned genes failed to meet statistical significance, the relevance of these genes for hepatocellular damage following hemorrhagic shock and interference with the HO-1 pathway remained unclear. As a consequence, a reverse-transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis of annexin-V, fas-ligand, tumor necrosis factor receptor, and caspase-3 was performed, using a larger sample size

for each group (n = 5). Evaluation of the obtained results revealed a significant upregulation of tumor necrosis factor receptor after inhibition of HO activity by the false substrate SnPP-IX; however, differential gene expression of the other genes was not significantly altered. To clarify the role of hepatoprotective effects of HO-1 induction after hemorrhagic shock and resuscitation, further experiments – possibly using different time points for the evaluation of differential gene expression – will be needed.

2 Einleitung

2.1 Klinische Bedeutung

Das Krankheitsbild Sepsis stellt heute in der modernen Medizin ein zentrales medizinisches wie auch ökonomisches Problem dar.

Ein 2001 gegründetes Kompetenznetzwerk Sepsis (SepNet) führte in Deutschland über den Zeitraum von zwölf Monaten (Januar 2003 – Januar 2004) eine prospektive Querschnittstudie repräsentativ an 454 Intensivstationen in 310 Krankenhäusern durch. Ziel dieser Studie war es, epidemiologische und klinische Daten zu dieser Erkrankung zu gewinnen. Diese Zahlen ergeben für Deutschland, dass jährlich 75.000 Einwohner (110 von 100.000) an einer schweren Sepsis und 79.000 Einwohner (116 von 100.000) an einer Sepsis erkranken. 60.000 Todesfälle pro Jahr lassen die Sepsis auf Platz drei der Todesursachenstatistik nach koronarer Herzkrankheit (KHK) und akutem Myokardinfarkt erscheinen. Sepsis erscheint damit als siebthäufigste Entlassungsdiagnose unter den lebensbedrohlichen Erkrankungen in deutschen Krankenhäusern. Die 90 Tage-Sterblichkeitsrate liegt bei ca. 54% für die schwere Sepsis. Offizielle Zahlen seitens des Statistischen Bundesamtes, die auf ICD-10 (International Classification of Diseases and Related Health Problems) kodierte Entlassungsstatistiken der Krankenhäuser basieren, geben die Zahl der Neuerkrankungen mit lediglich 39.000 Patienten an, die Anzahl der Patienten, welche an der Sepsis versterben, wird hier mit 6000 angegeben. (BAUER 2006, BRUNKHORST 2005)

68% der Patienten, die eine schwere Sepsis hatten, waren älter als 60 Jahre, weitere 25% waren in einem Alter zwischen 40 und 59 Jahren, 7% waren in einem Alter zwischen 18 und 39 Jahren. In den beiden Gruppen der 18-39 Jährigen und 40–59 Jährigen verstarben 46%, gegenüber 60% in der erstgenannten Gruppe (> 60 Jahre). Komorbiditäten (metastasierende Tumorerkrankungen, Herzinsuffizienz im Stadium NYHA IV, dialysepflichtiges Nierenversagen, Leberzirrhose, restriktive oder obstruktive Lungenerkrankungen) zeigten lediglich 19% der Patienten mit schwerer Sepsis auf, bei den Verstorbenen ließen sich diese Begleiterkrankungen bei 24% nachweisen.

Eine Übereinstimmung mit epidemiologischen Studien der USA und Europa liegt bezüglich des Fokus bei Patienten mit schwerer Sepsis vor. Mit 63% stellen Atemwegsinfektionen den häufigsten Fokus dar, gefolgt von intraabdominellen Infektionen mit 25,3% (MARTIN 2003).

Die SepNet Prävalenz Studie zeigte, dass 35,4% der Patienten eine ambulant erworbene Infektion und 19,8% eine im Krankenhaus außerhalb der Intensivstation erworbene Infektion hatten, die als Auslöser der Sepsis zu sehen waren. Die Ergebnisse der European-Prevalence-of-Infection-in-Intensive-Care (EPIC)-Studie konnten hier widerlegt werden. Aus dieser Studie war Mitte der Neunziger Jahre gefolgert worden, dass meist nosokomiale Infektionen, also Infektionen, die im Krankenhaus bzw. auf Intensivstationen erworben wurden, als Auslöser der Sepsis galten (VINCENT 1995).

Die Kosten, die durch eine intensivmedizinische Behandlung von Patienten mit schwerer Sepsis entstehen, belaufen sich auf ca. 1,77 Milliarden Euro jährlich. Dies entspricht ca. 30% des Budgets der gesamten Intensivmedizin.

Trotz weitreichender Fortschritte in der modernen Intensivmedizin führt ein Versagen von drei oder mehr Organsystemen immer noch zu einer Letalität von 90% (BEAL 1994). Insbesondere das manifeste Versagen der Leber geht hier mit einer schlechten Prognose einher (BAUER 2004). Neben ihrer wichtigen Bedeutung im Postaggressionsstoffwechsel spielt die Leber auch eine zentrale Rolle im Intermediärstoffwechsel und als Immunorgan. Sie beeinflusst dadurch die Prognose kritisch kranker Patienten in einer zentralen Stellung. Den hier morphologisch und funktionell zu unterscheidenden Hepatozyten oder parenchymatösen Zellen und den verschiedenen Typen von nichtparenchymatösen Zellen kommen unterschiedliche Aufgaben zu.

Die komplexe Funktion der Leber im Stoffwechsel und als Immunorgan ist bei einer schweren Dysfunktion oder einem kompletten Ausfall nur sehr schwer mit therapeutischen Verfahren zu ersetzen. Insbesondere die Elimination, der im Organismus anfallenden Stoffwechselprodukte, stellt die moderne Intensivmedizin vor erhebliche Probleme in der Behandlung sowohl des akuten als auch des chronischen Leberversagens.

Das Problem eines sich entwickelnden Leberversagens liegt darin, dass die in Folge der gestörten Entgiftungsfunktion akkumulierenden Toxine nicht nur die Funktion verschiedenster Organe stören, sondern auch durch eine direkte zytotoxische Wirkung auf die Hepatozyten selbst ihre eigene Eliminierung blockieren und damit die toxische Wirkung weiter beschleunigen. Extrakorporale Blutreinigungsverfahren wie die Hämodialyse und die Hämofiltration konnten keine klinisch ausreichende Effektivität in der Detoxikation erreichen, da der überwiegende Anteil der Toxine proteingebunden vorliegt (KNELL 1976, O'GRADY 1988). Maschinelle Leberersatzverfahren verfolgen

daher prinzipiell zwei verschiedene Ziele. Sie versuchen, die Entgiftungsfunktion der Leber zu übernehmen oder aber als sogenannter „Bioreaktor“ mit der Hilfe von Zellkulturen die gesamte Funktion des Organs Leber zu ersetzen. Hintergrund dieser Therapie ist es, die Zeit bis zur geeigneten Bereitstellung eines Organs zur Transplantation oder idealerweise bis zur Erholung der erkrankten Leber zu überbrücken. In der Gruppe der bioartifiziellen Verfahren wurden in den letzten Jahren mehrere unterschiedliche Systeme entwickelt und an kleinen Patientenkollektiven erprobt. Hier wurde versucht, sämtliche Funktionen der Leber zumindest kurzfristig zu ersetzen. Zum Einsatz kommen zum Beispiel Schweine-Hepatozyten oder immortalisierte Leberzellen, die als Biokatalysatoren eingesetzt werden. Diese Kulturen aus Hepatozyten bilden zusammen mit einem kapillären System eine funktionelle Einheit, um einen ausreichenden Austausch von Toxinen und Nährstoffen zu gewährleisten. Eine suffiziente Synthesefunktion kann allerdings nur bedingt erreicht werden (SAUER 2002). Bei den rein maschinellen Verfahren stehen im Zentrum der Therapie lediglich die Unterstützung der Entgiftungsfunktion der Leber und daneben die Aufrechterhaltung der Homöostase. Allerdings können diese Verfahren keinen Ausgleich für die gestörte Lebersynthese erbringen. Klassische Verfahren aus der Nephrologie wie die Hämodialyse oder Hämoadsorption konnten keine Verbesserung der Prognose zeigen (KNELL 1976, O'GRADY 1988). Es wurden neuere Verfahren entwickelt mit dem Ziel der Elimination albumingebundener Substanzen. Die Nutzung von Humanalbumin als Trägerstoff in den sogenannten MARS[®]-Dialysatoren (Molecular adsorbents recirculating system, Gambro Industries, Schweden) hat die Aufgabe, Toxine aus dem Blutkompartiment mittels der Kombination von Hämodiafiltration, Hämodialyse und Adsorption zu beseitigen. Diese 1993 eingeführte Technik kann in Kombination mit ggf. vorhandener Dialysetechnik zu einem möglicherweise breiteren Einsatz dieser Entgiftungseinheit führen als herkömmliche Verfahren (HAWKER 1991, MARZI 1994, FAYBIK 2003, SEN 2005, WEDEKIND 2006).

2.2 Hämorrhagischer Schock, SIRS, Sepsis

Hämorrhagischer Schock bezeichnet ein akut bis subakut einsetzendes, ausgelöst durch exogene (z.B. Trauma) oder endogene (z.B. Aortenaneurysmaruptur) Blutverluste bedingtes, in der Regel fortschreitendes, generalisiertes Kreislaufversagen. Bezeichnend hierfür ist ein Missverhältnis zwischen systemischem Sauerstoffangebot und peripherem Sauerstoffbedarf, was über eine Störung der Mikrozirkulation zur Hypoxie im Gewebe

führt. Auch nach erfolgreicher Wiederherstellung der Makrozirkulation kann es, obwohl eine primäre Infektionsquelle nicht nachweisbar ist, zu einer generalisierten, abakteriellen, hyperinflammatorischen Entzündungsreaktion des Organismus kommen. Typische klinische Zeichen einer Infektion wie Fieber oder Leukozytose sind nachweisbar (systemic inflammatory response syndrome, SIRS) (BEAL 1994). Aus dieser generalisierten Infektionsreaktion kann sich in mehreren Stadien ein Versagen mehrerer Organe entwickeln (multiple organ dysfunction syndrome, MODS). Hier hat sich seit der Erstbeschreibung einer septischen Allgemeininfektion durch Jakob (1909) eine grundlegende Wandlung vollzogen, sowohl was den pathophysiologischen Hintergrund als auch Konzepte der intensivmedizinischen Therapie betreffen.

Bis dato standen Auswirkungen von Erregern auf den Organismus sowie der Nachweis einer bakteriellen Infektion (z.B. durch eine positive Blutkultur) im Vordergrund. Aktuell geht man von einer überschießenden Aktivierung primär protektiver Defensivsysteme aus, die den klinischen Verlauf eines SIRS prägen.

Eine Konsensuskonferenz unter Schirmherrschaft des American College of Chest Physicians (ACCP) und der Society of Critical Care Medicine (SCCM) hat 1992 für die Begriffe SIRS, Sepsis und MODS erstmals eine einheitliche Definition festgelegt (ACCP/SCCM CONSENSUS CONFERENCE 1992).

Ein SIRS als systemische Entzündungsreaktion kann bei einer Vielzahl klinischer Ereignisse (z.B. Verbrennung, Polytrauma, abakterielle Pankreatitis) vorliegen, hierbei müssen zwei der im Folgenden genannten klinischen bzw. laborchemischen Kriterien erfüllt sein:

1. Hypo- ($< 36^{\circ}\text{C}$) oder Hyperthermie ($> 38^{\circ}\text{C}$)
2. Tachykardie ($> 90/\text{min}$)
3. Tachypnoe (> 20 Atemzüge/min oder $\text{pCO}_2 < 32$ mmHg)
4. Leukozytose ($> 12000 /\mu\text{l}$) oder Leukopenie ($< 4000/\mu\text{l}$), Linksverschiebung im Differentialblutbild

Das Krankheitsbild Sepsis bezeichnet definitionsgemäß eine generalisierte Entzündungsreaktion mit den o.g. klinischen Kriterien als Antwort auf eine gesicherte oder vermutete Infektion (ACCP/SCCM CONSENSUS CONFERENCE 1992, BONE 1992).

Die Diagnose eines MODS wird nach Definition der ACCP/SCCM Consensus Conference gestellt beim „Zustand einer gestörten Organfunktion eines akut kranken Patienten, bei dem zur Aufrechterhaltung der Homöostase eine intensivmedizinische Intervention nötig ist“. Hier wurde eine Unterscheidung zwischen primärem und sekundärem MODS getroffen. Unter der primären Form versteht man eine Organdysfunktion durch einen direkt vorausgegangen Insult, bei der sekundären Form stellt das Syndrom eine Konsequenz auf eine Antwort des Organismus dar und wird in Zusammenhang mit einem SIRS nachgewiesen (ACCP/SCCM CONSENSUS CONFERENCE 1992).

Die Klinik der Sepsis und eines abakteriellen SIRS ist gekennzeichnet durch die typischen Zeichen einer unspezifischen Entzündung wie Abgeschlagenheit, Schüttelfrost und Fieber. Darüber hinaus manifestieren sich spezifische Symptome in Abhängigkeit der entsprechenden Organmanifestation. Hierzu gehören qualitative und quantitative Veränderungen der Bewusstseinslage, arterielle Hypotension, eine Oligurie oder Zeichen einer respiratorischen Insuffizienz.

In der Genese der Sepsis spielt das Zusammenwirken von Infektion und der dadurch ausgelösten Immunantwort eine entscheidende Rolle. Dieser Vorgang mündet in einer Aktivierung immunkompetenter Zellen (Monozyten, Leukozyten, Lymphozyten) und im Folgenden in einer Ausschüttung endogener proinflammatorischer Mediatoren. Insgesamt führt dies dann zu einer Zunahme der Zytokingenexpression und der Freisetzung von Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Interleukin-1 (IL-1). Aus dieser Überreaktion des Immunsystems folgt häufig eine sekundäre Schädigung von Organen im Sinne einer Autodestruktion wichtiger Strukturproteine. Das Organversagen manifestiert sich oft erst Tage nach dem eigentlichen Schockereignis.

2.3 Bedeutung der Leber im hämorrhagischen Schock

Die Entwicklung einer hepatozellulären Funktionsstörung nach hämorrhagischem Schockereignis geht mit einem deutlichen Anstieg der Mortalität einher. In der westlichen Welt stellt ein Leberversagen, ausgelöst durch ein traumatisches Schockereignis, eine der häufigsten Todesursachen dar (REGEL 1996). Eine schock-induzierte Veränderung der Makro- und Mikrozirkulation führt zu einer Zentralisation des Kreislaufes mit bevorzugter Perfusion von Herz und Gehirn, parallel hierzu kommt es zu einer Vasokonstriktion im Splanchnikusgebiet. Verantwortlich für diese Zentralisation sind erhöhte Katecholaminspiegel. Für die hepatische Durchblutung heißt dies, dass es

sowohl zu einer Verminderung der arteriellen als auch der portalvenösen Blutzufuhr kommt. Die Durchblutung der Leber unter Ruhebedingungen liegt bei 25% des Herzzeitvolumens. Ein Drittel dieses Zustromes wird über die Arteria hepatica zugeleitet, zwei Drittel über den portalvenösen Zustrom (BRADLEY 1949). Eine Ausstattung des Gefäßbettes mit β_2 -Rezeptoren führt bei Anstieg der AdrenalinKonzentration zu einer Relaxierung der glatten Muskulatur in der Gefäßwand, hierauf folgt eine Vasodilatation der Gefäße (BUSSE 2005, KAROW 2003).

Eine hepatozelluläre Dysfunktion stellt sich meist erst nach Reperfusion und Wiederherstellung der Blutzirkulation nach dem akuten Ereignis der Ischämie und begleitender Hypotension ein (WANG 1990). An der Pathogenese des Ischämie-Reperfusion (I/R)-Schadens der Leber ist die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies wesentlich beteiligt. Diese entstehen sowohl in der frühen als auch in der späten Phase der Reperfusion. Während in der frühen Phase der Reperfusion (in den ersten zwei Stunden) überwiegend Kupferzellen für die Entstehung des oxidativen Stress verantwortlich sind, tragen in der späteren Phase der Reperfusion (sechs Stunden oder später) überwiegend neutrophile Granulozyten zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und damit weiterer Schädigung der Hepatozyten bei (JAESCHKE 1991). Weiterhin tragen eine Entzündungsantwort (JAESCHKE 2006) und Störungen der Mikrozirkulation (CLEMENS 1997, JAESCHKE 1998, VOLLMAR 1994) zum Leberschaden nach hämorrhagischem Schock und Reperfusion bei.

Daneben können zusätzlich auch andere Auslöser einer Zelledestruktion wie Auswirkungen von Endotoxinen und eine Akkumulation von Stoffwechselabbauprodukten, die bei einer systemischen Entzündungsreaktion entstehen, zu Funktionseinschränkungen der Leber führen.

Endotoxine stellen Membranbestandteile gramnegativer Bakterien dar, welche per Translokation die Zottenmembran des Darms passieren und über die Pfortader in die Leber gelangen können. Diese Erkenntnisse konnten bereits in mehreren Modellen sowohl bei Sepsis als auch bei I/R dargestellt werden. Neben den oben beschriebenen Endotoxinen können aber auch vitale Bakterien und nicht nur deren Bestandteile nachgewiesen werden. Ursache dieser Störung der Mukosabarriere scheint eine Minderdurchblutung der Darmzotten zu sein, worunter es zur Ausbildung von Nekrosen kommt (BERG 1999, DEITCH 1990).

Sowohl im Blut zirkulierende als auch ortsständige Leukozyten bzw. ihre Unterformen (Lymphozyten, Monozyten) können durch Endotoxine aktiviert werden. Als Folge dieser

Aktivierung können proinflammatorische Mediatoren (Zytokine (z.B. TNF- α , IL-1), reaktive Sauerstoffspezies) freigesetzt werden. Hierdurch kann eine Apoptose von Leberzellen induziert werden und darüberhinaus kommt es zur Autodestruktion mit Parenchymuntergang und Funktionseinschränkung. Dies bedeutet für die Leber neben ihrer Funktion als wichtiges Organ im Immunsystem, dass auch eine Vielzahl von Stoffwechselprozessen beeinträchtigt sein können. Die Bildung von Gerinnungsfaktoren, Akute-Phase-Proteinen, Proteinase-Inhibitoren oder der Abbau von Toxinen kann durch diese Funktionseinschränkung gestört sein bzw. zum Erliegen kommen (LÖFFLER 1998).

Bei einem Funktionsverlust der Leber bei Patienten, die bis dato eine normale Leberfunktion hatten, spricht man von einem akuten Leberversagen. Abzugrenzen hiervon ist ein „akut-auf-chronisches“ Leberversagen. Dieses entsteht, wenn eine bereits chronisch geschädigte Leber akut in einen Zustand der Dekompensation gerät. Anders als beim akuten Versagen ist beim chronischen Leberversagen lediglich eine Transplantation des Organs eine Möglichkeit der kurativen Therapie. Beim akuten Leberversagen bieten überbrückende Leberersatzverfahren, wie bereits oben beschrieben, die Möglichkeit, Funktionen des ausgefallenen Organes zu unterstützen bzw. teilweise zu ersetzen. Wird dieses intermittierende Verfahren bis zur Erholung des Organes eingesetzt, spricht man vom sogenannten „Bridging“. In einer Phase-I-Studie wurde bei 8 Patienten mit akutem Leberversagen ein erfolgreiches „Bridging“ bis zur Lebertransplantation durchgeführt (SAUER 2003).

2.4 Anatomische Grundlagen der Leber

Im menschlichen Organismus stellt die Leber das größte Stoffwechselorgan des Körpers dar. Der Austausch von Nährstoffen und Sauerstoff mit den Hepatozyten findet in den Lebersinusoiden statt. Diese enthalten Mischblut, einerseits sauerstoffreiches Blut aus der A. hepatica (vas privatum der Leber), andererseits Nährstoffe aus dem Splanchnikusgebiet über die Pfortader (vas publicum der Leber). Die Leberzellen sind zu mehrschichtigen Zellplatten zusammengefasst und richten sich in sternförmiger Form auf die Zentralvene aus. Untereinander sind die Leberzellplatten durch einschichtige Zellsäulen verbunden. Lebersinusoiden besitzen im Durchschnitt eine Länge von einem halben Millimeter. Sie werden von einer dünnen Endothelschicht ausgekleidet, die allerdings von „interzellulären Öffnungen“ durchsetzt ist. Daneben findet man porenartige Öffnungen. Eine Basalmembran an der Endothelzellschicht fehlt. Ein weiterer Zelltyp sind die Kupferzellen, die im Lumen der Lebersinusoiden lokalisiert sind. Kupferzellen sind leberspezifisch und gehören zu einer Gruppe phagozytosefähiger Zellen, sie spielen bei der Speicherung und Zersetzung von Fremdstoffen eine wichtige Rolle (SCHIEBLER 1997).

Die Endothelzellen werden umgeben von einem engen perisinusoidalen Raum, dem Disse-Raum. Dieser wird wieder begrenzt von Hepatozyten. Hier befinden sich, wiederum leberspezifisch, die hepatischen Sternzellen. Dies sind Zellen, die über Zellausläufer, sogenannte Dendriten, untereinander verbunden sind. Neben der Speicherung von Vitamin A und dessen Metaboliten, besitzen sie kontraktile Eigenschaften und können so die Sinusoidweite beeinflussen. Über diesen Mechanismus kann die Regulation der Lebermikrozirkulation erfolgen.

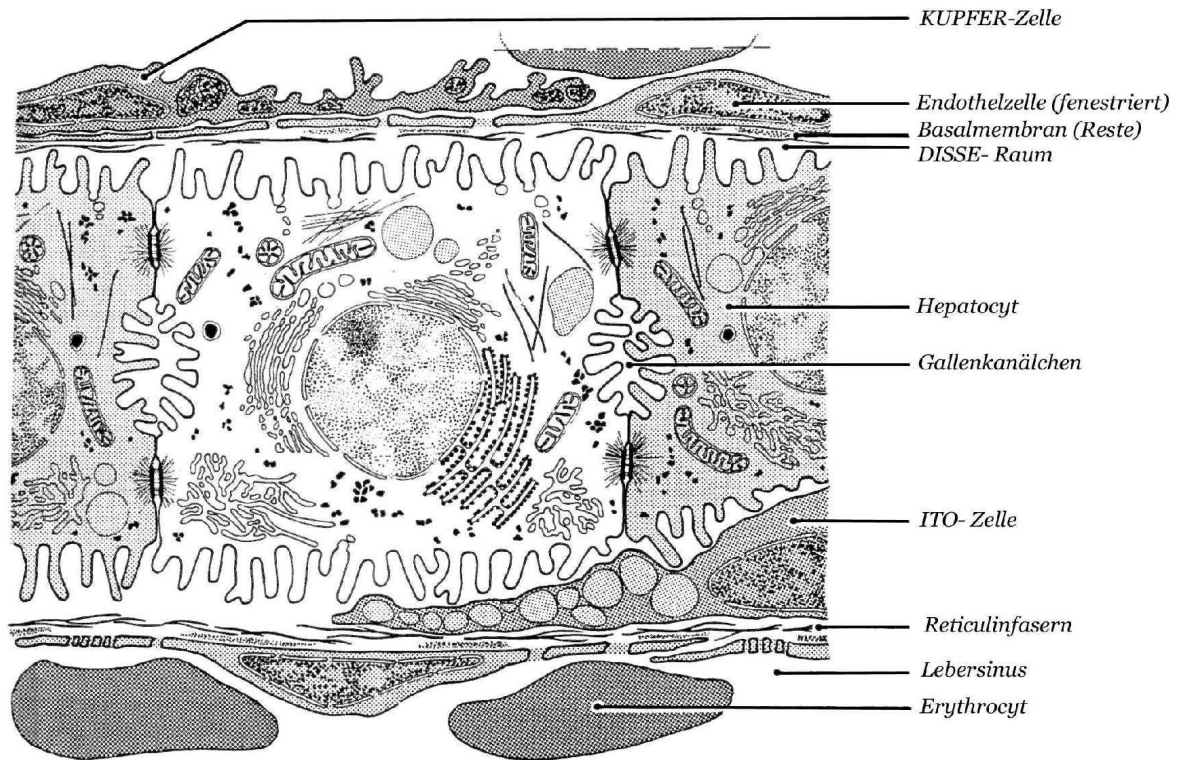


Abb. 1: Aufbau der Leber

Schematischer Aufbau einer Leberzelle aufgrund elektronenmikroskopischer Erkenntnisse. Das periportale Bindegewebe, das um die einzelne Zelle ausgebildet ist wird an bestimmten Stellen von Venen, Arterien der Arteria hepatica communis und Gallenkanälchen durchbrochen, die so mit den Lebersinusoiden in Kontakt stehen. Im Sinusbereich befinden sich Mikrovilli, die in den Disse-Raum ragen und so die Oberfläche vergrößern (Abb. Aus Schiebler, Schmidt, Zilles Anatomie. 7.Auflage, 1997)

2.5 Bedeutung der Hämoxygenase im hämorrhagischen Schock

2.5.1 Der Hämoxygenase Stoffwechsel

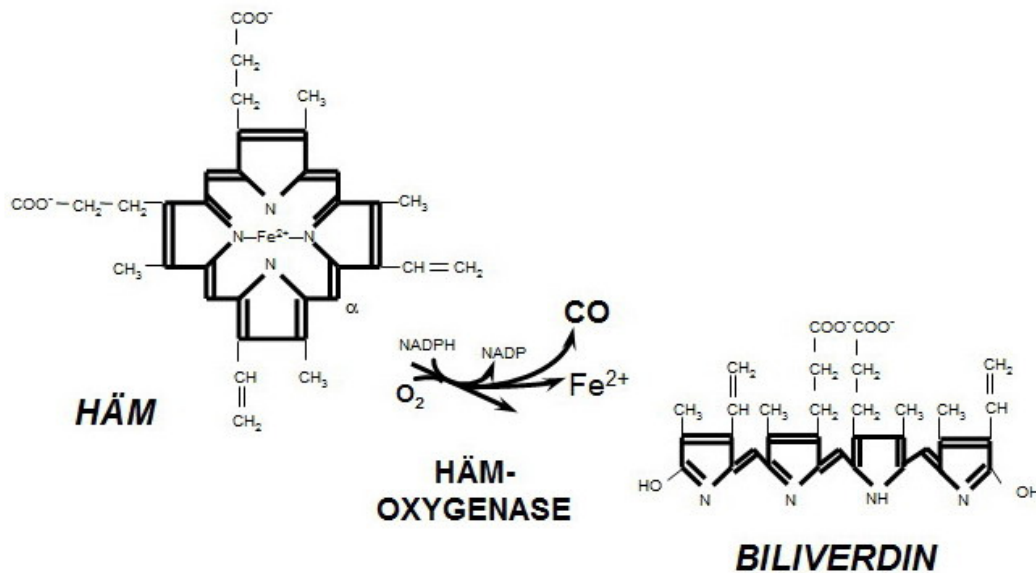


Abb. 2: Hämoxygenase-Stoffwechsel

Beim Hämabbau wird im ersten, durch die HO katalysierten, Schritt der Porphyrinring des Hämoleküls in einer Sauerstoff- und Nicotinamidadenindinukleotidphosphat- (NADPH-) vermittelten Reaktion an der α -Methingruppe gespalten.

Dabei entstehen Biliverdin-IX (offenkettiges Tetrapyrrolderivat), CO und freies Eisen (TENHUNEN 1968). Biliverdin wird in einer weiteren durch Biliverdinreduktase katalysierten Reaktion zu Bilirubin reduziert (KUTTY 1981). Bilirubin benutzt Albumin als Trägerprotein im Blutkreislauf, da es keine Löslichkeit in Wasser besitzt. Aufgenommen wird es schließlich in der Leber, wo ein großer Teil mit Uridin 5'-diphosphat-Glucuronsäure konjugiert wird und als Diglucuronoid mit der in der Leber gebildeten Galleflüssigkeit ausgeschieden wird. Das entstehende CO wird unverändert über die Lunge aus dem Organismus ausgeschieden (MARKS 1991).

2.5.2 Isoformen der Hämoxygenase

Von der Hämoxygenase sind drei unterschiedliche Isoenzyme beschrieben, welche mit HO-1, HO-2 und HO-3 bezeichnet werden. Diese werden von unterschiedlichen Genen kodiert (CRUSE 1988; MC COUBREY 1997). Hiervon stellt die Isoform 1 eine induzierbare Form dar und entspricht dem Hitzeschockprotein 32 (Hsp32), Isoform 2 stellt die konstitutive, nicht induzierbare Form dar (MAINES 1988). HO-1 und HO-2 haben die Aufgabe, das im Körper anfallende Häm abzubauen (MAINES 1997, Übersicht

MAINES 1988). Die Rolle der dritten Isoform, HO-3 (MC COUBREY 1997), ist weitgehend unklar, es scheint sich aber um ein prozessiertes Pseudogen zu handeln, das vom HO-2-Gen stammt, ohne katalytische HO-Aktivität (HAYASHI 2004). Die Gesamt-HO-Aktivität wird in den verschiedenen Organen von der unterschiedlichen Aktivität der Isoformen geprägt. Die Milz ist als vorwiegendes Organ zu nennen, welches unter physiologischen Bedingungen HO-1 exprimiert. Leber, ZNS, sowie kardiovaskuläres System exprimieren vorwiegend HO-2 (MAINES 1988). Verglichen wurde die zelltypspezifische Expression und Regulation von HO-1 und HO-2 erstmals am Organ der Leber. Unter physiologischer Homöostase ist die Isoform HO-2 das dominante Enzym. Gebildet wird dieses in Hepatozyten, Kupfferzellen, Endothelzellen und in hepatischen Sternzellen der Leber. Die Hepatozyten machen dabei 85% der HO-Aktivität aus. Kupfferzellen stellen den einzigen Zelltyp dar, der unter physiologischen Bedingungen HO-1 exprimiert. Unter pathophysiologischen Bedingungen kann eine Neusynthese der HO-1 auch in Hepatozyten sowie eine Induktion in Kupfferzellen erfolgen, während die Aktivität der HO-2 in allen Leberzelltypen nahezu unverändert bleibt (BAUER 1998, GODA 1998). Die Induktion der HO-1 kann von unterschiedlichen Stimuli ausgehen. Diesen ist gemeinsam, dass sie oxidativen Stress auslösen können. Zu diesen verschiedenen Stimuli gehören z.B. Häm, Hypoxie, Hitzeschock, UV-Licht, Endotoxin, Schwermetalle, Wasserstoffperoxid, I/R, proinflammatorische Zytokine und Pharmaka (aktuelle Übersicht in RYTER 2006). Darüber hinaus kann das atriale natriuretische Peptid (ANP) die Stimulation von HO-1 in Endothelzellen bewirken (KIEMER 2003). Auch in der Natur vorkommende Stoffe können eine Aktivierung der HO-1 bewirken, wie neuere Untersuchungen zeigen. Hierzu zählen Polyphenole pflanzlichen Ursprungs wie z.B. Kaffeesäurephenylester (SCAPAGNINI 2002) oder Curcumin (MOTTERLINI 2000) und Resveratrol (JUAN 2005). Eine Induktion der HO-2-Genexpression ist bisher lediglich für Glukokortikoide beschrieben (RAJU 1994, MAINES 1997).

2.5.3 Bedeutung der Stoffwechselprodukte des Hämoxxygenase-Stoffwechsels

Die beim Hämabbau gebildeten Produkte sah man in der Vergangenheit lediglich als unwirksame und toxische Abfallprodukte dieses physiologischen Stoffwechselweges an. In den letzten Jahren konnte allerdings gezeigt werden, dass alle HO-Stoffwechselprodukte eine biologische Funktion besitzen.

So besitzen Biliverdin und darüber hinaus die reduzierte Form Bilirubin, antioxidative Eigenschaften. Bilirubin wird als ein sehr potentes Antioxidans gesehen, seit festgestellt wurde, dass es in der Lage ist, in gleichem Maße Sauerstoffradikale abzufangen wie α -Tocopherol, welches als stärkstes endogenes Antioxidans zählt. Darüber hinaus kann es in physiologischen Blutplasmakonzentrationen Albumin vor Oxidation schützen (STOCKER 1987). CO besitzt unter physiologischen und pathophysiologischen Zuständen, in denen sich ein Organismus befinden kann, eine absolut entscheidende Rolle zur Wahrung oder Wiedererlangung einer Homöostase. CO weißt neben antientzündlichen und antiapoptotischen Eigenschaften auch die Fähigkeit auf, die Blutgefäßregulation im Sinne einer Vasodilatation zu beeinflussen (Übersicht in HOETZEL 2006). Eisen ist primär ein schädliches prooxidatives Stoffwechselprodukt, wird allerdings bei vermehrtem Anfall nach Induktion von HO-1 durch eine parallele Induktion von Ferritin abgefangen und so entgiftet (BACH 2002, TAKAHASHI 2004).

Die Beschreibung des ersten humanen Falls eines Defekts im HO-1-Gen und damit fehlender HO-1-Produktion unterstreicht die Schlüsselfunktion dieses wichtigen Enzyms *in vivo* bereits unter physiologischen Bedingungen (YACHIE 1999). Bei dem beschriebenen Patienten zeigten sich eine Wachstumsstörung, eine hämolytische Anämie und Schäden am Endothel. Der Patient verstarb bereits im Kindesalter. Diese Daten weisen darauf hin, dass eine normale HO-2-Aktivität eine fehlende basale HO-1-Aktivität nicht ersetzen kann. Bei Mäusen mit HO-1-Mangel wurden ähnliche Effekte wie Störungen im Wachstum, chronische Entzündungen und Anämien beobachtet (POSS 1997).

Im Folgenden möchte ich näher auf die Funktion der einzelnen Stoffwechselprodukte im Organismus eingehen:

2.5.3.1 Bedeutung von Biliverdin und Bilirubin für den Organismus

Beim Abbau von Häm wird zunächst in einer NADPH/H⁺-abhängigen Reaktion Biliverdin gebildet. Biliverdin wird anschließend durch die Biliverdinreduktase zu Bilirubin reduziert.

An Albumin gebundenes Bilirubin wird als indirektes oder unkonjugiertes Bilirubin bezeichnet. Glukuronidiertes Bilirubin wird als direkt reagierendes oder konjugiertes Bilirubin bezeichnet. Nach Abtrennung des Bilirubins vom Albumin kann die Aufnahme von Bilirubin in Hepatozyten erfolgen. Ligandin dient dabei als Trägerprotein. Durch Veresterung der Propionatreste von Bilirubin mit Glukuronat wird das Molekül wasserlöslicher, da intramolekulare Wasserstoffbrücken gelöst sind, und kann so über die Galle ausgeschieden werden (LÖFFLER 2000). Der Transport aus den Hepatozyten in die Galle erfolgt über einen aktiven multispezifischen Transportweg als Mono- oder Diglukuronid (BOYER 1992). Eine Verlegung der Gallenwege oder Hämolyse kann zu einer verstärkten Ausscheidung der Abbauprodukte von Bilirubin, Urobilin und Urobilinogen über die Nieren führen.

Bilirubin wurde früher lediglich als Abfallprodukt des HO-Stoffwechsels betrachtet. Stocker und Mitarbeiter beschrieben 1987 eine wichtige biologische Funktion von Bilirubin als Antioxidans. Bilirubin ist dabei ein sehr effektives Antioxidans in Zellmembranen, ähnlich dem Vitamin E. Biliverdin besitzt ebenfalls antioxidative Eigenschaften, die antioxidative Wirkung ist allerdings deutlich schwächer als die des Bilirubins (STOCKER 1987).

2.5.3.2 Bedeutung von Eisen im Organismus

Der menschliche Organismus besitzt ca. 45 – 60 mg/kg Körpergewicht (KG) Gesamteisen. Über 65% sind gebunden an Histidin im Hämoglobin enthalten, ca. 5% im Myoglobin, 20% liegen gespeichert in Ferritin vor. Etwa 2% des Eisens liegen in Enzymen gebunden vor. Diese Enzyme zeigen eine Interaktion mit molekularem Sauerstoff (z.B. Hydroxylasen, Cytochrome, NO-Synthetasen) oder Wasserstoffperoxiden (Peroxidasen, Katalasen). Ca. 10% des Eisens sind nicht im Porphyringerüst, sondern direkt an eine Peptidkette gebunden (LÖFFLER 2000).

Transferrin ist das Transportprotein, welches Eisen im Blutplasma transportiert. Darüber hinaus besitzt Transferrin auch die Aufgabe, das Gewebe als Puffer vor den toxischen und oxidierenden Eigenschaften freier Eisenionen zu schützen. Eine Ausscheidung von Eisen im Urin wird durch die Bindung ebenfalls verhindert.

Im Gewebe liegt das Eisen nun in Form von Hämosiderin beziehungsweise Ferritin als Speichereisen vor. Hämeisen, welches in eine Zelle aufgenommen wird, wird durch HO aus dem Porphyringerüst herausgelöst und als Ferritin gespeichert. Sind die Ferritinspeicher gefüllt, erfolgt eine Speicherung als Hämosiderin. Die Freisetzung erfolgt durch das Enzym Ferritinreduktase. Freigesetztes zweiwertiges Eisen kann in einer

spontanen Reaktion zu dreiwertigem Eisen oxidieren. Diese Reaktion wird durch die Ferrioxidase-I katalysiert. Eisen greift modulierend über ein Protein in die Translation von Ferritin und Delta-Aminolävulinat-Synthase, einem Enzym der Hämsynthese ein. Bei einem niedrigen intrazellulären Eisengehalt wird die Translation des Transferrinrezeptors verstärkt. Folglich kann die Zelle die Aufnahme von Eisen beschleunigen. Im Gegensatz dazu wird die Translation von Ferritin und Delta-Aminolävulinat-Synthase supprimiert. Nach adäquatem Anstieg des intrazellulären Eisens wird die Translation über ein Protein gehemmt und so aufgenommenes Eisen kann zum einen den Eisenspeichern und zum anderen der Hämsynthese zugeführt werden (LÖFFLER 2000).

2.5.3.3 Bedeutung von Kohlenmonoxid

Mit der Entdeckung des HO-Stoffwechsels durch Tenhunen 1968 wurde die endogene Bildung von CO im katalytischen Prozess des Hämabbaus beschrieben. Hierdurch entstehen ca. 85% des körpereigenen CO, die restlichen 15% fallen beim Proteinabbau oder bakteriellen Stoffwechselfvorgängen an (aktuelle Übersicht in HOETZEL 2006). CO kann sich an die Bindungsstelle für Sauerstoff (O_2) im Hämoglobin- und Myoglobinmolekül anlagern. Dies führt zu einer kompetitiven Hemmung und die Anlagerung von O_2 -Molekülen ist unmöglich. Dies bedeutet umgekehrt, dass die Anbindung zwischen O_2 und Hämoglobin erschwert und durch eine Verschiebung der Sauerstoffdissoziationskurve nach links auch eine Abgabe von O_2 aus bereits bestehenden O_2 -Hämoglobinverbindungen ebenfalls verschlechtert wird. Unter physiologischen Bedingungen sind nur ca. 1% der Bindungsstellen mit CO besetzt (BRUENE 1987). CO, früher lediglich als toxisches Abfallprodukt des HO-Stoffwechsels bezeichnet, besitzt, wie Bilirubin, eine biologische Funktion. Es zählt zu einer Gruppe zellulärer Botenstoffe, ähnlich dem Stickstoffmonoxid (NO) (VERMA 1993). CO ist, vergleichbar mit NO, in der Lage, über die Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase die Konzentration von 3',5'-cGMP zu erhöhen. Ein Anstieg der Konzentration von cGMP führt zu einer Hemmung der Thrombozytenaggregation (BRUENE 1987, SUEMATSU 1995) und zu einer Relaxation der glatten Muskulatur (VEDERNIKOV 1989). Der cGMP-Anstieg führt zu einem Abfall der freien Kalzium (Ca^{2+})-Konzentration in glatten Muskelzellen, was eine Relaxierung der Muskelfasern zur Folge hat (NAKAMURA 1995). cGMP-abhängige vasoaktive Effekte von CO wurden in der Lunge (SYLVESTER 1978, CARDELL 1998) sowie in der Leber beschrieben (PANNEN 1998; SUEMATSU 1994), wo CO den portalvenösen Gefäßtonus in einem relaxierten Zustand aufrecht erhält (PANNEN 1998). Die Sinusoide der Leber werden infolge dieser Relaxation verstärkt

perfundiert (PANNEN 1998). Blockade des HO-Stoffwechsels und damit der Bildung endogenen CO mit dem kompetitiven Hemmstoff SnPP-IX, welches ein falsches Substrat der HO darstellt, führte zu einem Anstieg des portalen Strömungswiderstandes in der isolierten nicht mit Blut perfundierten Leber (SUEMATSU 1994). Der durch die HO-Blockade bedingte Anstieg des Pfortaderwiderstands wurde sowohl durch exogenes CO als auch durch den Zusatz eines cGMP-Analogen zum Perfusat verhindert (SUEMATSU 1994, 1995). *In vivo* führte die Blockade der HO mit SnPP-IX nach hämorrhagischem Schock mit konsekutiver Volumentherapie zu einem signifikanten anhaltenden Anstieg des Pfortaderwiderstands und –drucks. Bei Kontrolltieren zeigte sich lediglich ein schwacher vorübergehender Effekt. CO könnte somit über einen vasodilatorischen Effekt an der Aufrechterhaltung einer ausreichenden O₂-Versorgung unter hypoxischen Bedingungen beitragen (BAUER 1996).

2.5.4 Regulation der Hämoxxygenase-1-Genexpression

Bis heute sind die oben beschriebenen drei Isoformen der HO identifiziert worden, die Isoformen HO-2 und HO-1 koordinieren dabei den Abbau von Häm im zellulären Metabolismus.

Die Exprimierung von Genen findet nach Aktivierung durch Transkriptionsfaktoren statt. Dies sind spezifische Proteine, welche an bestimmten Initiationsstellen („TATA Box“ = englisch „box binding protein“) der DNA eine Aktivierung auslösen. Dieser „Initiationskomplex“ ist für eine korrekte Anbindung der Polymerase an der „Startstelle“ der Transkription verantwortlich. Diese vermitteln der Polymerase nun, welche spezifischen Gene aktiviert werden sollen. Spezifische Transkriptionsfaktoren kommen nur in den Zellen vor, in denen sich auch die jeweils zu regulierenden Gene befinden.

2.5.4.1 Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAP-Kinasen)

Im Ablauf und in der Regulation einer Vielzahl von zellulären Signalwegen spielen Proteinkinasen, Proteinphosphatasen und GTP-bindende Proteine eine wichtige Rolle. Besondere Bedeutung in diesem Zusammenhang besitzt die Gruppe der Serin/Threonin-Proteinkinasen, die sogenannten Mitogen-aktivierten-Proteinkinasen (MAP-Kinasen, MAPK), die kaskadenartig Signale von der Zelloberfläche bis zum Zellkern übertragen. Dabei laufen diese Vorgänge wie in einem engmaschigen Netzwerk ab (ARBABI 2002, CHANG 2001).

MAP-Kinasen werden zum einen durch Wachstumsfaktoren, sogenannte Mitogene, aktiviert. Zum anderen werden MAP-Kinasen durch eine Reihe anderer Stimuli aktiviert, die auch zur Induktion einer Transkription der HO-1 führen können. Zur Familie der MAP-Kinasen zählen im Wesentlichen drei Mitglieder, im Einzelnen die c-Jun-N-terminale Kinase (JNK), die p38 MAP-Kinase und die extracellular signal-regulated Kinase (ERK). Elbirt und Mitarbeiter zeigten, dass die Behandlung von Hepatomazellen mit Zytokinen, UV-Licht, Lipopolysaccharid, Hitzeschock sowie weiteren Induktoren eines oxidativen Stress eine Aktivierung verschiedener MAP-Kinasen zur Folge haben kann und die beobachtete HO-1-Induktion über die Aktivierung von ERK und p38 vermittelt wird (ELBIRT1998).

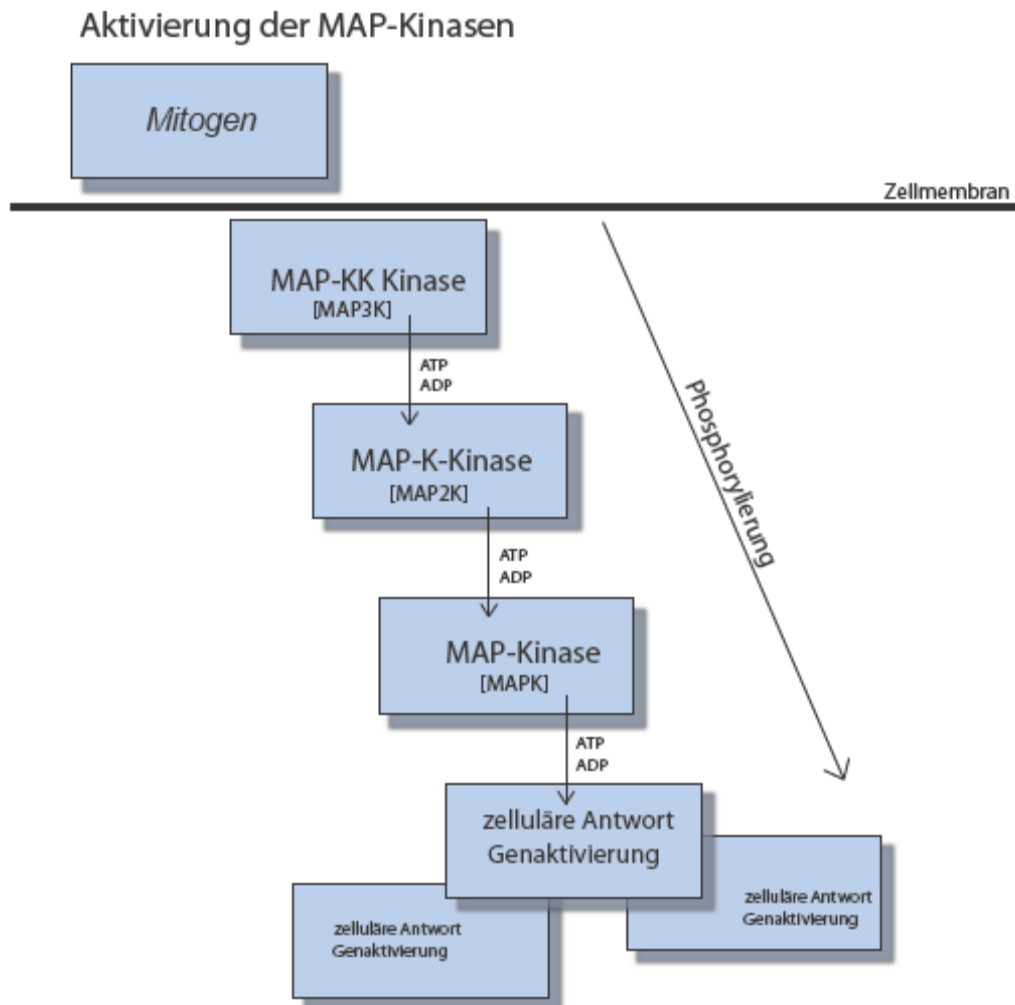


Abb. 3: Schematischer Ablauf der MAP Kinase-Phosphorylierungskaskade

Intrazellulär liegende Proteinkinase-Kaskaden verarbeiten Signale, die aufgrund von Rezeptoren, welche sich in der Plasmamembran befinden, registriert werden. Alle Ebenen der Kaskade sind aufgrund spezifischer Mechanismen regulierbar. MAP-Kinasen vermitteln die Signale entweder direkt über mögliche DNA-Interaktionen, indirekt durch Phosphorylierung weiterer Kinasen oder die Bindung von Transkriptionsfaktoren.

MAP-Kinasen werden durch Phosphorylierungsreaktionen, katalysiert durch den MAP-Kinase-Aktivator (MAP-Kinase-Kinase Abk.: MAPKK oder MKK) aktiviert. Hier findet eine Phosphorylierung an einem Tyrosin- und einem Threoninrest statt. Die oben genannte MAP-Kinase-Kinase wird wiederum durch die MAP-Kinase-Kinase-Kinase (MAPKKK oder MEKK) aktiviert. Am Beginn dieser Kaskade steht ein GTP-bindendes Protein, hier ist zum Beispiel ras oder Cdc42 zu nennen, welches die MAPKKK stimuliert. Nach Ablauf dieser Kaskade kommt es erneut durch Phosphorylierung von Proteinen zu einer

Signalübertragung. Eine Aufnahme in den Zellkern einzelner Zellen ist möglich und es können Proteine, die ebenfalls an der Genregulation beteiligt sind, aktiviert werden. Beispiel hierfür sind die Transkriptionsfaktoren der AP-1-Familie („Activator-Protein-1“), ein weiteres Beispiel ist die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (Nuclear factor- κ B), der eine wichtige Rolle in der Regulation der Immunantwort, Zellproliferation und Apoptose spielt. Die MAP-Kinase ERK spielt eine wichtige Rolle bei Signalkaskaden der Zelle, die der Zellentwicklung, dem Zellwachstum und der Zelldifferenzierung dienen (PEARSON 2001).

Im Zusammenhang mit der HO-1-Induktion unter oxidativen Stressbedingungen zeigten 2002 Zhang und Mitarbeiter in Endothelzellen der Ratte eine Aktivierung der HO-1 durch die MAP-Kinasen JNK, ERK und p38. In Hepatozyten von Ratten konnte ebenfalls eine Mitbeteiligung durch die MAP-Kinasen JNK und p38 werden (KIETZMANN 2003). Auch eine Aktivierung der HO-1 durch das Hormon „Atriales Natriuretisches Peptid“ (ANP), welches kardiovaskuläre Wirkungen vermittelt, erfolgt unter Wirkung der MAP-Kinasen ERK und JNK. Dieser Sachverhalt wurde darüberhinaus an menschlichen Endothelzellen nachgewiesen (KIEMER 2003).

2.6 Aktivierung und Regulation der Hämoxxygenase-1

Wie bereits oben beschrieben, wirken verschiedene innere und äußere Stressfaktoren regulierend auf die Aktivität der HO-1. Diese Regulation durch äußere Einflüsse erfolgt über verschiedene zelluläre Signalwege und Transkriptionsfaktoren. Einige der wichtigsten Transkriptionsfaktoren, die unter Stressbedingungen aktiviert werden, sind der Hitzeschockfaktor NF- κ B, Nrf2 (nuclear factor-erythroid 2-related factor 2) und AP-1. Die Regulation der HO-1 unterliegt dabei nicht primär einem einzelnen Transkriptionsfaktor. Hier liegt wie bei allen Prozessen auf Ebene der zellulären Signalkaskaden, eine Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren unter unterschiedlichen Bedingungen vor. Bis dato sind nicht alle Faktoren bekannt, die Einfluss nehmen auf die spezifische Aktivierung des HO-1-Gens (ALAM 2007).

Am HO-1-Gen existieren zwei sogenannte distale 5'-Enhancer-Regionen. Ausgehend von diesen beiden Punkten erfolgt der Start der Transkription nach Kontakt mit Substanzen, z.B. Lipopolysaccharid (LPS) oder Häm, welche oxidative Stresszustände auslösen. An diesen Enhancer-Regionen der HO-1-Promotor-Region befinden sich Bindungsstellen verschiedener Transkriptionsfaktoren. Hierzu zählen beispielsweise

Faktoren der AP-1-Familie, z.B. c-Jun und c-Fos, darüber hinaus AP-2 und NF- κ B (CHOI 1996).

Transkriptionsfaktoren der AP-1-Familie gehören wie Nrf2 zur Gruppe der Leuzinzipper-Proteine. AP-1 ist ein Sammelbegriff für dimerische Transkriptionsfaktoren, hierzu gehören Fos- und Jun-Proteine, diese Proteine bezeichnet man auch als „immediate early response“-Gene. Eine Aktivierung der Transkription ereignet sich aufgrund von zellulären Stressereignissen (BEBIEN 2003). Allerdings ist noch nicht eindeutig geklärt, welche weiteren Transkriptionsfaktoren, z.B. Nrf2, neben AP-1 an genau welchen Bindungsstellen angreifen oder ob dies auch zeitgleich geschehen kann (ALAM 2007). Zur Aktivierung von HO-1 in Abhängigkeit der AP-1-Proteinfamilie liegt bereits eine Reihe von Untersuchungen vor. 2003 zeigten Kiemer und Mitarbeiter, dass eine Hemmung von AP-1 durch ANP in menschlichen Endothelzellen zu einer Suppression der HO-1-Genexpression führt. Lee und Mitarbeiter untersuchten 2000 eine LPS- und Hypoxie-abhängige HO-1-Exprimierung in Makrophagen in Abhängigkeit von AP-1. In hämorrhagischen Schockmodellen mit anschließender Volumentherapie wurde eine Aktivierung von AP-1 und NF- κ B gezeigt (YOSHIDOME 1999, ZWACKA 1998, RENSING 2001).

Beim Transkriptionsfaktor NF- κ B handelt es sich ebenfalls um ein dimerisches Protein. Dieses setzt sich aus Eiweißen der Rel-Familie zusammen (c-Rel, RelB, p50, p65, p52). Bei inflammatorischen Prozessen wird vor allem durch p50 und p65 die Transkription von Genen aktiviert, die eine Rolle in unterschiedlichen Signalkaskaden und Entzündungsbedingungen spielen, dazu zählen beispielsweise TNF- α oder ICAM-1. Oxidativer Stress bzw. Endotoxine können so auch über die Aktivierung von NF- κ B die HO-1-Genexpression induzieren (KURATA 1996, LAVROSKY 2000). NF- κ B liegt im Zytosol nicht stimulierter Zellen gebunden an den Inhibitionsfaktor- κ B (I κ B) vor. Eine Aktivierung von NF- κ B erfolgt, indem extrazelluläre Stimulationsfaktoren (z.B. Endotoxine) eine Phosphorylierung von I κ B bewirken, dies führt dann zu einer Aufhebung der Bindung zwischen NF- κ B und I κ B. Anschließend erfolgt der proteolytische Abbau von I κ B. Dies bewirkt die nukleäre Translokation von NF- κ B und nachfolgende Aktivierung der Zielgene (LÖFFLER 1998, ZWACKA 1998, THANOS 1995). NF- κ B Transkriptionsfaktoren werden aus Homo- oder Heterodimeren von Mitgliedern der Rel-Familie generiert. Das p65-p50 Heterodimer wurde als erstes charakterisiert, es ist am besten untersucht, generell der am häufigsten vorkommende Aktivator und wird daher

häufig als Synonym für „NF-κB“ bezeichnet. Die beiden Untereinheiten können die Regulatorsequenz an der DNA erkennen und somit Transkriptionsvorgänge einleiten. Der Transkriptionsfaktor Nrf2 gehört zur Gruppe der CNC-bZIP-Proteine und ist wie AP-1 ein Proteindimer mit der besonderen Eigenschaft, an der DNA Leuzinzipper-Strukturen ausbilden zu können. In seiner inaktiven Form liegt es im Zytosol gebunden an das Hemmprotein KEAP1 vor. ITOH zeigte hier 1999, dass möglicherweise Cysteinreste in dem Komplex aus Nrf2 und KEAP1 als Regulationsschaltung dienen, die unter oxidativem Stress eine Aufhebung des Komplexes ermöglichen und so Nrf2 vermittelte Transkriptionsvorgänge im Zellkern ausgelöst werden können. ALAM zeigte eine Beteiligung von Nrf2 an der HO-1-Expriemierung in Mäusezellen, wenn als auslösender Stressfaktor Cadmium eingesetzt wird (ALAM 1999). HO-1-Substratanaloga führten ebenfalls zu einer Transkription von HO-1 durch Stabilisierung von Nrf2 (ALAM 2003). Eine Induktion der HO-1-Genexpression und Steigerung der Aktivität kann durch verschiedene Substanzen bzw. Veränderungen der Homöostase ausgelöst werden. Nicht nur das Substrat Häm, sondern auch beispielsweise Faktoren wie Zytokine, Prostaglandine, Schwermetalle, Hyperthermie, I/R und Endotoxine können zu einer Induktion der HO-1-Genexpression führen (MAINES 1997, Übersicht in BAUER M und BAUER I 2002, RYTER 2006).

2.7 Leber und Apoptose

2.7.1 Allgemeine Grundlagen

Die Apoptose, entwicklungsgeschichtlich auch als „programmierter Zelltod“ bezeichnet, ist ein unabdingbarer Mechanismus in der Physiologie einer jeden Zelle und dient dazu, funktionslose oder fehlentwickelte Zellen, die eine potentielle Gefahr für die Homöostase des Organismus darstellen, zu entfernen (JACOBSON 1997, NICHOLSON 2000). Erste Hinweise auf apoptotische Vorgänge in der Leber wurden bereits 1965 gefunden, wo in postischämischen Hepatozyten Strukturen entdeckt wurden, die erst Jahre später mit Hilfe des Elektronenmikroskopes entschlüsselt werden konnten. Aus diesen Erkenntnissen wurde 1972 der Begriff Apoptose definiert (KERR 1965, KERR 1972).

Die Apoptose als „programmierter Zelltod“ unterscheidet sich grundlegend von der Nekrose in mehreren Punkten. Auslöser für den nekrotischen Zelluntergang aufgrund nicht-zellulärer Mechanismen sind traumatische Gewebsverletzungen oder der Kontakt mit unphysiologischen Noxen. Beispiele hierfür sind Thrombosen oder ischämische

Ereignisse (HAUNSTETTER 1998). Eine Nekrose ist charakterisiert durch Schwellungen im Zytoplasma und der Zellorganellen, bis es schließlich zur Lyse und Ruptur der Zellmembran kommt. Als Folge entleert sich intrazelluläres Material der Zelle in den Extrazellulärraum. Dieser Vorgang wiederum führt zur Auslösung einer Entzündungsreaktion, die mit einer Aktivierung des Immunsystems und immunkompetenter Zellen einhergeht. Darüber hinaus kann es durch diese Auslösung einer Immunantwort zu einer Schädigung benachbarter Zellen des vom Vorgang der Nekrose betroffenen Organs kommen.

Läuft der Vorgang der Apoptose ab, führt dies zu einer Schrumpfung der Zelle und des Zellkernes. Ebenso kann eine Bläschenbildung entlang der zellulären Membran sowie eine Chromatinkondensation der Kernmembran nachgewiesen werden. Weiterhin können dann charakteristische DNA-Fragmentmuster entstehen, die aus einer kontrollierten intrinsischen Spaltung der DNA aus dem Genom hervorgehen.

Schließlich kommt es zur Ausbildung von Apoptosekörperchen (sog. „Apoptotic bodies“). Diese sind durch zellinterne Abschnürungsvorgänge von einer völlig intakten Zellmembran umgeben und können dann im Gesamten von phagozytosefähigen Zellen (Makrophagen, Phagozyten) resorbiert werden. Eine inflammatorische Begleitreaktion bleibt aufgrund der fehlenden Ausschüttung des Zellinhaltes der zerstörten Zelle, wie bei der Nekrose beschrieben, aus. Zellmorphologisch können apoptotisch veränderte Zellen innerhalb eines Zellverbandes ein disseminiertes Verteilungsmuster zeigen. Nekrotisch veränderte Zellen liegen dagegen in akkumulierten Verbänden vor (KERR 1972).

2.7.1.1 Rolle der Caspasen

Die wesentlichen Enzyme, die im kaskadenartigen Ablauf und der Regulation der Apoptose eine Rolle spielen, sind Caspasen.

Caspasen gehören in die Gruppe der Proteasen, die als aktives Zentrum die Aminosäure Cystein besitzen und ihre Substrate spezifisch an Aspartatresten spalten (Cystein-Aspartat-Proteasen). Aktivierte Caspasen lösen eine Signalkaskade aus, an deren Ende der endgültige apoptotische Abbau der Zelle steht. Es existieren 11 unterschiedliche spezifische Caspasen, von diesen sind 7 maßgeblich am Ablauf der Apoptose beteiligt (EARNSHAW 1999, DEGTEREV 2003). Die Caspasen sind in verschiedenen Signalkaskaden angeordnet. In ihrer inaktiven Form liegen sie als Vorläuferproteine vor. Diese bestehen aus zwei unterschiedlichen Untereinheiten (sog. Pro-Caspasen) und werden nach Apoptoseinduktion durch proteolytische Spaltung aktiviert. In diesem

Zusammenhang hervorzuheben sind die Caspase-3 und Caspase-8 als zentrale Katalysatoren der Apoptose (GAMEN 1997) (s. Abb. 4).

2.7.1.2 Auslösung der Apoptose

Der biochemische Prozess der Apoptose wird aktiv und autonom durchgeführt und die betroffenen zellulären Strukturen gehen lokal streng begrenzt zugrunde. Die Vermittlung dieses Vorganges erfolgt im Wesentlichen durch zwei Reaktionswege, zum einen durch einen extrinsischen (Todesrezeptor: „death receptor“) und zum anderen durch einen intrinsischen (mitochondrialer Weg) Signalauslöser (HENGARTER 2000).

2.7.2 Apoptosevorgang in der Leber

Wie oben erwähnt, wurden erste Hinweise auf einen programmierten Zelltod im Sinne einer gemeinsamen Endstrecke nach Ablauf und Aktivierung verschiedener zellulärer Signalkaskaden bereits 1965 in ischämischen Leberzellen der Ratte gefunden (KERR 1965).

Die Interaktion Apoptose-spezifischer Liganden mit bestimmten Rezeptortypen auf der Zelloberfläche der Zielzelle stellt einen bedeutenden Aktivierungsmechanismus der Apoptose dar. Wichtige Systeme stellen hierbei die Zytokine Fas-Ligand (CD95, APO-1) und TNF- α sowie die entsprechenden Rezeptoren dar, die zur Auslösung der Kaskaden vorhanden sein müssen (KRAMMER 2000).

Die Apoptose in der Leber, insbesondere nach einem I/R-Ereignis, scheint im Wesentlichen über zwei Wege ausgelöst zu werden:

1. Die Aktivierung des „death-Rezeptors“ führt dazu, dass aus der pro-Caspase-8 die aktivierte Form der Caspase-8 gebildet wird; diese wiederum führt zur Aktivierung der Caspase-3.
2. Die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien durch ein sogenanntes Apoptosom führt ebenfalls zu einer Caspase-3 Aktivierung.

Als gemeinsame Endstrecke bewirkt die Caspase-3 eine Fragmentbildung der DNA, die dann letztendlich zum Tod der Zelle führt (JAESCHKE 2003).

Induktion und Entwicklung der Apoptose in der Leber spielen bei verschiedenen Erkrankungen und Stressreaktionen des Organs eine wichtige pathophysiologische Rolle. Wie in allen anderen Organen wird auch in der Leber der Vorgang der Apoptose

durch anti-apoptotische und pro-apoptotische Faktoren beeinflusst. Hier spielt z.B. das Protein Bcl-2 (B cell lymphoma-2) als ein Vertreter anti-apoptotischer Proteine eine wichtige Rolle (s. Abb. 4). Bcl-2 kann die Freisetzung von Cytochrom c verhindern und so den weiteren Apoptosevorgang stoppen (YANG 1997). Das Protein BAX, welches eine pro-apoptotische Wirkung vermittelt, greift ebenfalls am Mitochondrium in den Zyklus ein und vermittelt so den weiteren Verlauf der Apoptose. Solange BAX und Bcl-2 im Gleichgewicht stehen, können diese sich zum Teil gegenseitig inhibieren und eine Regulierung der Apoptosesignalwege bewirken (MIYAHITA 1995).

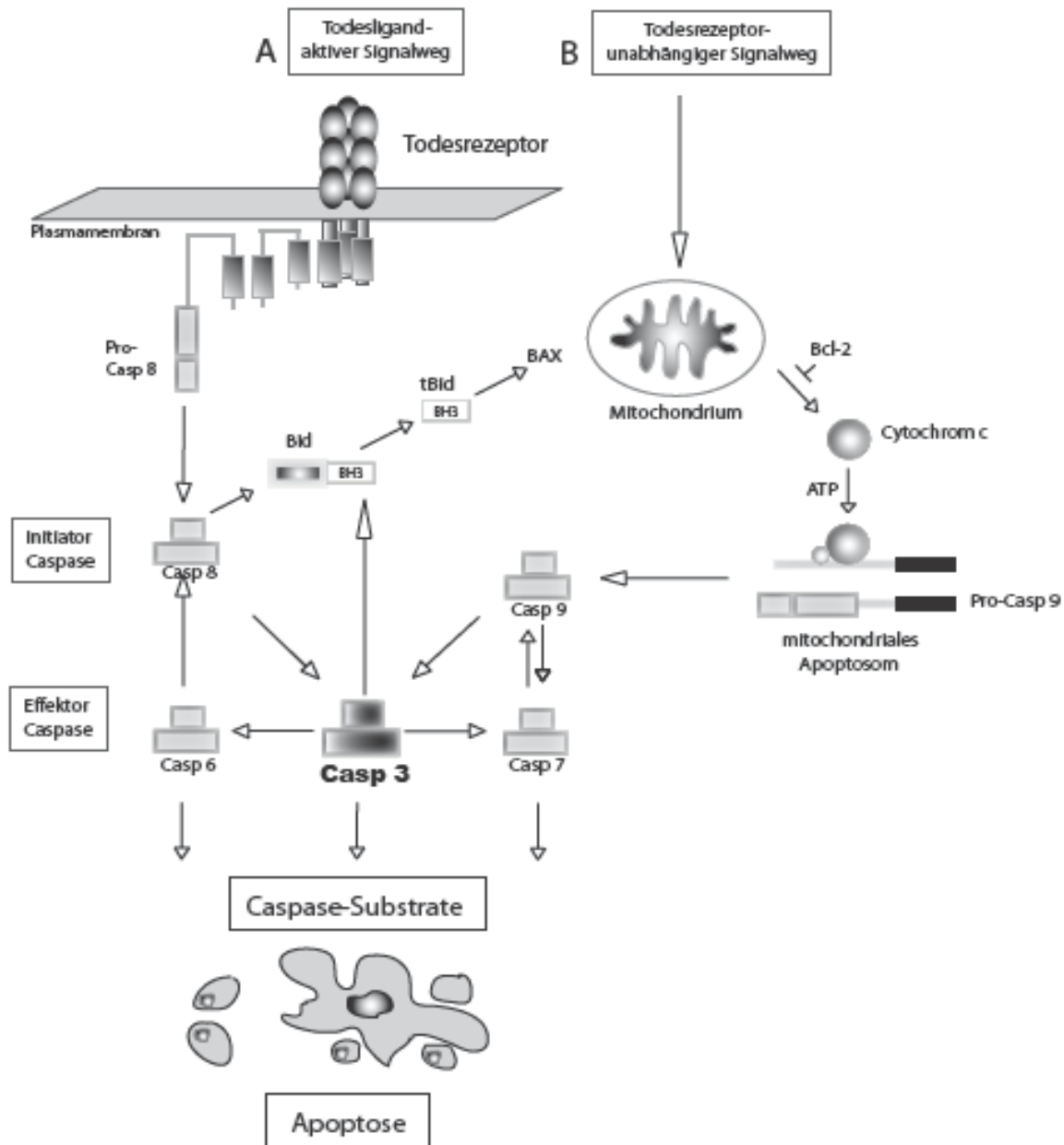


Abb. 4: Apoptosekaskade

Apoptosekaskade als Signalweg modifiziert nach Shi 2004, BAX wirkt als pro-apoptotisches Protein, während Bcl-2 als inhibitorisches Protein in der Kaskade wirkt.

Untersuchungen unter Bedingungen der I/R zeigen, dass sowohl der Vorgang der Nekrose als auch der Vorgang der Apoptose in den perizentralen Regionen der Leber zu finden ist. Die Dauer der Ischämie und Hypoxie des Organes hat für das Ausmaß des Leberzellschadens entscheidenden Einfluss. Hier konnte weiterhin gezeigt werden, dass kürzere Phasen der Ischämie (eine Stunde) mit konsequenter Volumentherapie (zwei

Stunden) mit Aufhebung der Ischämiephase zu einem verstärkten Nachweis perizentral gelegener apoptotischer Areale führen, im Gegensatz zu drei-stündigen Ischämiephasen ohne anschließende Reperfusion, die vorwiegend zu einem nekrotischen Zellschaden führen. Auch gibt es Hinweise, dass eine Vorbehandlung der Leber mit antioxidativ wirkenden Stoffen im Sinne einer Präkonditionierung des Organes, die Apoptoserate gegenüber der Nekroserate erhöhen. Unter den Bedingungen der I/R mit adäquater Volumensubstitution zeigt sich auch eine verstärkte Aktivierung der HO-1 in Hepatozyten. Die Stoffwechselprodukte, die im HO-1-Stoffwechselweg anfallen, wie beispielsweise CO und Bilirubin, wirken zytoprotektiv und antiapoptotisch. Die Frage, ob nun eine Induktion von HO-1 einen pro- oder antiapoptotischen Effekt bewirkt, ist abschließend noch nicht geklärt (RENSING 1999, JAESCHKE 2003, PAXIAN 2003).

2.8 Messung differentieller Genexpression mittels Mikroarray-Technologie

Wie oben erwähnt, führt ein hämorrhagischer Schock mit suffizienter Volumentherapie zu einer Induktion der HO-1-Genexpression in verschiedenen Organen wie auch der Leber (BAUER 1997, BAUER 1998).

Traditionelle Methoden zur Messung differentieller Genexpression (z.B. Northern Blot-Analyse, Reverse Transkription-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)) bezogen sich bis dato auf die Untersuchung einzelner Gene. Dies hatte zur Konsequenz, dass pro Experiment nur eine begrenzte Anzahl von Genen analysiert werden konnte. Ein Gesamtbild der zellulären Genexpression konnte folglich unter diesen Bedingungen nicht erstellt werden. Die Untersuchung der differentiellen Genexpression der gesamten Gene einzelner Zellen ist aber von Interesse, um zu wissen, welche einzelnen Gene in Zellen unter bestimmten Bedingungen, wie z.B. bei hämorrhagischem Schock, aktiv und welche inaktiv sind. Weiterhin können auch Veränderungen in der Genexpression z.B. nach pharmakologischer Hemmung der HO-Aktivität untersucht werden. Aktive Gene zeigen hohe Konzentrationen an RNA, inaktive oder nichtexprimierte Gene eine geringe oder keine RNA-Konzentration. Mit der Entwicklung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zu Beginn der neunziger Jahre gelang es schließlich unter Laborbedingungen, komplementäre DNA herzustellen. Diese Technik wiederum ist die Grundlage, um beliebig oft RNA zu produzieren. Weiterhin ermöglicht dieses Verfahren, selbst kleinste Mengen RNA nachzuweisen, was sich die Wissenschaft auch im alltäglichen klinischen Gebrauch zunutze macht. Der laborchemische Nachweis bzw. der Grad der Infektiosität

einer Hepatitis-C-Infektion beispielsweise können mit Hilfe der PCR sehr einfach und schnell bestimmt werden, so dass diese Nachweisteknik in der molekularen Diagnostik dieser Erkrankung eine weite Verbreitung erfahren hat.

Eine als Mikroarray-Analyse bezeichnete Technik bietet hier erneut deutliche Vorteile. Diese wurde Mitte der neunziger Jahre entwickelt und ermöglicht gegenüber den oben beschriebenen Methoden die simultane Messung der Expression von einigen Hundert über mehrere Tausend Gene bis zum gesamten Genom (SCHENA 1995). Seit 2005 gibt es einen speziellen Mikroarray, der auf der Totalsequenzierung des Rattengenoms beruht und eine Entwicklung aus der Entschlüsselung des Genoms durch Gibbs darstellt (GIBBS 2004). Ein weiterer Fortschritt bedeutet die Untersuchung genomischer Unterschiede, um Veränderungen im Genomaterial aufspüren zu können. Diese Methode erlaubt es z.B., häufig auftretende Deletionen und Duplikationen in entarteten Tumorzellen aufzuspüren (BARRET 2004).

2.8.1 Allgemeine Grundlagen der Mikroarray-Technologie

1975 entdeckte Southern bereits, dass immobilisierte einzelsträngige DNA mit einer komplementären Sequenz hybridisiert werden kann (SOUTHERN 1975).

Bei der von ihm entwickelten und nach ihm benannten Methode, der "Southern Blot-Analyse", wird die zu untersuchende DNA auf einer Membran immobilisiert und mit einer markierten Sonde hybridisiert (MORADPOUR 1999). Grundlage der Mikroarray-Technologie ist eine, auf komplementärer Basenpaarung beruhende, spezifische Hybridisierung einzelsträngiger DNA- oder RNA-Moleküle zu einem Doppelstrang. Diese Arrays sind entweder Membranen aus Nylongewebe oder Glasobjektträger, die mit tausenden verschiedenen Genen bestückt sind und für unterschiedlichste Gene kodieren. Diese spezifischen Gensonden sind einzelsträngige DNA-Moleküle mit einer bereits bekannten Sequenz. Aus dem zu untersuchenden Gewebe wird die RNA isoliert und mit Hilfe der reversen Transkription in komplementäre DNA umgeschrieben, die entweder radioaktiv oder mit fluoreszenzfähigen Farbstoffen markiert ist. Die so markierten Proben werden mit dem Array hybridisiert. Die Grundlage der parallelen Feststellung von globalen Genexpressionsmustern und die Identifizierung von Genpolymorphismen beruht auf der Möglichkeit, dass mehrere tausend detektierte und hybridisierte Proben auf kleinster Fläche analysiert werden können.

2.8.2 Genanalyse

Das Genom des Menschen besteht in seinem molekularen Aufbau aus DNA, dieser Code besitzt die Information für mehr als 100.000 verschiedene Gene. Der erste entscheidende Schritt bei der Kodierung der Informationen wird als Transkription bezeichnet und hierbei wird von der DNA eine komplementäre RNA erstellt. Durch spezielle Umbauvorgänge, dem sogenannten „Splicing“, wird eine messenger-RNA (mRNA, Boten RNA) hergestellt. Im nun folgenden Schritt, der Translation, dient die mRNA als Vorlage für die zu exprimierenden Proteine. Die mRNA kann isoliert und mit Hilfe einer reversen Transkriptase in komplementäre DNA umgeschrieben werden. Macht man sich nun die rekombinante DNA-Technologie zunutze, so ist es möglich, die komplementären DNA-Stücke in Plasmide einzubauen und zu klonieren. Häufigstes Bakterium, welches zur Amplifizierung eingesetzt wird, ist *Escherichia coli* (E. coli). Diese so markierten komplementären DNA-Fragmente nutzt man als Basis zur Identifikation neuer Gene. Dabei ist von besonderem Interesse, welche Gene in Zellen aktiv und exprimiert sind, somit hohe Konzentrationen an RNA nachweisbar sind bzw. welche inaktiv sind.

Die verwendeten Mikroarray-Technologien unterscheiden sich in der Art, der Anzahl und der Größe der einzelnen aufgetragenen Genfragmente. Es findet sich daneben auch ein Unterschied in den unterschiedlichen chemischen Eigenschaften der reaktiven Gruppen, mit denen die DNA auf dem Array fixiert wird, weiterhin gibt es unterschiedliche Detektions- und Hybridisierungsverfahren.

2.8.3 Anwendungen

Das oben beschriebene Verfahren der Mikroarray-Technologie ist als ein aufstrebendes Verfahren zu bezeichnen, diese Tatsache lässt sich auch an steigenden Publikationszahlen festmachen. Eine Internet Recherche in der wissenschaftlichen Datenbank Pubmed (www.pubmed.com) ergab für den Zeitraum Januar 2008 bis Januar 2009 unter dem eingegebenen Stichwort „Mikroarray“ 5399 Veröffentlichungen. Ein Großteil dieser Publikationen beschäftigt sich mit der Entwicklung und dem Fortschritt der Technologie.

Daneben wurden durch die Genexpressionsanalyse wichtige zellbiologische Zusammenhänge in pathologischen Zellen, insbesondere auch Tumorzellen, entdeckt.

Beispiele für solche Anwendungen sind in der Literatur zu finden. AHRENDT und Mitarbeiter führten 1999 eine Screeninguntersuchung für Mutationen im p53-Gen in

primären Lungenkrebszellen durch. WEN und Mitarbeiter untersuchten 2000 ebenfalls die Expression des p53-Gens in Ovarialtumoren.

Bei vergleichenden Expressionsstudien wird die mRNA-Expression sowohl in der Zellkultur als auch im Gewebe untersucht. Diese Mikroarrays sind für verschiedene Bakterien (z.B. E. coli) aber auch Säugetiere (z.B. Maus, Ratte, Mensch) käuflich zu erwerben. Neben Arrays, die eine Untersuchung des gesamten Genoms ermöglichen, werden zunehmend Arrays mit einer kleineren Anzahl an Genfragmenten für spezifische Fragestellungen eingesetzt. So wurden z.B. Zellkulturen im Hinblick auf unterschiedliche Genexpressionsmuster während der malignen Entartung von Ovarzellen in Zellkulturen (WANG 1999) und entarteten Zellen des Kolons analysiert (ALON 1999). Weiterhin werden zunehmend Arrays eingesetzt, die Untersuchungen einer gewebespezifischen, z.B. leberspezifischen, Genexpression erlauben. Auch der in der hier vorliegenden Studie verwendete cDNA-Mikroarray (Atlas „rat Toxicology Array“) erlaubt lediglich die Analyse eines gewissen Ausschnitts des gesamten Genoms.

2.9 Ziele/Fragestellung

Ziele der vorliegenden Studie waren:

1. Die Charakterisierung der zeitlichen und zelltypspezifischen Expressionsmuster sowie der funktionellen Bedeutung der HO-1 in der Leber nach hämorrhagischem Schock.
2. Die Untersuchung der differentiellen hepatischen Genexpression nach Blockade des HO-Stoffwechsels nach hämorrhagischem Schock.
3. Die weitere Charakterisierung an der Apoptose beteiligter Gene in der Leber unter Blockade des HO-Stoffwechsels nach hämorrhagischem Schock.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien

Die Chemikalien wurden, wenn nicht speziell angegeben, von der Firma Roth (Firmensitz: Karlsruhe, Deutschland) bzw. der Firma Sigma (Firmensitz: Deisenhofen, Deutschland) bezogen. Diese waren jeweils von der höchsten erhältlichen Reinheit.

3.2 Tierexperimentelles Protokoll: Präoperative Phase und operative Phase

Die Versuchstiere, welche zur Durchführung der Versuche benutzt wurden, waren männliche Sprague Dawley Ratten (Charles River, Sulzfeld, Deutschland). Das Gewicht variierte zwischen 250 und 350 Gramm. Die präoperative Phase begann mit einer Nahrungskarenz ab dem Vorabend, wobei die Tiere über Nacht freien Zugang zu Wasser hatten. Die Versuche wurden ausnahmslos am Vormittag durchgeführt, um eine tageszeitlich bedingte Schwankung des Stoffwechsels und der hormonellen Homöostase zu vermeiden. Die Versuchstiere mussten ein physiologisches Fress- und Putzverhalten zeigen, Anzeichen von Erkrankungen führten zum Ausschluss aus der Versuchsreihe. Die Narkose wurde mit einer intraperitonealen Injektion mit dem Barbiturat Pentobarbital-Natrium (Dosierung 50 mg/kg) durchgeführt. Operativ erfolgte nach der Rasur zwischen der Mandibula und dem Manubrium sterni ein medianer Hautschnitt. Nach Freipräparation der Trachea und einer Inzision zwischen zwei Knorpelstangen wurde, anschließend ein Plastiktubus eingeführt und fixiert. Im weiteren wurde die Arteria carotis communis sinistra unter Schonung des benachbart verlaufenden Nervus vagus, zwischen Musculus sternocleidomastoideus und infrahyaler Muskulatur, dargestellt und aufgespannt. Es erfolgte distal eine Ligatur der Arterie und proximal das Aufsetzen einer mikrochirurgischen Gefäßklemme. Nach Inzision des Gefäßes mit einer mikrochirurgischen Schere wurde eine Thermistorsonde (9490 E, Columbus Instruments, OH) eingebracht, bis zur Aortenklappe vorgeschoben und fixiert. Die Messung des Herzzeitvolumens erfolgte mit der transpulmonalen Thermodilutionsmethode (Cardiotherm 500, Columbus Instruments, Columbus, Ohio). Über die rechte Vena jugularis wurde nach o.g. Procedere ein Zentralvenenverweilkatheter eingebracht. Der Basisbedarf wurde mit einer Ringerazetatlösung (10 ml/kg KG/h) während des Eingriffes gedeckt.

Blutentnahmen und kontinuierliche invasive Blutdruckmessungen (Hellige Servomed SMK 154-9, Freiburg) erfolgten per Kanülierung der linken Arteria femoralis.

3.3 Versuchsablauf

Die Phase der operativen Vorbereitung dauerte durchschnittlich zwischen 35 und 45 min. Anschließend schloss sich eine Ruhephase von 15 min an. In dieser Phase sollten stabile Kreislaufverhältnisse und eine suffiziente Spontanatmung erreicht werden. Eine Heizplatte gewährleistete eine konstante Temperatur von 37,5°C bei den Tieren.

Nach einer initialen Messung von Herzzeitvolumen (HZV), mittlerem arteriellem Blutdruck (MAD) und Blutgasen (BGA), wurde zur Induktion des hämorrhagischen Schocks eine Senkung des MAD durch rasche arterielle Blutentnahmen herbeigeführt. Der MAD wurde innerhalb einer Phase von 5 min auf Werte von 35 – 40 mmHg gesenkt. Der MAD wurde durch weitere fraktionierte Blutentnahmen für 60 min auf dem Niveau zwischen 35 und 45 mmHg konstant gehalten. Die Dokumentation der Vitalparameter erfolgte in 15-minütigen Abständen. Entnommenes Blut wurde mit einer Zitrat-Phosphat-Dextrose Lösung antikoaguliert (0,14 ml/ml Blut).

An diese 60-minütige Schockphase schloss sich eine Phase der Retransfusion mit 60% des zuvor entnommenen Blutvolumens an. Dieser Vorgang wurde innerhalb von 15 min der Retransfusion vollzogen. Zu Beginn der Volumentherapie wurden noch einmal eine HZV-Messung durchgeführt und eine BGA entnommen.

Innerhalb der ersten 60 min der Volumentherapie wurde eine Ringerazetatlösung infundiert. Das zugeführte Volumen entsprach dem initial doppelt entzogenen Blutvolumen. Während weiterer 60 min wurde ebenfalls Ringerazetat zugeführt, hier entsprechend dem initial entzogenen Blutvolumen. Daran schloss sich schließlich eine Ringerazetat-Infusion entsprechend dem Basisbedarf an. Diese blieb konstant bis zum Versuchsende.

Die scheinoperierten Kontrolltiere erhielten lediglich konstant 10 ml/kg KG Ringerazetatlösung zur Deckung des Basisbedarfs. Diesen Tieren wurde kein Blut entzogen und somit kein hämorrhagischer Schock induziert. Hier erfolgte die Dokumentation der Vitalparameter während der ersten 60 min viertelstündlich, in den zweiten 60 min zehn-minütlich, im Folgenden halbstündlich. Eine Messung des HZV erfolgte stündlich. Blutgasanalysen wurden am Anfang des Versuchs, sowie nach der ersten, zweiten, sechsten und zwölften Stunde durchgeführt.

Nach Durchführung des Protokolls wurde bei den Tieren eine Laparotomie durchgeführt, um die Leber zu entnehmen und direkt in flüssigen Stickstoff verbracht. Die weitere Aufbewahrung erfolgte bei -70°C.

3.4 Versuchsgruppen

3.4.1 Zeitlicher Verlauf und zelltypspezifische Expressionsmuster der HO-1-Genexpression – Untersuchung auf Proteinebene mit Western Blot-Analyse und Immunhistochemie

Die Untersuchung zum zeitlichen Verlauf und zu den zelltypspezifischen Expressionsmustern der HO-1-Genexpression lief nach folgendem zeitlichen Fenster ab:

- a) narkotisierten, unmanipulierten Kontrolltieren (n=2) wurde die Leber entnommen (Ausgangswerte = Kontrolle)
- b) narkotisierten, scheinoperierten Kontrolltieren (n=2) wurde die Leber jeweils nach sechs Stunden Versuchsbeginn entnommen – scheinoperierte Kontrolle sechs Stunden.
- c) Schockgruppe – hämorrhagischer Schock und Volumentherapie (n=2). Die Leber wurde jeweils sechs Stunden nach Beginn des Versuchs – (eine Stunde Schock–fünf Stunden Reperfusion) entnommen.

3.4.2 Funktionelle Bedeutung des HO - Stoffwechsels – Untersuchung des Leberschadens und der differentiellen hepatischen Genexpression

Die funktionelle Bedeutung der HO-1-Genexpression wurde durch Blockade des Stoffwechselweges mit SnPP-IX, einem Metalloporphyrin, durchgeführt. Diese Substanz wirkt als spezifischer Hemmstoff der Hämoxxygenase und greift somit inhibitorisch in diesen Stoffwechselweg ein. Die Applikation von SnPP-IX erfolgte sechs Stunden nach Versuchsbeginn, zu einem Zeitpunkt einer starken Induktion der HO-1-Proteinexpression in der Leber.

Sechs Stunden nach Beginn der Versuche erhielten die scheinoperierten Kontrolltiere:

- Vehikel (PBS = Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung); n=8

Tiere der Schockgruppe wurden mit nachfolgenden Substanzen behandelt:

- Vehikel (PBS); n=12 oder
- SnPP-IX (50µmol/kg KG); n=13

Der Leberschaden wurde zu den Zeitpunkten null, sechs, neun und zwölf Stunden nach Versuchsbeginn, also bis sechs Stunden nach Blockade des HO-Stoffwechsels, untersucht. Hierzu wurden zu den angegebenen Zeitpunkten Blutproben zur Bestimmung der α -GST Konzentration im Serum entnommen.

Die Charakterisierung der differentiellen hepatischen Genexpression wurde zum Zeitpunkt 12 Stunden nach dem Versuchsbeginn durchgeführt. Aus den mit Vehikel (PBS) bzw. mit SnPP-IX behandelten Tieren der beiden Schockgruppen wurde hierzu jeweils die RNA eines Versuchstieres (n=1) so aufgearbeitet, dass mit Hilfe eines cDNA Mikroarrays unterschiedliche Genexpressionsmuster untersucht werden konnten.

3.4.3 Nachweis von HO-1-Protein mit Western Blot-Analyse

Nach der Entnahme wurde das Lebergewebe sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -70°C nicht länger als 14 Tage gelagert.

Etwa 50mg Gewebe wurde im zehnfachen Volumen Zellysepuffer homogenisiert (10mM Tris pH 7,5, 10mM Natriumchlorid, 0,1mM EDTA, 0,5% Triton X 100, 0,02% Natriumazid, 2mM Phenylmethylsulfonylfluorid). Nach Abzentrifugieren der unlöslichen Bestandteile (10 min bei 18.000xg) 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 465nm nach 595nm verschoben wird. Als Referenz diente bovines Serumalbumin (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 (100 µg) pro Probe wurden durch SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) in 12% Tris-Glycin Gelen aufgetrennt. Als Elektrophoresepuffer fand ein denaturierender Puffer nach Lämmli Verwendung (25mM Tris, pH 8,3, 192mM Glycin, 0,1% SDS). Als positive Kontrollen für HO-1 diente gereinigtes rekombinantes HO-1-Protein aus der Ratte (StressGen Biotechnologies Corp., Sidney, BC, Canada). Die Gele wurden mittels Elektrophorese (12mM Tris Base, 96mM Glycin, pH 8,3) auf Polyvinylidendifluorid-Membranen geblottet (Westran, Schleicher+Schüll, Dassel) und die Membranen

anschließend bei 4 °C bis zur Antigendetektion für maximal 48 Stunden aufbewahrt. Eine Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur in 5% fettfreier Trockenmilch in Tween-haltiger Tris-gepufferter Kochsalzlösung (20mM Tris, pH 7,5, 0,5M 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 1:1.000) (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 1:10.000) 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 Chemilumineszenz (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.

3.4.4 Immunhistochemie

Immunhistochemische Untersuchungen zum Expressionsmuster von HO-1 wurden an immersionsfixierten, paraffinebetteten Schnitten (in neutral gepuffertem 10%-igem Formalin) durchgeführt. Nach Entparaffinieren mittels Xylen und Überführung der Schnitte über die absteigende Alkoholreihe in wässriges Milieu wurde die endogene Peroxidaseaktivität durch Inkubation in 3% Wasserstoffperoxid (H₂O₂) in Methanol geblockt. Die Schnitte wurden nach Vorbehandlung mit Ziegenerum zur Blockade unspezifischer Bindungsstellen mit einem primären polyklonalen Kaninchen anti-Ratte HO-1-Antikörper (Verdünnung 1:200, StessGen Biotechnologies Corp., Sydney, BC, Kanada) bei 37 °C für 60 min inkubiert. Die Immundetektion erfolgte mittels eines biotinylierten sekundären Ziege anti-Kaninchen Antikörpers und anschließender Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Komplex-Färbung. Als Chromogene dienten 3,3-Diaminobenzidin und 3% Nickelchlorid. Zur Verbesserung der morphologischen Beurteilbarkeit wurden die Schnitte mit Hämatoxylin gegengefärbt.

3.4.5 α -GST-Konzentration (im Serum)

Die hepatozelluläre Schädigung wurde laborchemisch mit der Bestimmung des Leberenzym α -GST gemessen. α -GST besitzt eine hohe Sensitivität in Bezug auf hepatozelluläre Schädigung und ist darüber hinaus über eine kurze Plasmahalbwertszeit charakterisiert. Die Bestimmung erfolgte zu vier Zeitpunkten, zu Beginn der Versuche, nach sechs, neun und zwölf Stunden. Hierzu wurden jeweils 0,5 ml arterielles Blut zur Serumgewinnung entnommen. Das entnommene Volumen wurde durch Ringerazetatlösung ersetzt. Die Konservierung des Serums erfolgte bei -70°C . Die Analyse der α -GST – Serumkonzentration wurde in 100 μl eines 1:50 verdünnten Serums durchgeführt. Hierfür stand ein käuflich erwerbbarer Anti-Ratten- α -GST-ELISA (HepkitTM-alpha, Biotrin international, Dublin, Irland) zur Verfügung.

3.4.6 Statistische Auswertung

Alle Werte sind als Mittelwerte unter der Berücksichtigung der Standardfehler (\pm S.E.M.) angegeben. Sämtliche Daten wurden statistisch ausgewertet nach ihrer Prüfung auf Normalverteilung (Kolmogorov-Smirnow-Test) und gleiche Varianz (Levene-Median-Test) mit einem Softwarepaket (SigmaStatTM, Jandel Scientific, San Rafael, CA, USA). Waren die Kriterien für parametrische Testung erfüllt, wurde der Vergleich von zwei Gruppen mit dem ungepaarten Student-t-Test verwandt. Sollten mehr als zwei Gruppen miteinander verglichen werden, wurde eine einfaktorische Varianzanalyse durchgeführt, danach schloss sich eine post-hoc Testung für multiple Vergleiche an. Hierfür wurde der Student-Newman-Keuls Test benutzt.

Sollten mehrere Zeitpunkte innerhalb der Gruppen verglichen werden, erfolgte dieses mittels Varianzanalyse für verbundene Stichproben, war eine Signifikanz vorhanden wurde dies mittels post-hoc Student-Newman-Keuls Test bestimmt.

Eine Signifikanz wurde bei den Tests angenommen, wenn ein $p < 0,05$ bestimmt werden konnte. Die bestimmten p-Werte sind zweiseitig.

3.4.7 Mikroarray

Zur Untersuchung der Unterschiede in der Genexpression mittels Mikroarray Technik wurde ein cDNA-Expressions Array der Firma Clontech verwandt: **AtlasTM rat Toxicology 1.2k-Array**. Hiermit kann die Expression von insgesamt 1176 Genen gleichzeitig untersucht werden, die für eine Vielzahl bekannter Onkogene, Tumor-Suppressor-Gene, Zell-Zyklus-Regulatoren, Transkriptionsfaktoren, Transportproteine,

Zellmembranrezeptoren und Wachstumsfaktoren kodieren. Hierzu wurden entnommene Proben der Leber folgender Tiere verwandt:

- a) Schock-Vehikel (n=1)
- b) Schock-SnPP-IX (n=1)

Der Entnahmezeitpunkt lag zwölf Stunden nach Versuchsbeginn: Nach einer Stunde Schock mit fünf Stunden Volumentherapie erhielten die Tiere Vehikel (PBS) oder SnPP-IX. Nach weiteren sechs Stunden erfolgte die Leberentnahme zur Isolierung der Ribonukleinsäure (RNA) zur Durchführung des Mikroarrays.

Die Isolierung und Aufreinigung der RNA, den DNase-Verdau und die Qualitätskontrolle der RNA sowie die Katalogisierung der differentiell exprimierten Gene habe ich durchgeführt. Die Synthese der radioaktiv markierten cDNA, die Hybridisierung, Detektion, Auswertung und Erstellung der Liste differentiell exprimierter Gene erfolgte durch die Firma BD Biosciences Clontech (Heidelberg).

3.4.7.1 Ribonukleinsäure (RNA)-Isolierung

Die Extraktion der Gesamt-RNA aus dem gewonnen Lebergewebe wurde mit Hilfe der Guanidinium-Phenol-Chloroform-Extraktionsmethode von Chomczynski und Sacchi durchgeführt (1987). Damit die gewonnene RNA im weiteren Versuchsablauf vor RNasen geschützt war, wurden in der Folge ausschließlich RNase-freie Lösungsmittel und Materialien benutzt.

Nach Homogenisieren des Lebergewebes in Guanidiniumisothiocyanat-Puffer (4M Guanidiniumisothiocyanat, 20mM Natriumcitrat, 0,5% N-Laurylsarkosin, 0,1M 2-Mercaptoethanol) erfolgte die Phenol-Chloroform-Extraktion (wassergesättigtes Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol = 250:49:1 Volumenanteile). Nach 30 min Inkubation auf Eis und Zentrifugieren (3000xg, 30 min) wurde die wässrige Phase abgenommen. Durch Zugabe von 70% Isopropylalkohol wurde die RNA bei -20°C gefällt. Nach einem anschließenden DNase-Verdau (s.u.) wurden Konzentration und Reinheit der RNA durch Messung der optischen Dichte bei 260 und 280nm bestimmt. Die RNA wurde zur Analyse der Integrität durch Gelelektrophorese aufgetrennt. Gleiche Mengen RNA (2 µg) wurden in Probenpuffer (50 % Formamid, 2,2M Formaldehyd, 50mM 3-(N-morpholino)propansulfonsäure (pH 7,0), 2,72 mg Saccharose, 34 µg Bromphenolblau,

0,55µg Ethidiumbromid) aufgelöst, bei 65°C für 30 min denaturiert und mittels Elektrophorese in einem 1,2%-igen Agarose-Formaldehyd-Gel aufgetrennt.

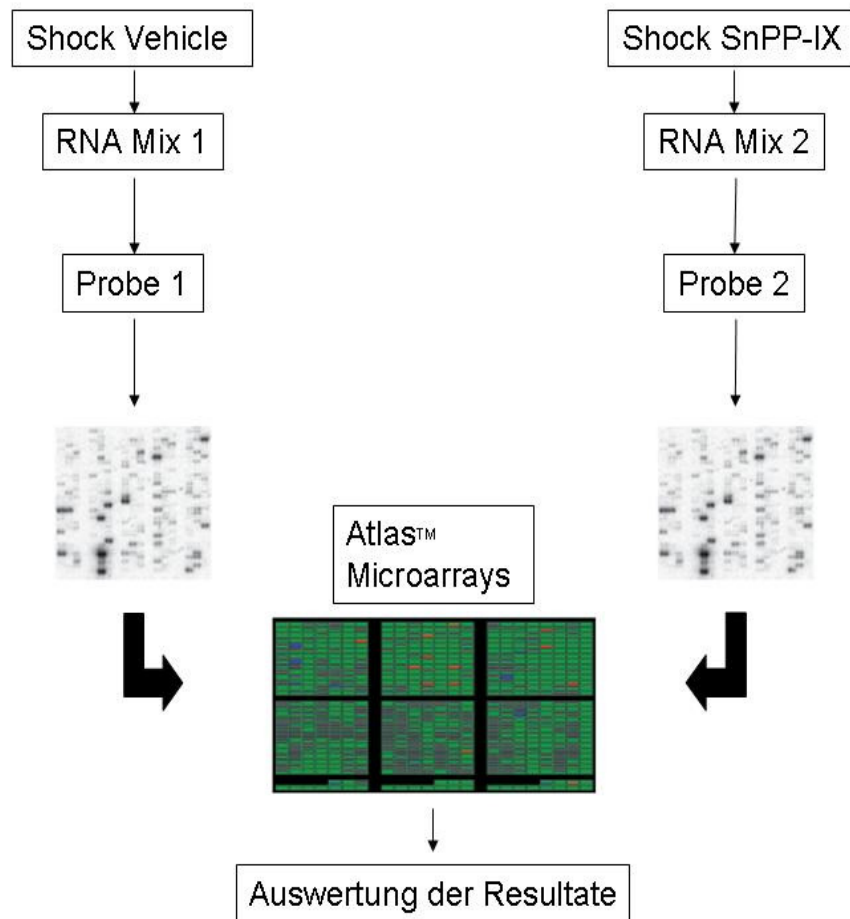


Abb. 5: Übersicht zur Durchführung eines Atlas™ Arrays (modifiziert nach Anleitung des Arrays s. www.clontech.com)

Unterschiedliche mRNA Populationen können nebeneinander verglichen werden, da auf allen erhältlichen Array-Membranen identische cDNAs zur Untersuchung der Genexpression vorhanden sind. So ist es möglich, hier einen Vergleich zwischen „Tier im hämorrhagischen Schock und funktionsfähiger HO“, sowie Bedingung „Schock mit blockierter HO-Aktivität“ durchzuführen. Im ersten Schritt muss eine ausreichende Materialmenge an RNA vorhanden sein. Die Reinheit der Probe stellt den wichtigsten Faktor für eine qualitativ hochwertige Hybridisierung dar. Im folgenden Schritt wird jeweils 1 µg der jeweiligen RNA mit dem „cDNA Synthese (CDS) Primer Mix“ versetzt. Dieser „Primer Mix“ ist speziell vorgegeben für jeden einzelnen erhältlichen Atlas Array. Dies bedeutet, dass diese vorgegebenen Mischungen nicht unter den einzelnen Atlas Array Sets austauschbar sind. Hiernach schließt sich nun der Vorgang der Hybridisierung

an. Die so entstandenen Proben können nun in einem weiteren Schritt, nach einem speziellen Waschvorgang, sichtbar gemacht werden durch eine Autoradiographie und/oder durch Phosphorimaging. Mit einer speziellen Analyse Software („AtlasImage™ Software) kann die spezifische Expression einzelner Gene festgestellt werden, welche von verschiedenen RNA Quellen stammen. Es besteht die Möglichkeit auch Gene zu identifizieren, welche sehr schwach exprimiert werden. Die Erkennung dieser schwach exprimierten Gene hängt von der Reinheit der eingesetzten RNA ab. Gleichzeitig werden parallel zu jeder eigentlichen Probereaktion auf jedem Atlas Array Positivkontrolle-Reaktionen mit sogenannten „Housekeeping“-Genen durchgeführt. Als „Housekeeping“-Gene bezeichnet man Gene, welche für verschiedene Funktionen in unterschiedlichen Zellen kodieren, allerdings keiner Regulation unterliegen. Dies bedeutet, dass es zu einer konstanten Exprimierung unabhängig von äußeren Einflüssen kommt. Hier handelt es sich in der Regel um Gene, die für Enzyme oder Proteine kodieren, welche der Aufrechterhaltung des Stoffwechsels dienen.

Zusammenfassend besteht hier nun die Möglichkeit mit Hilfe dieser „Housekeeping“-Gene eine Aussage über die Qualität der Durchführung der Reaktion zu treffen.

3.4.7.2 RNA Präparation

Die Extrahierung der RNA muss, um eine optimale Reinheit zu erreichen, auf höchstem Qualitätsniveau durchgeführt werden, da hier der Grundstein für die Sensitivität und Wiederholbarkeit gelegt wird. Eine Verunreinigung der RNA führt zu Veränderungen im Hintergrund der Spots auf den einzelnen Membranen und so zu fehlerhaften Bildern, die dann im Folgenden zu fehlerhaften Interpretationen der Spots führen. Die Präparation der RNA aus dem Lebergewebe wurde nach dem oben beschriebenen Schema durchgeführt.

Weitere Aufbereitung der RNA:

DNase-Verdau zur Beseitigung möglicher Verunreinigungen der RNA mit DNA.

1. Herstellung eines Proben Mix (1,5 ml Zentrifugenröhrchen)

500 µl	Gesamt-RNA (1 mg/ml)
100 µl	10x DNase I Puffer
50 µl	DNase I (1 unit/µl)
350 µl	Entionisiertes H ₂ O
1.0 ml	Gesamtvolumen

Diese Suspension wird gemischt durch Auf- und Ab- Pipettierung.

2. Inkubation bei 30 °C für 30 min.
3. Hinzufügen von 100 µl 10x Stopplösung, Durchmischung und im Anschluss Aufteilung der Proben zu je 550 µl in 1,5 ml Zentrifugenröhrchen.
4. Hinzufügen von Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol im Verhältnis 25:24:1, pH 4,5 zu jedem Röhrchen und vortexen.
5. Zentrifugieren mit 14.000 U/min für 10 min bei 4 °C.
6. Vorsichtiger Transfer der oberen wässrigen Phase in ein neues 1,5 ml Zentrifugengefäß.
7. Hinzufügen von 550 µl Chloroform zu dieser wässrigen Phase, im Anschluss vortexen.
8. Zentrifugieren mit 14.000 U/min für 10 min bei 4 °C.
9. Abheben der oberen wässrigen Phase und Befüllen eines 2 ml Mikrozentrifugenröhrchens.
10. Hinzufügen von 1,5 ml Ethanol (95%) und 2M NaOAc (50 µl).
11. Vortexen, Inkubation in Eis für 10 min.
12. Zentrifugieren mit 14.000 U/min für 15 min bei 4 °C.
13. Abnehmen des Überstandes.
14. Waschen des Pellets mit 500 µl Ethanol (80%).
15. Zentrifugieren mit 14.000 U/min für 5 min bei 4 °C.
16. Abnehmen des Überstandes und restlicher Alkoholsuren.
17. Luftrocknung des Pellets für ca. 10 min.
18. Lösen des Fällungsproduktes mit 250 µl RNase-freiem Wasser, anschließend Durchmischung für 1 – 2 min.

3.4.7.3 Weiterverarbeitung der Proben

Bevor die weitere Verarbeitung erfolgte, wurde die Konzentration und Reinheit der RNA durch Messung der optischen Dichte bei 260 und 280 nm bestimmt. Weiterhin wurde eine Gelelektrophorese nach bereits oben beschriebenem Protokoll durchgeführt und zwei RNA Banden bei 28S und 18S verifiziert.

3.4.7.4 Synthese der radioaktiv markierten cDNA

1. Erstellung eines „Master Mix“ mit folgenden Reagenzien in einem 0,5 ml Zentrifugenröhrchen bei Raumtemperatur:

5x Reaktionspuffer	2 µl
10 x dNTP Mix	1 µl
[α - ³² P]dATP (3,000 Ci/mmol, 10 µCi/µl)	3,5 µl
DTT 100mM	0,5 µl
Gesamtvolumen	7 µl

2. Vorheizen des PCR Cyclers auf 70 °C
3. Herstellen einer Mischung aus 1-2 µl RNA (2-5µg) und 1 µl CDS Primer Mix in einem 0,5-ml Zentrifugenröhrchen, falls notwendig Erhöhung des Volumens auf 3 µl (Hinzufügen von deionisiertem H₂O).
4. Durchmischung mit Hilfe einer Pipette und kurzzeitig in einer Mikrozentrifuge.
5. Inkubation in einem vorgeheizten PCR Cyler bei 70 °C für 2 min.
6. Reduzierung der Temperatur im PCR Cyler auf 50 °C für 25 min und Inkubation der Proben für 2 min. Während dieser Phase der Inkubation, hinzufügen von 1 µl MMLV Reverse Transkriptase zum Master Mix. Durchmischung mit Hilfe der Pipette, Aufbewahrung bei Raumtemperatur
7. Nach der Inkubationsphase bei 50 °C für 2 min, hinzufügen von 8µl des Master Mix.
8. Durchmischung des Inhalts mit Hilfe der Pipette und zügiges Zurückstellen in den PCR - Cyler.
9. Inkubation im PCR Cyler bei 50 °C für 25 min.
10. Stoppen der Reaktion durch Zugabe von 1 µl Stopplösung.
11. Aufbewahrung der Probe bei 4 °C in Eis.

3.4.7.5 Aufreinigung der markierten cDNA mit Säulen-Chromatografie

Die weitere Aufbereitung und Auftrennung des oben entstandenen Gemischs zur Isolierung der markierten cDNA und Beseitigung der nichteingebauten radioaktiv markierten Nukleotide und kleinerer DNA-Fragmente erfolgte mit Säulenchromatografie nach folgendem Protokoll:

1. Verdünnung der Probe mit Puffer „NT 2“ auf ein Gesamtvolumen von 200 µl, Durchmischung mit einer Pipette.
2. Platzieren einer NucleoSpin Extraktionssäule in ein 2 ml Sammelgefäß, anschließend Zugabe der Mischung mit einer Pipette.
3. Zentrifugieren für 1 min bei 14.000 U/min. Verwerfen des Sammelgefäßes in die spezielle Entsorgungsvorrichtung für radioaktiven Abfall.
4. Die NucleoSpin Extraktionssäule wird in ein neues Gefäß (2 ml) überführt. Anschließend Zugabe von 400 µl Puffer NT 3 zur Säule. Zentrifugieren für 1 min bei 14.000 U/min. Verwerfen des Sammelgefäßes nach o.g. Kriterien.
5. Wiederholung von Punkt 4.
6. Die NucleoSpin Säule wird nun in ein 1,5 ml Sammelgefäß eingebracht, hinzufügen von 100 µl Puffer NE, 2 min einwirken lassen. Zentrifugieren für 1 min bei 14.000 U/min.

Hybridisierung:

1. Herstellen einer Lösung aus 5 ml ExpressHyb und 0,5 mg sheared salmon testes DNA.
2. Kurzes Anfeuchten der Hybridisierungsmembranen mit deionisiertem Wasser, Zugabe der Lösung aus Punkt 1 und Prähybridisierung bei 68°C für 30 min im Hybridisierungssofen.
3. Herstellen der Hybridisierungslösung durch Zugabe von 5 µl Cot-1 DNA zur markierten cDNA, denaturieren im kochenden Wasserbad für 2 min, anschließend auf Eis.
4. Zugabe der Lösung zur Prähybridisierungslösung und Hybridisierung über Nacht bei 68°C.
5. Abgießen der Hybridisierungslösung und 3x Waschen der Membranen mit je 200 ml vorgewärmter (68°C) Wash Solution 1 (2X SSC, 1% SDS) bei 68°C für je 30 min.

6. 1x Waschen der Membranen mit Wash Solution 2 (0,1x SSC, 0,5% SDS) bei 68 °C für 30 min.
7. 1x Waschen der Membranen mit 200 ml of 2x SSC für 5 min bei 68 °C
8. Die Membran mit der Pinzette vorsichtig aus der Hybridisierungsflasche herausnehmen und sofort in Folie einschweißen, die Membran darf nicht antrocknen.
9. Darstellung der hybridisierten cDNA mittels Phosphorimager.

Die Auswertung der mit Phosphorimaging erhaltenen Bilder erfolgte mit der Software AtlasImage 2.0. So wurde anschließend die Liste hoch- oder herunterregulierter Gene erstellt. Der Schwellenwert für die Festlegung einer differentiellen Expression wurde von der Fa. Clontech auf 1,4-fach gesetzt. Dies ist ein gebräuchlicher Wert, der lediglich für sehr schwach exprimierte mRNAs ungeeignet ist, da dadurch die Anzahl falsch positiver differentiell exprimierter Gene deutlich zunimmt (mündliche Überlieferung der Fa. Clontech). Vergleichbare Werte der Festlegung einer differentiellen Genexpression sind auch in der aktuellen Literatur beschrieben (JOSEPH 2008).

3.4.8 RT-PCR

Zur weiteren Charakterisierung der differentiellen Genexpression führte ich eine RT-PCR zum Nachweis von TNF Rezeptor, Caspase-3, Fas-Ligand und Annexin V durch. Aus 1 µg der gewonnenen RNA wurde Einzelstrang-DNA (komplementär) mit Reverser Transkriptase synthetisiert. Die PCR-Reaktion wurde mit den in der Tabelle angegebenen sense und anti-sense Primern durchgeführt (MWG Biotech, Ebersberg). Die Reaktionsbedingungen für jede Reaktion im Thermocycler (PERKIN ELMER Gene Amp PCR-System 2400) waren:

94 °C	5 min	
94 °C	30 s	28 Zyklen
68 °C	2 min	
68 °C	5 min	

Die Amplifikation wurde bei 68°C nach 5 min beendet. Jede Reaktionsmischung von 50 µl Gesamtvolumen enthielt: 2 µl RT-Produkt, 50 µM dNTPs, 1,5mM MgCl₂ und 2,5 Units Taq-Polymerase in 1 x PCR-Puffer (Life Technologies).

Primersequenzen für PCR :

Gen-Name	Sense	Antisense
Annexin V	5` ATTCGGAGCATACCTGCCTACCTTG 3`	5` CTTCTTATAGTCTCCAGATGTGTCGC 3`
Fas-L Rezeptor	5` TGCACCAACCTGCCATCCGTGCAC 3`	5` CTCAAGGATGTCTTCAAGTCCACACG 3`
TNF- Rezeptor	5` TCTGCTGCACCAAGTGCCACAAAGG 3`	5` ACACTGGAAATGCGTCTCACTCAGG 3`
Caspase-3	5` AGGCGACTACTGCCGGAGTCTGAC 3`	5` GCAAAGTGACTGGATGAACCATGACC 3`

4 Ergebnisse

4.1 Makrohämodynamische Auswirkungen von Scheinoperation oder hämorrhagischem Schock mit Volumensubstitution

Tiere, die einem hämorrhagischen Schock unterzogen wurden und scheinoperierte Tiere wurden nach gleichem Protokoll präpariert, allerdings wurde in der Gruppe der scheinoperierten Tiere kein hämorrhagischer Schock induziert. Die Tiere in der scheinoperierten Gruppe („Sham Vehikel“) erhielten lediglich während des gesamten Experiments nur einen Erhaltungsbedarf mit Ringerazetatlösung. Während des gesamten Experiments waren MAD, HZV und Basendefizitwerte bei den scheinoperierten Kontrolltieren im Normbereich. MAD und HZV der scheinoperierten Tiere sind im Vergleich zu Tieren aus der Schockgruppe, hier sowohl Tiere, die sich lediglich im hämorrhagischen Schock befanden, als auch Tiere, die mit SnPP-IX behandelt wurden, gezeigt. Hier zeigten sich in beiden Gruppen signifikante Veränderungen der hämodynamischen Parameter, die sich nach Volumengabe reversibel zeigten.

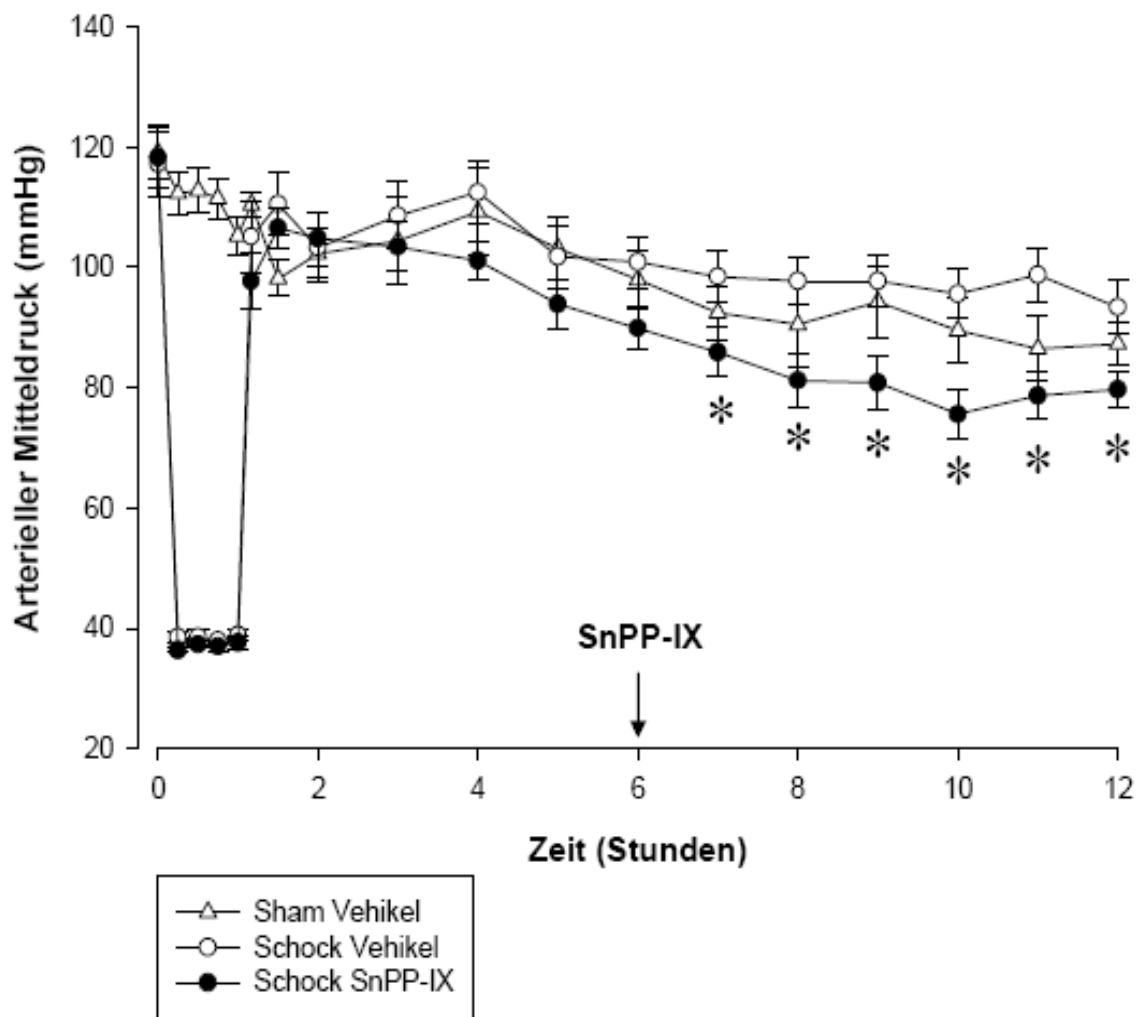


Abb. 6: Mittlerer arterieller Druck (MAD)

In der Abbildung sind die MAD-Werte der scheinoperierten Kontrolltiere von jeweils n=8 Tieren als Liniendiagramm dargestellt. Ebenso sind die MAD-Werte der Schock-Vehikel und der Schock-SnPP-IX-Gruppe von jeweils n=12 bzw. n=13 Tieren aufgetragen. Die Werte sind als Mittelwerte mit Standardfehlern angegeben. * bezeichnet $p < 0,05$ im Vergleich mit der Ausgangssituation.

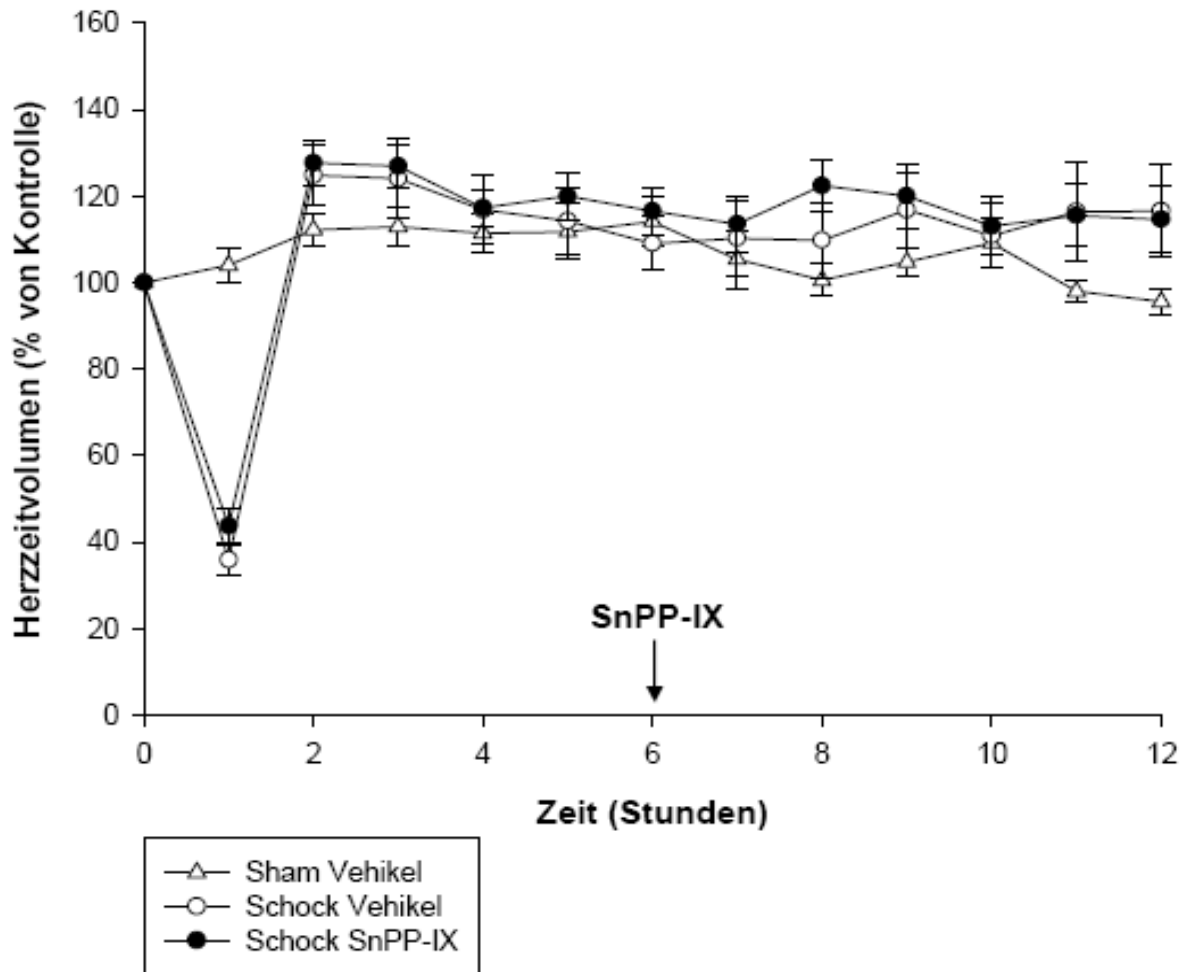


Abb. 7: Herzzeitvolumen (HZV)

Die Abbildung zeigt die HZV-Werte der scheinoperierten Kontrolltiere von jeweils n=8 Tieren als Liniendiagramm. Ebenso sind die HZV-Werte der Schock-Vehikel und der Schock-SnPP-IX-Gruppe von jeweils n=12 bzw. n=13 Tieren aufgetragen. Die Daten sind als Mittelwerte mit Standardfehlern angegeben. Das HZV der scheinoperierten Kontrolltiere wurde als Referenzwert mit 100% angegeben, die Werte der Schocktiere in Abweichung des prozentualen Abfalls bzw. Anstiegs nach Volumengabe.

Im MAD zeigten sich während der Schockphase keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen, da es sich hier um ein druckkontrolliertes Schockmodell handelte.

Während der Phase des hämorrhagischen Schocks konnte ein signifikanter Abfall des HZV beobachtet werden. Zwischen den beiden Schockgruppen konnte kein Unterschied gezeigt werden. Das HZV der Kontrollgruppe zeigte sich während des gesamten Ablaufs konstant.

Nach Beginn der Volumensubstitution zeigten alle behandelten Tiere stabile Verhältnisse in der Makrohämodynamik. Alle Tiere überlebten den Beobachtungszeitraum von zwölf Stunden. Dies spricht für ein reversibles Schockmodell. Eine Erholung von HZV und

MAD sprechen dafür, dass das hämorrhagische Schockereignis eine Kompensation und Reversibilität zeigte.

Die im Versuchsprotokoll geschilderte Gabe von SnPP-IX nach fünfständiger Volumentherapie führte zu einer signifikanten Abnahme des MAD im Vergleich zur Schock-Vehikel-Gruppe. Die MAD Werte lagen jedoch weiterhin im Normbereich. Das HZV wurde durch die Gabe von SnPP-IX nicht beeinflusst.

4.2 Basendefizit

Die Bestimmung der Basendefizite wurde zu verschiedenen Zeitpunkten der Versuchsreihe durchgeführt. Zum Zeitpunkt des Versuchsbeginns sowie am Ende der Versuchsreihe nach insgesamt 720 min zeigten sich innerhalb der beiden Schockgruppen und im Bezug auf die Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede. Wie in der obigen Abbildung ersichtlich befanden sich sämtliche gemessenen Werte innerhalb des Normbereiches. Daraus lässt sich schließen, dass der hämorrhagische Schock in den unterschiedlichen Gruppen vergleichbar ist. Ein wesentlicher signifikanter Unterschied zeigte sich in den Werten nach einer Stunde des Versuchsbeginns zwischen den Tieren der Kontrollgruppe, den scheinoperierten Tieren und den Tieren der Schockgruppe. Hier ist der Endpunkt der hämorrhagischen Schockphase erreicht. Bei allen weiteren Zeitpunkten (120 min und 360 min nach Beginn der Versuche) näherten sich die Werte wiederum den Ausgangswerten an (Reperfusionphase). Eine Wiederherstellung der Basendefizitwerte, wie auch eine Stabilisierung der hämodynamischen Werte zeigt eine ausreichende und adäquate Volumentherapie im Verlauf des Schockmodells. Die Abbildung zeigt den Verlauf der Basendefizitwerte bei allen Schocktieren sowie den Tieren aus der Kontrollgruppe, die mit den Werten der scheinoperierten Tiere identisch sind.

Nachfolgend sind die Basendefizitwerte zum Zeitpunkt 0, 60, 120, 360 und 720 min dargestellt.

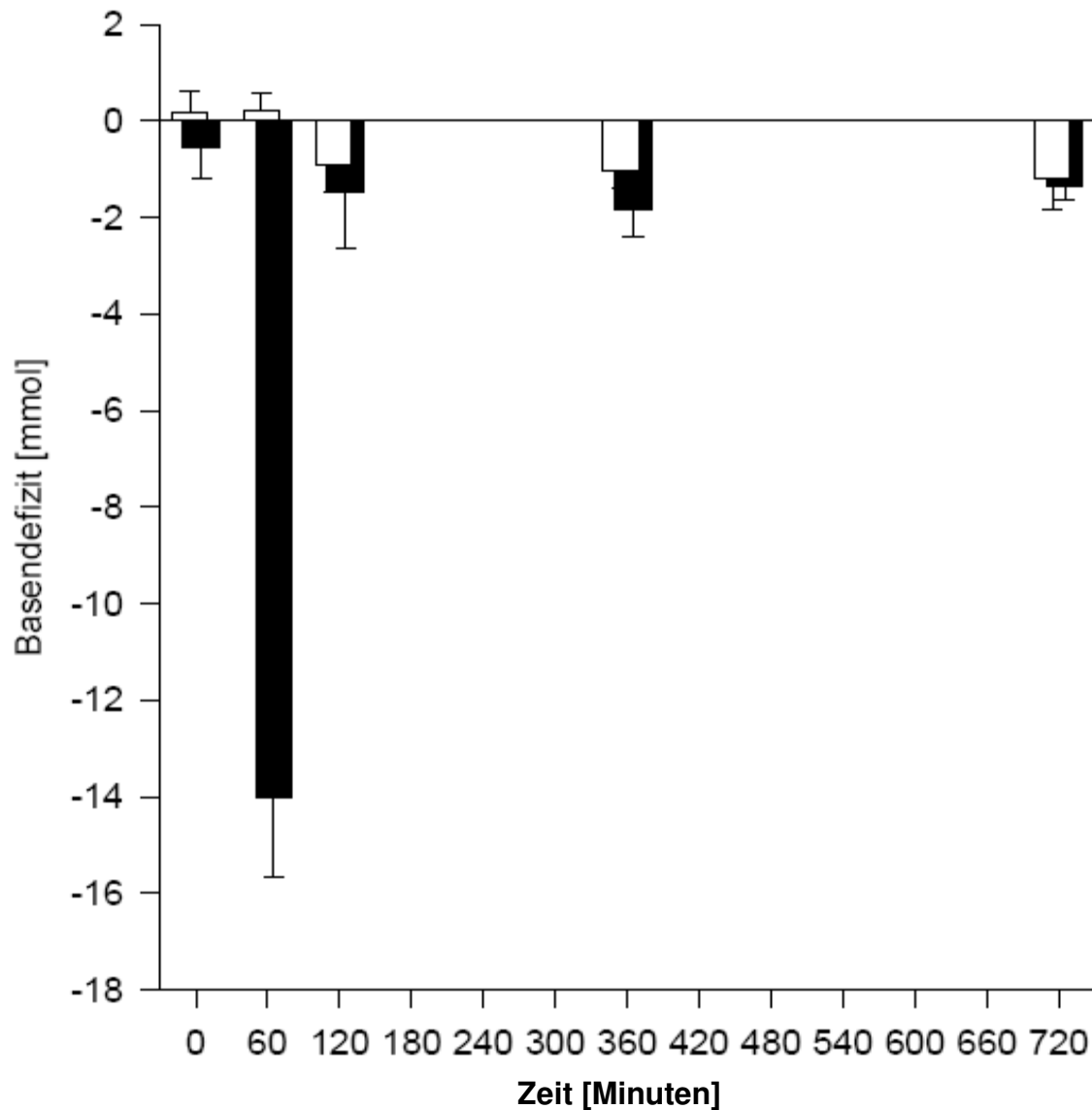


Abb. 8: Basendefizit

Abgebildet sind die Basendefizitwerte am Beginn der Versuchsreihe zum Zeitpunkt 0 min, weitere Zeitpunkte sind 60, 120, 360, und 720 min nach Versuchsbeginn. Die schwarzen Balken repräsentieren die Tiere der beiden Schockgruppen (Schock-Vehikel und Schock-SnPP-IX), die weißen Balken die scheinoperierten Kontrolltiere. Zum Zeitpunkt 60 min sind die Werte nach Ende des hämorrhagischen Schocks bzw. bei scheinoperierten Kontrollen nach einer Stunde des Experiments aufgetragen. Die Zeitpunkte 120, 360 und 720 min entsprechen dem zeitlichen Verlauf der Versuchsfortsetzung mit Volumensubstitution, in der Gruppe der scheinoperierten Tiere dem Verlauf der Aufrechterhaltung des Flüssigkeitshaushaltes im Sinne der Deckung des Grundbedarfs. In der Abbildung sind die Mittelwerte mit Standardfehlern angegeben.

4.3 Entnommenes Blutvolumen

Die folgende Tabelle gibt die Menge der entzogenen Blutvolumina an, die erforderlich war, um einen MAD von 35-40 mmHg zu erreichen und permanent aufrechtzuerhalten. Diese unterschieden sich in den beiden Schockgruppen nicht signifikant. Die Werte sind in ml pro 100 g Körpergewicht angegeben (Mittelwerte mit Standardfehlern):

Gruppe der untersuchten Tiere	Entnommenes Blutvolumen in ml/100 g Körpergewicht
Scheinoperierte Tiere	0
Schock-Vehikel	3,5 ± 0,21
Schock-SnPP-IX	3,2 ± 0,13

4.4 α -GST Serumkonzentration als ein Marker der hepatozellulären Schädigung

Eine Beurteilung des hepatozellulären Schadens erfolgte durch die Bestimmung der Konzentration von α -GST im Serum.

Als ein Zeichen der stabilen Präparation zeigten die α -GST-Konzentrationen der scheinoperierten Kontrolltiere nach elfstündiger Volumentherapie ohne Durchführung einer hämorrhagischen Schocksituation, verglichen mit den Ausgangswerten, keinen signifikanten Anstieg. Hier zeigt sich weiterhin im Vergleich zu den jeweiligen Ausgangswerten, dass Schock mit Volumentherapie zu einem signifikanten Anstieg der α -GST-Konzentrationen führte. In der Gruppe der Schock-behandelten Tiere erfolgte im weiteren Verlauf der Volumentherapie ein leichter Abfall der Werte (Schock-Vehikel-Gruppe). Die Blockade des HO-Stoffwechsels mit SnPP-IX unter hämorrhagischen Schockbedingungen (sechs Stunden nach Beginn der Schockphase) führte jedoch zu einem weiteren signifikanten Anstieg der α -GST-Konzentrationen im Serum.

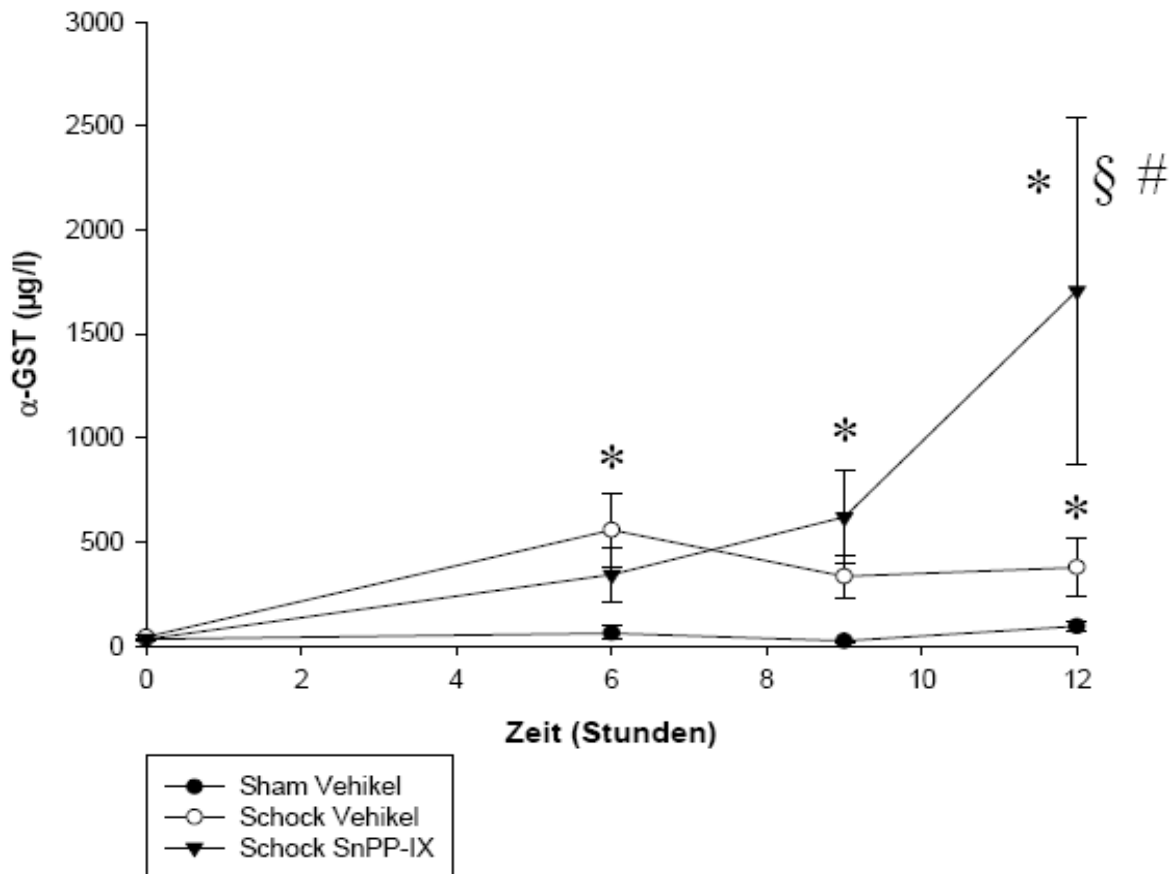


Abb. 9: α-GST

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte mit Standardabweichung für n=8-13 Tiere der einzelnen Untersuchungsgruppen dargestellt. SnPP-IX (50µmol/kg KG) wurde sechs Stunden nach Versuchsbeginn injiziert. * bezeichnet p < 0,05 im Vergleich mit der Ausgangssituation. § bedeutet einen signifikanten Unterschied im Vergleich mit den ermittelten Werten, welche sechs Stunden nach Beginn der Schockphase (vor Gabe von SnPP-IX) gemessen wurden. # bedeutet einen signifikanten Unterschied zur Schock-Vehikel-Gruppe.

4.5 Expression von HO-1-Protein in der Gesamtleber

Die HO-1-Expression in der Leber wurde zunächst mit Western Blot Analyse charakterisiert. Hierzu wurde Lebergewebe von unmanipulierten Kontrolltieren (Kontrolle), scheinoperierten Tieren sechs Stunden nach Versuchsbeginn (Scheinoperierte Kontrolle) und Tieren, die sich einem hämorrhagischen Schock (eine Stunde) mit Volumentherapie (fünf Stunden) unterzogen (Schock), entnommen und Gesamtprotein isoliert. Als positive Kontrolle diente rekombinantes HO-1-Protein. In den nicht behandelten Kontrolltieren zeigte sich lediglich eine schwache Expression von HO-1-Protein. Die Scheinoperation hatte keinen wesentlichen Einfluss auf die HO-1-

Expression. Hämorrhagischer Schock mit Volumentherapie führte dagegen zu einer starken Induktion der HO-1-Expression in der Leber.

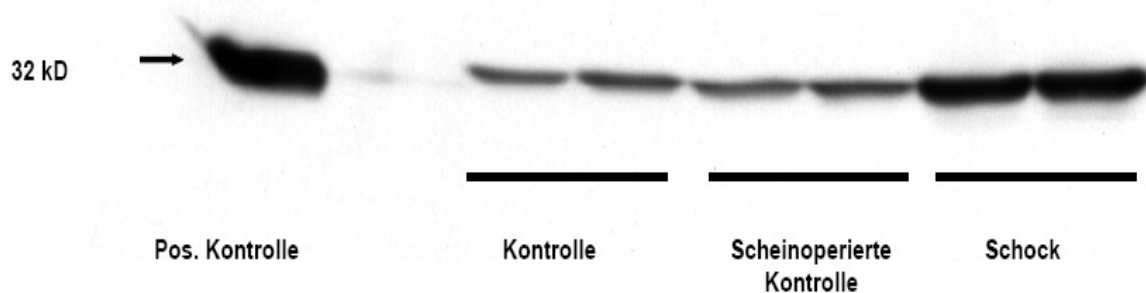


Abb. 10: HO-1-Proteinexpression

Western Blot Analyse der HO-1-Stressproteinexpression in der Leber. Die Ergebnisse zeigen unmanipulierte Kontrolltiere, scheinoperierte Kontrolltiere und Tiere nach Schock mit Volumentherapie, jeweils sechs Stunden nach Beginn der Versuchsreihe. Als positive Kontrolle diente rekombinantes HO-1-Protein.

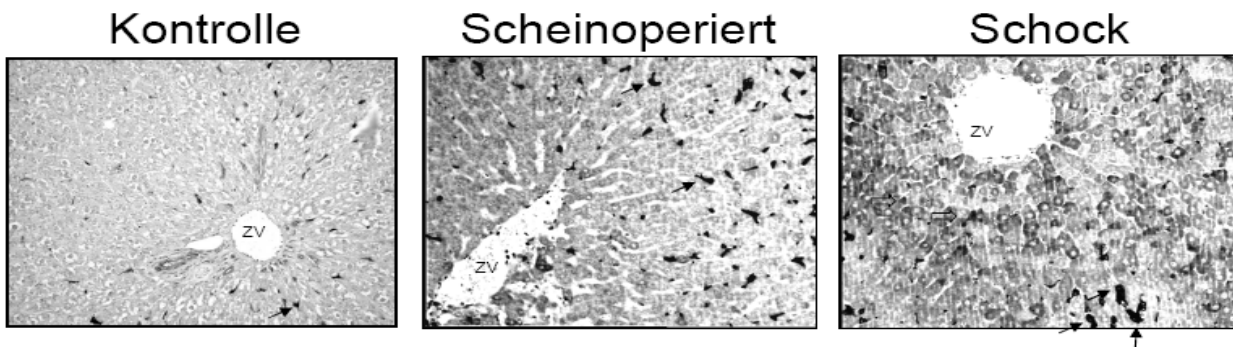
4.6 Zelltypspezifische und räumliche HO-1/Hsp 32 Expressionsmuster

Mit Immunhistochemie wurde neben den zelltypspezifischen Expressionsmustern von HO-1 auch die räumliche Expression auf Proteinebene charakterisiert. Die Untersuchungsbedingungen entsprechen den Bedingungen wie oben in der Western blot Analyse gezeigt.

Bezogen auf die zelltypspezifischen und räumlichen Expressionsmuster von HO-1 zeigte sich bei den unbehandelten und bei den scheinoperierten Kontrolltieren nur eine geringe Menge an immunreaktivem HO-1-Protein in den Nichtparenchymzellen, hier vorwiegend in den Periportalfeldern. Dagegen konnte in Hepatozyten unbehandelter und scheinoperierter Tiere kein immunreaktives HO-1-Protein nachgewiesen werden.

Ein deutlicher Anstieg und Nachweis von HO-1 immunreaktivem Protein konnte fünf Stunden nach Beginn der Volumentherapie in den Parenchymzellen der Übergangszone und der Perizentralregion beobachtet werden. Im Vergleich zu unbehandelten und

scheinoperierten Kontrolltieren nahm die Anzahl HO-1-positiver Nichtparenchymzellen zu. Dies zeigte sich hauptsächlich in der Perizentralregion.



↗ Kupferzelle
 ⇨ Hepatozyten
 ZV= Zentralvene

Abb. 11: Immunhistochemischer Nachweis von HO-1-Protein in der Leber

Darstellung der Ergebnisse auf Proteinebene in der Immunhistochemie nach sechs Stunden Versuchsablauf (eine Stunde Schock und fünf Stunden Reperfusion) der jeweiligen Gruppen „scheinoperierte Kontrolltiere“, der Gruppe „Schock“ und Tieren aus der reinen Kontrollgruppe ohne chirurgische Manipulation. Die Abbildung der Kontrollgruppe liegt hier in einer zehnfachen Vergrößerung vor, die Gruppe „scheinoperierte Kontrolltiere“ und „Schock“ sind in einer 40-fachen Vergrößerung abgebildet.

4.7 Untersuchung der durch Blockade der Hämoxygenase-Aktivität nach hämorrhagischem Schock mit Volumentherapie induzierten differentiellen hepatischen Genexpression

Zur Untersuchung der differentiellen hepatischen Genexpression mittels Mikroarray Technik wurden Proben aus Lebergewebe untenstehender Gruppen untersucht. Hierzu wurde jeweils eine Probe eines Tieres aus der Gruppe „Schock“, sowie aus der Gruppe „Schock mit Blockade der HO-Aktivität“ - nach zwölf Stunden Versuchsablauf - entnommen und entsprechend präpariert. Die Blockade des HO-Stoffwechsels wurde, wie bereits beschrieben, mit SnPP-IX durchgeführt. Alle Proben wurden nach der Hybridisierung und einem Waschvorgang mit einem Phosphorimager detektiert. Ziel war es, den Einfluss der Blockade des HO-Stoffwechsels nach hämorrhagischem Schock mit Volumentherapie auf Veränderungen der Genexpression in der Leber zu untersuchen.

In der folgenden Abbildung sind die Expressionsprofile der Hybridisierung des „Rat Toxicology c-DNA-Arrays“ mit der radioaktiv markierten cDNA dargestellt (Abb. 12). Die weitere Auswertung erfolgt im Anschluss an das Auswaschen der nicht gebundenen cDNA-Fragmente durch Auswertung der Signale auf jeder Position mit einer speziellen Software (AtlasImage 2.0). Aus der Intensität der einzelnen Spots kann die relative Expression der auf dem Mikroarray fixierten Genfragmente beider unterschiedlicher Ausgangsproben abgeschätzt werden. Die absoluten Zahlenwerte der Auswertung sind im Anhang in einer Tabelle zusammengefasst.

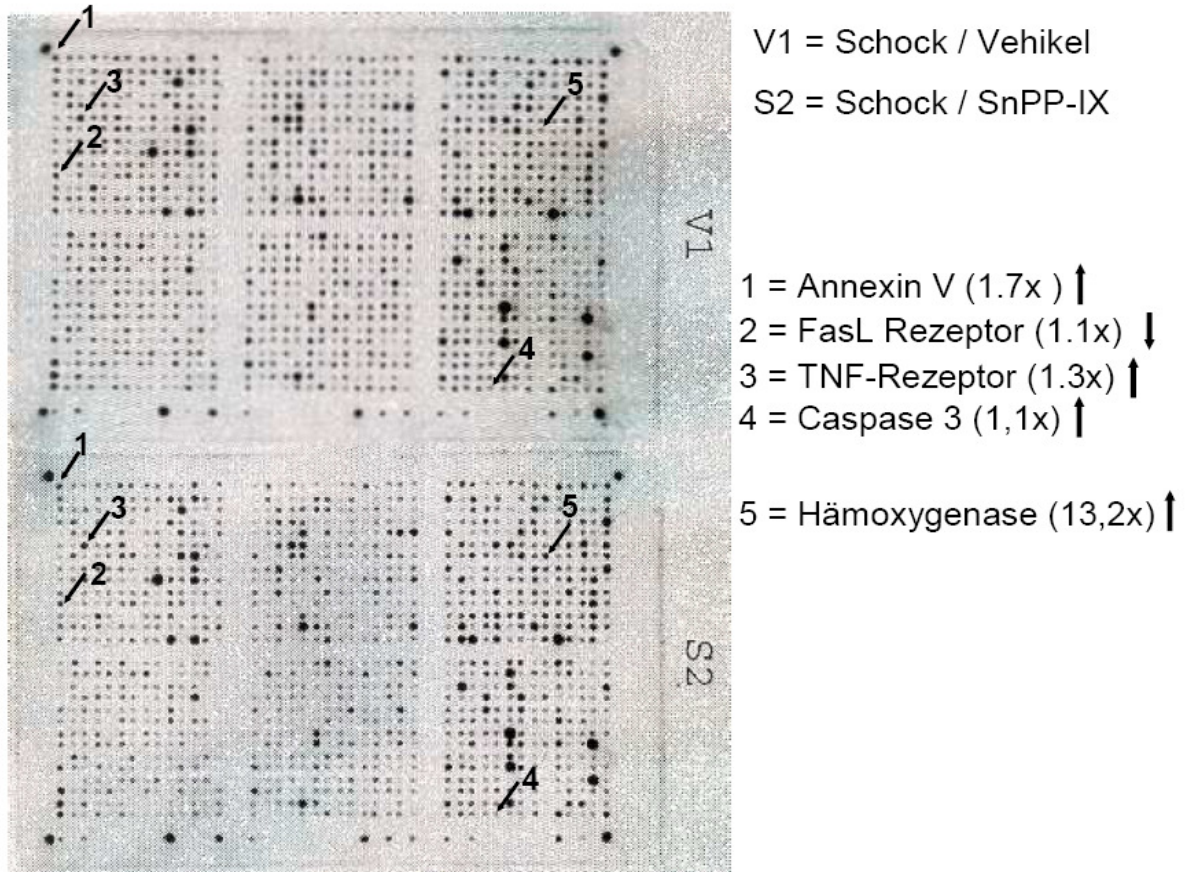


Abb. 12: Genexpressionsmuster im Mikroarray

Expressionsprofile der Hybridisierung im Rat Toxicology cDNA Array aus den Gruppen Schock-Vehikel (V1) und Schock SnPP-IX (S2). Mit Hilfe der Koordinaten, welche von der Firma Clontech mitgeliefert wurden, sind einzelne Spots in der Abbildung identifiziert.

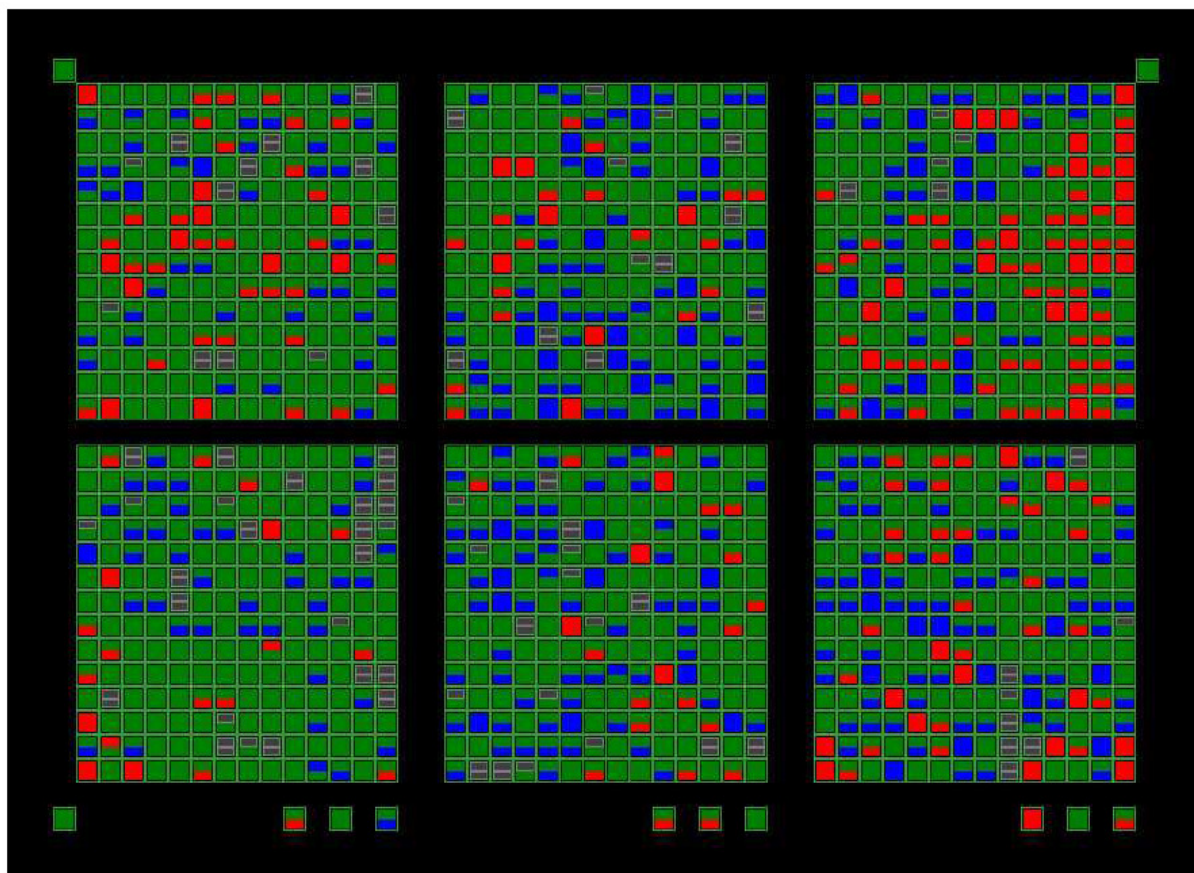


Abb. 13: Auswertung der Genexpressionsprofile mit Hilfe der „AtlasImage Software“[®] (Firma Clontech)

Die blauen Spots bezeichnen die herunterregulierten Gene, die roten Spots zeigen die hochregulierten Gene. Die Koordinaten sind ebenfalls von der Firma Clontech vorgegeben und erlauben so die Identifizierung des untersuchten Genproduktes.

Die einzelnen untersuchten Gene des Arrays wurden jeweils nach der vorgegebenen Eingruppierung der Genliste der Firma Clontech (einzusehen unter www.clontech.com „Atlas Rat Toxicology Array II Gene List“) klassifiziert, daneben wurde festgestellt, ob unter den oben genannten Bedingungen verstärkte („UP“) oder verminderte („DOWN“) Hybridisierungsvorgänge stattfanden. Als Grenzwert für das Vorliegen einer Hoch- bzw. Herunterregulierung wurde, wie in „Material und Methoden“ beschrieben, ein Unterschied in der Stärke der Genexpression von 1,4-fach festgelegt. Alle weiteren Unterschiede in der Genexpression mit einer kleineren Abweichung als das 1,4-fache wurden nicht berücksichtigt. Die Bezeichnung der einzelnen übergeordneten Gengruppen für die Zuordnung der einzelnen Gene wurde teilweise ins Deutsche übersetzt, bei allgemein gebräuchlichen Bezeichnungen wurde der englische Begriff beibehalten. Die Ergebnisse sind tabellarisch im Anhang dargestellt.

Insgesamt wurden 69 differentiell exprimierte Gene identifiziert, die jeweils um das 1,4-fache hoch- bzw. herunterreguliert waren und in die jeweiligen Gen-Gruppen eingegliedert. Nach Herstellerangaben konnten diese 33 unterschiedlichen Klassifikationsmöglichkeiten zugeteilt werden (siehe Anhang).

In den einzelnen spezifischen Gruppen der differentiell exprimierten Gene zeigten sich nicht generell einheitlich verstärkte oder abgeschwächte Exprimierungen unter den oben genannten Bedingungen. In der Gruppe der „Hitzeschock-Proteine“ zeigte sich allerdings eine verstärkte Exprimierung fast aller Genprodukte (s.o.). In der Gruppe „Xenobiotic Metabolism“ zeigte sich durchgängig eine abgeschwächte Exprimierung, ebenso in der Gruppe der „Xenobiotic Transporter“. In der Klasse „complex lipid metabolism“ konnten vier Gene eingegliedert werden, davon zeigten sich drei herunterreguliert. In der Gruppe der „Stress Proteine“ zeigten sich alle katalogisierten größer oder gleich 1,4-fach exprimiert. Eine einheitliche Richtung der Hoch- oder Herunterregulierung im Hinblick auf die Expression proapoptotischer oder antiapoptotischer Gene konnte nicht festgestellt werden.

4.7.1 RT-PCR-Analyse Apoptose-regulierender Gene

Für die Beurteilung der Qualität der Befunde aus der Transkriptionsanalyse mittels Mikroarray ist eine Bestätigung der Daten mit unabhängigen Methoden erforderlich.

Zur weiteren Charakterisierung und gegebenenfalls Bestätigung der Mikroarray-Daten sowie der Quantifizierung der Ergebnisse wurde eine RT-PCR mit vier ausgewählten Sequenzen durchgeführt. Hierzu wurden vier Gene, die eine wichtige Rolle im Ablauf und Zyklus der Apoptose spielen, untersucht.

Die folgende Tabelle gibt eine allgemeine Übersicht zu den Aufgaben der untersuchten Gene:

1	TNF Rezeptor (TNFRSF1A)	Rezeptoren in der Zellmembran, die durch Aktivierung an der Vermittlung der Apoptose beteiligt sind.
2	CASPASEN	Enzyme in der Vermittlung der Apoptose, die Peptidbindungen von Aspartat spalten.
3	FAS – L	Die physiologische Aktivierung von Fas erfolgt durch Fas-Ligand (Fas-L). Dabei wird das apoptotische Signal durch Bindung intrazellulärer Adaptermoleküle an die sogenannte „Death-Domain“ des Fas übertragen.
4	ANNEXIN V	Die Plasmamembran von Zellen ist asymmetrisch aufgebaut. Der Verlust dieser Asymmetrie ist ein frühes Zeichen der Apoptose. Phosphatidylserin (PS), das unter normalen Bedingungen auf der cytoplasmatischen Innenseite der Membran lokalisiert ist, tritt dabei vermehrt in der nach außen gerichteten Membranseite auf. Das Protein Annexin V bindet spezifisch an PS.

Mit der Mikroarray-Analyse wurden folgende Ergebnisse für die vier oben genannten Apoptosemarker gezeigt: Mit Hilfe der Koordinaten sind die untersuchten Gene auf den mit Phosphorimaging erhaltenen Bildern zu identifizieren.

GENBEZEICHNUNG	Koordinaten	UP	DOWN
TNF-REZEPTOR (TNFRSF1A)	A03f	1,3	
Fas-L (APO 1)	A01k		1,1
CASPASE-3 (CASP 3)	F05n	1,1	
ANNEXIN V (ANX5)	A01a	1,7	

Hier zeigte sich bei drei der vier Apoptosemarker eine Hochregulierung (TNF-Rezeptor, Caspase-3 und Annexin V), bei einem eine Herunterregulierung (Fas-L). Dabei wurde

lediglich bei einem Marker der festgelegte Schwellenwert der Veränderung der Genexpression von 1,4-fach überschritten (Fett unterlegt). Dabei handelte es sich um Annexin V, das somit als einziges der 4 Gene im Mikroarray als differentiell exprimiert katalogisiert werden konnte.

Die folgende Abbildung zeigt die Ergebnisse der RT-PCR der jeweiligen Gruppen „Schock-Vehikel“ und „Schock-SnPP-IX“ für die vier oben beschriebenen Apoptosemarker. In der untenstehenden Tabelle sind die densitometrischen Einheiten mit Standardabweichung angegeben.

Hier zeigt sich für den Marker TNF–Rezeptor, identisch mit den Ergebnissen des Mikroarray, eine 1,3-fache Verstärkung der Expression nach Blockade der HO-Aktivität mit SnPP-IX. Die Ergebnisse der RT-PCR zeigen dabei einen signifikanten Anstieg dieser Induktion.

Für den Apoptosemarker Caspase-3 zeigte der Mikroarray eine schwache Überexprimierung um den Faktor 1,1, die Bestätigungs-PCR allerdings eine 1,4-fache Abschwächung, die jedoch nicht signifikant ist. Somit scheint die Expression von Caspase-3 durch Blockade der HO-Aktivität nicht beeinflusst zu werden. Die Expression von Fas–L zeigte sich im Array um den Faktor 1,1-fach abgeschwächt, also nahezu unverändert. Im Gegensatz dazu zeigt die RT-PCR eine 1,6-fache Verstärkung ($p=0,053$). Annexin V zeigt sich sowohl im Array verstärkt (1,7-fach), als auch in der RT-PCR (1,4-fach), allerdings ohne Signifikanz.

Zusammenfassend sind in der folgenden Tabelle und Abbildung die Ergebnisse der RT-PCR dargestellt:

1. Caspase-3

	Absolutwert	Standardabweichung (+/-)	Relation
Schock-Vehikel	0,1624	0,03	
Schock-SnPP-IX	0,1178	0,03	-1,4

2. Annexin V

	Absolutwert	Standardabweichung (+/-)	Relation
Schock-Vehikel	0,038	0,0085	
Schock-SnPP-IX	0,053	0,011	+1,4

3. TNF Rezeptor

	Absolutwert	Standardabweichung (+/-)	Relation
Schock-Vehikel	0,1898	0,0166	
Schock-SnPP-IX	0,2520	0,0207	+1,3

4. Fas-L

	Absolutwert	Standardabweichung (+/-)	Relation
Schock-Vehikel	0,1724	0,0249	
Schock-SnPP-IX	0,2760	0,0381	+1,6

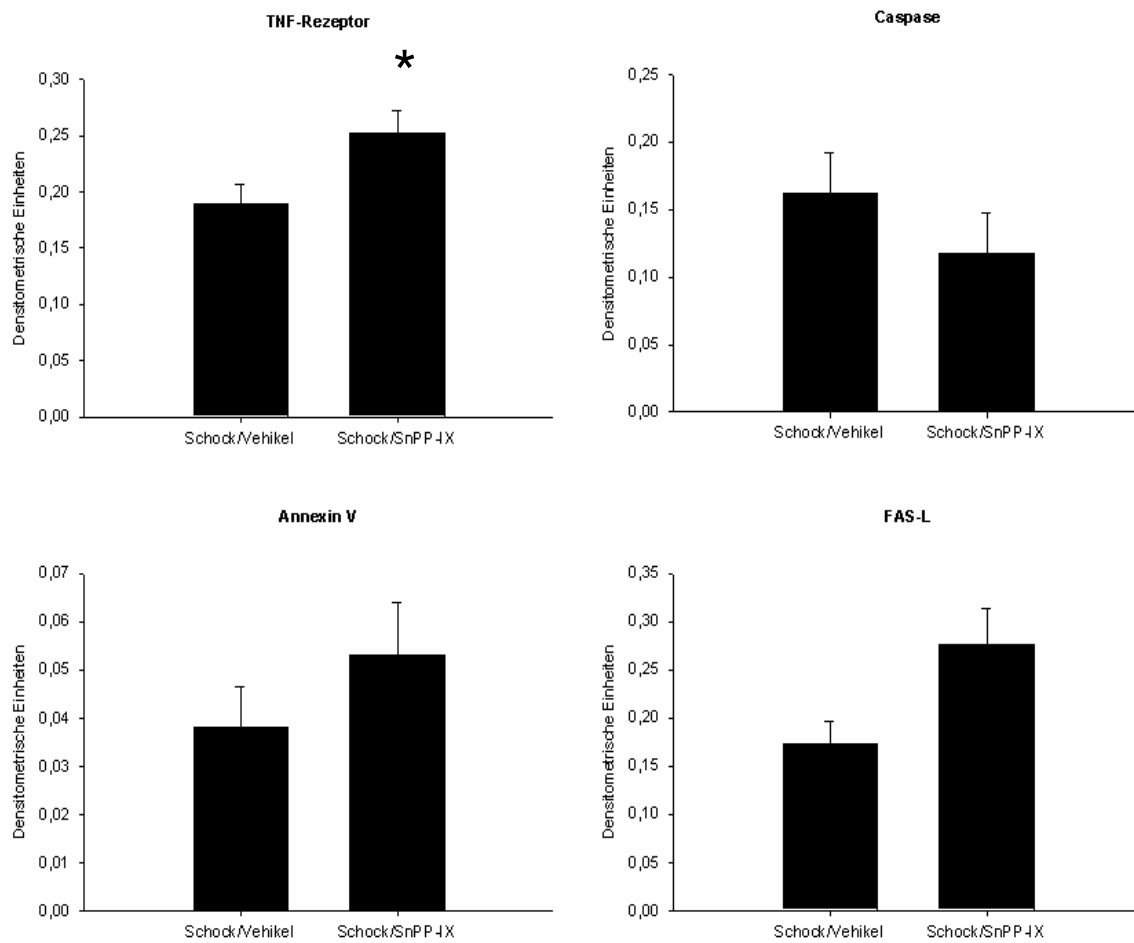


Abb. 14: RT-PCR

RT-PCR zur Untersuchung der Genexpression von TNF-Rezeptor, Caspase-3, Annexin V und Fas-L in der Leber. Dargestellt sind die Mittelwerte der densitometrischen Einheiten und Standardabweichungen aus der jeweiligen Gruppe Schock-Vehikel und Schock-SnPP-IX (n=5/Gruppe). * p < 0,05 vs. Schock-Vehikel.

Im Folgenden zeigt eine Übersichtstabelle die Expressierung der einzelnen untersuchten Gene im Vergleich zwischen Mikroarray und RT-PCR.

Untersuchte Gene	Mikroarray	RT-PCR
TNF Rezeptor	↑	↑
Fas-Ligand	↓	↑
Caspase-3	↑	↓
Annexin V	↑	↑

Hochregulierung ↑, Herunterregulierung ↓

5 Diskussion

Der akut einsetzende hämorrhagische Schock und die damit verbundenen Störungen der Makrohämodynamik führen in der Folge zu einem ausgeprägten Versagen der Mikrozirkulation, welche zu einer Ischämie und Hypoxie auf zellulärer Ebene führt. Hierdurch kommt es zur Entwicklung einer generalisierten Entzündungsreaktion des Körpers mit Organdysfunktion und schließlich zur komplexen Ausbildung eines Multiorganversagens.

Dieses Multiorganversagen entsteht auf dem Boden multipel aktivierter Stoffwechselforgänge, die weitere Schädigungen auf zellulärer Ebene in den unterschiedlichen Organen wie Lunge oder Niere auslösen. Verschiedene Reaktionen der einzelnen geschädigten Zelltypen und deren komplexen, teils kaskadenartig verlaufenden Schutzmechanismen werden derzeit intensiv untersucht. Eine wichtige Gruppe von zellulären Schutzmechanismen bilden die Hitzeschockproteine. Ihnen kommen protektive und stabilisierende Funktionen zu, die in der Vermittlung der intrazellulären Faltung und Translokation von Proteinen liegen.

Ein wichtiges Stressprotein, das ebenfalls zur Familie der Hitzeschockproteine zählt, ist die HO-1 (Hsp 32). Die Aktivität von HO-1 kann unter pathophysiologischen Bedingungen durch den Einfluss von Stressfaktoren wie Hitzeschock (EWING 1991) oder Hypoxie und Hyperoxie (LEE 1996) bis zu hundertfach gesteigert werden. Balla (1993) konnte durch eine Vorbehandlung mit UV-A-Strahlung und Häm-Exposition von *in vitro* Endothel-Zellkulturlinien den Nachweis erbringen, dass die Zellen mit Hilfe dieser Behandlungsstrategie besser vor oxidativen Stressereignissen geschützt sind.

HO-1 ist das einzige bis dato bekannte Enzym, welches unter solch einer Vielzahl von unterschiedlichen Konditionen aktiviert werden kann (MAINES 1997)

In der vorliegenden Arbeit wurden im Modell des hämorrhagischen Schocks mit anschließender Volumentherapie, Expressionsmuster des durch oxidativen Stress induzierten Enzymsystems der HO-1 in der Leber untersucht. Weiterhin wurden Veränderungen der hepatischen Genexpression durch Blockade des HO-Stoffwechsels nach hämorrhagischem Schock mit Volumentherapie charakterisiert.

5.1 Charakterisierung Schockmodell

5.1.1 Arterielle Blutgase und Makrohämodynamik

Zur Steuerung des hämorrhagischen Volumenverlustes und zur klinischen Überwachung der Tiere wurden während der gesamten Versuchsdauer makrohämodynamische Parameter erhoben und kontrolliert. Auch die Forderung, dass es sich hier um ein druckkonstantes Modell handelte, konnte anhand der erhobenen Parameter erfüllt werden.

In der Gruppe der scheinoperierten Kontrolltiere befanden sich alle erhobenen Parameter (mittlerer arterieller Druck [MAD], Herzzeitvolumen [HZV] und Basendefizit) im physiologischen Normbereich. Diese Tiere wurden lediglich dem operativen Eingriff und der damit verbundenen chirurgischen Präparation unterzogen. Zur Deckung des permanenten Flüssigkeitsbedarfs während des chirurgischen Eingriffs erhielten alle Tiere der Gruppe eine basale Infusionsrate einer kolloidalen Infusionslösung (Ringerazetatlösung). Alle im Verlauf der Versuchsreihe erhobenen Parameter sprechen für eine suffiziente Aufrechterhaltung des Flüssigkeitshaushaltes mit einer ausgeglichenen Homöostase des Organismus. Geringe Schwankungen der Kreislaufparameter, die sich innerhalb der Versuchsreihe zeigten, können durch operative technische Manipulationen an den Tieren erklärt werden.

In der Schockphase zeigten die Gruppe der Tiere, welche sich unter hämorrhagischen Schockbedingungen befanden und einer anschließenden Volumensubstitution zugeführt wurden, entsprechend dem druckkonstanten Verlauf der Untersuchungen, MAD-Werte in einem Bereich von 35 bis 40 mmHg. Während der Durchführung der Schockphasen waren permanent weitere Blutentnahmen erforderlich. Ziel dieser Blutentnahmen war es, die MAD-Werte in dem o.g. Bereich zu etablieren. Der Grund für diese notwendigen Blutentnahmen sind physiologisch ablaufende Kompensationsmechanismen des Organismus, die es in dieser Phase des Schockmodells zu überwinden galt. Darüber hinaus konnten klinische Zeichen einer kardialen Dekompensation unter dem durchgeführten Schockmodell nicht beobachtet werden. Zeichen einer solchen kardialen Dekompensation des Organismus in diesem tierexperimentellen Versuchsmodell wären ein weiterer Abfall des Blutdruckes in der Schock-Phase gewesen, d.h. konkret ein spontaner Abfall der Blutdruckwerte unter 35 mmHg, darüber hinaus ein fehlender

Blutdruckanstieg nach Retransfusion mit unweigerlichem Versterben des Versuchstieres (WIGGERS/INGRAHAM 1946).

In Phasen eines hämorrhagischen hypovolämischen Schockereignisses kommt es pathophysiologisch zu einer Stoffwechsellage mit der Entwicklung einer metabolischen Azidose, die laborchemisch in einer Erhöhung des Basendefizits und abfallenden pH-Werten mündet. Diese azidotische Stoffwechsellage entsteht aufgrund eines Sauerstoffmissverhältnisses auf mikrozirkulatorischer Ebene mit vermehrtem Anfall von Laktat im Organismus, da hier vornehmlich die Energiegewinnung unter anaeroben Bedingungen (anaerobe Glykolyse) stattfindet.

Alle laborchemisch bestimmten Basendefizitwerte in unseren Versuchen, die am Ende der Schockphase bestimmt wurden, lagen in einem Bereich von ca. -10 bis -14 mmol/l (Normbereich +3 bis -3 mmol/l).

Der zu bestimmende Wert Basendefizit hat sich im hämorrhagischen Schock und in anderen Stresszuständen, die mit einer Sauerstoffschuld des Organismus einhergehen, als ein wichtiger Parameter für den kritischen Zustand des Organismus erwiesen. Hier zeigte Nishida 1996, dass im Rahmen eines solchen Schockereignisses die Bestimmung des Basendefizites mit der Schwere des hypoxischen Zellschadens einhergeht.

Neuere Untersuchungen zeigen, dass die Bestimmung der Basendefizitwerte hinsichtlich der Prognose eines Patienten auf Intensivstationen oder bei Aufnahme in die Klinik – gerade nach hämorrhagischem Schock mit Volumentherapie wie z.B. bei polytraumatisierten Patienten - eine wichtige Rolle spielt. Seit den 90-iger Jahren wurde in mehreren Studien mit ca. 8000 polytraumatisierten Patienten gezeigt, dass der Basendefizit eines Patienten im Vergleich zu verschiedenen anderen Parametern als einer der sichersten Indikatoren in Hinsicht auf Komplikationsrate, Bedarf an Transfusionen und Letalität gilt. Ebenso konnte gezeigt werden, dass eine weitere Verschiebung des Wertes in weitere negative Bereiche von der Notaufnahme bis zur Aufnahme auf eine Intensivstation als eine valide Abschätzung des späteren Risikos anzusehen ist (RIXEN 2002, SMITH 2001, WAISMAN 1993). Die Werte, die in unseren Versuchsreihen erreicht wurden, zeigen, dass es sich hier um eine ausgeprägte anämische Hypoxie handelt aufgrund des hypovolämisch-hämorrhagischen Schocks.

Nach der initial erfolgten Volumentherapie konnten nach einer Stunde, im weiteren Versuchsablauf und schließlich bis zum Ende des Versuchsprotokolls MAD-Werte und Basendefizite im Normbereich bestimmt werden. Ab dem Ende der Retransfusion bis zur

Beendigung der gesamten Versuchsreihe wurden erhöhte HZV-Werte festgestellt (mehr als 120 % von den gemessenen Ausgangswerten).

Die Erholung und Stabilisierung der Werte sprechen für eine adäquate Volumensubstitution und somit ein voll reversibles Schockmodell.

Der protokollarische Ablauf des Schockmodells mit einer Schockphase über 60 min und der sich daran anschließenden Volumentherapie orientiert sich sehr nahe an klinischen Notfallsituationen, wie sie tagtäglich auftreten.

Das Therapieschema zur Flüssigkeitssubstitution nach durchgeführter kontrollierter Hypovolämie wurde einerseits mit 60% des entzogenen Blutvolumens und andererseits mit der dreifachen Menge des entnommenen Blutvolumens an Ringerazetatlösung durchgeführt. Diese Volumentherapie führt folglich zu einer Hämodilution mit laborchemisch erniedrigten Hämoglobin- und Hämatokritwerten. Die Werte bewegen sich in einem Rahmen zwischen 8 und 9 g/dl Hämoglobin sowie Hämatokritwerten zwischen 25 und 30%. Dies sind, nach aktuellem Wissensstand, angestrebte Werte kritisch kranker Patienten im Rahmen von operativen Traumata oder hämorrhagischem Blutverlust im klinischen Alltag (SPAHN 1998, Bundesärztekammer 2009).

Zusammenfassend kann für das in der vorliegenden Studie benutzte Schockmodell gefolgert werden, dass es sich unter Volumensubstitution um ein voll reversibles und kompensiertes hämorrhagisches Schockmodell handelt. Darüber hinaus orientiert sich dieses Modell an den pathophysiologischen Zuständen, die der klinischen Realität sehr nahe kommen.

In einer Versuchsgruppe erfolgte nach fünfstündiger Dauer der Volumentherapie die Applikation von SnPP-IX. Diese SnPP-IX-Gabe zur Hemmung des HO-Stoffwechsels führte zu einer signifikanten Abnahme des MAD in der Schock-SnPP-IX Gruppe verglichen mit der Schock-Vehikel Gruppe. Sämtliche gemessenen MAD-Werte lagen allerdings weiterhin im Normbereich. Ursache für diesen Abfall des MAD in der SnPP-IX Gruppe könnten möglicherweise zentral bedingte Auswirkungen einer Hemmung des HO-Stoffwechsels sein, die im Zusammenhang mit den verabreichten Substanzen (wie z.B. Barbiturate) stehen. Auswirkungen auf das HZV konnten in der Schock-SnPP-IX Gruppe nach Applikation von SnPP-IX nicht gezeigt werden. Da ein Abfall des HZV nicht zu beobachten war, ist es unwahrscheinlich, dass es zu einem Abfall des systemischen Sauerstoffangebotes während der Untersuchungen mit gleichzeitiger Blockade des HO-Stoffwechselweges kam.

Weiterhin führt die Bildung von CO zur Vasodilatation im Gefäßsystem des Organismus. Eine generelle Blockade des autonomen Nervensystems kann diese vasodilatatorischen Eigenschaften des CO aufheben. Dies wurde an spontan atmenden Ratten nach Vorbehandlung und daraus resultierender Blockade autonomer Ganglien mit Chlorisondamin (ganglienblockierende Wirkung an nikotinergen Rezeptoren) und Prazosin (α -Adrenorezeptorantagonist) gezeigt (JOHNSON 1995). Alle Versuchstiere erhielten in unserem Versuchsablauf ausschließlich als Hypnotikum ein Barbiturat (Pentobarbital) verabreicht. Barbiturate können aufgrund ihrer Wirkungen nach Applikation zu einer Abschwächung der Regulationsmechanismen des autonomen Nervensystems führen. Der beobachtete periphere Widerstandsverlust nach der SnPP-IX Verabreichung mit nachfolgendem Blutdruckabfall könnte auf der einen Seite seinen Ursprung in der Gabe des Hypnotikums haben oder durch einen Eingriff in autonome vegetative Reflexe aufgrund des hämorrhagischen Blutverlusts und der anschließenden Volumentherapie bedingt sein (SKOVSTED 1970).

5.2 Expressionsmuster der Hämoxxygenase-1

In den durchgeführten Untersuchungen wurde die Expression von HO-1 während mehrerer Zeitpunkte mit Western blot-Analyse und Immunhistochemie untersucht. Die Charakterisierung des HO-1-Expressionsmusters erfolgte im Lebergewebe unbehandelter Kontrolltiere, sowie scheinoperierter Kontrolltiere und bei Tieren nach einer Stunde Schock mit fünf Stunden folgender Volumentherapie.

In der Leber scheinoperierter Tiere konnte lediglich am Ende des Untersuchungszeitraums eine geringe Induktion von HO-1 gegenüber unbehandelten Kontrollen gezeigt werden. Die schwache Induktion von HO-1 unter den Bedingungen der Scheinoperation kann als Reaktion auf die chirurgische Präparation gedeutet werden.

Eine deutlich verstärkte HO-1-Exprimierung auf Proteinebene konnte schließlich unter den weiteren Versuchsbedingungen des hämorrhagischen Blutverlustes und anschließender Volumensubstitution gezeigt werden.

Die Expression von HO-1 in der Gruppe der Kontrolltiere zeigte sich lediglich in den Kupfferzellen, ein Nachweis für HO-1 unter diesen Bedingungen konnte für Hepatozyten nicht erbracht werden. In der Gruppe „Schock mit Retransfusion“ konnte der Nachweis der HO-1-Expression vorwiegend in den perizentral gelegenen Regionen erbracht werden. Hier gelingt der Nachweis hauptsächlich in Hepatozyten.

In dieser Region findet sich unter diesen Bedingungen eine hohe Konzentration freier Sauerstoffradikale.

Ewing und Mitarbeiter setzten Ratten einer Hyperthermie von 42°C für 20 min aus und untersuchten die HO-1-Induktion eine Stunde und sechs Stunden nach Ende der Hyperthermiephase (EWING 1994, RAJU 1994). Sie konnten nach einer Stunde im Herz und in der Aorta eine maximale HO-1 mRNA-Konzentration nachweisen mit einer Induktion um das 10- bis 32-fache verglichen mit einer unbehandelten Kontrollgruppe.

Rensing und Mitarbeiter zeigten, dass nach hämorrhagischem Schock mit Volumentherapie eine HO-1-Induktion stattfindet, indem sie nach drei Stunden erhöhte HO-1-mRNA und nach sechs Stunden erhöhte HO-1-Proteinmengen bestimmen konnten (RENSING 1999). Dass diesen Ergebnissen auch eine funktionelle Relevanz für die Blutflussregulation zuzuschreiben ist, zeigt nicht nur der deutlich verringerte portale Widerstand in der Schockgruppe ohne HO-Blockade gegenüber der Kontrollgruppe, sondern auch der vorübergehende Anstieg des portalen Strömungswiderstandes nach HO-Blockade (PANNEN 1998).

2004 konnte in einer tierexperimentellen Studie nach hypoxischer Präkonditionierung und anschließendem I/R-Ereignis ebenfalls eine gesteigerte HO-1-Expression in der Leber gezeigt werden. Hierzu wurden die Tiere 15 Stunden täglich einer simulierten Höhenexposition von 5500 m über zwei Wochen ausgesetzt, um eine chronische Hypoxie zu erzeugen. Die Erzeugung der Ischämie erfolgte über eine Ausschaltung der linken Leberarterie über 45 min und anschließender Reperfusion von 180 min (LAI 2004). Neben weiteren Daten, die diese Ergebnisse exakt für die Leber belegen (RENSING 2001, OHLMANN 2003, SCHMIDT 2004), konnte dies ebenso für weitere Organe, wie z.B. das Lungengewebe nach Hypoxie oder das Pankreas nach I/R gezeigt werden (GASPARRI 1999, FU 1997, VON DOBSCHUETZ 2008). Diese Ergebnisse stehen also alle im Einklang mit einer verstärkten Aktivierung von HO-1 unter hypoxisch-hämorrhagischen Stressbedingungen. Allerdings bleibt festzuhalten, dass die unterschiedlichen Zeitpunkte des verstärkten Nachweises der HO-1-Genexpression abhängig von den untersuchten Geweben und vom jeweiligen Stressereignis zu beobachten sind.

Untersuchungen an der Niere oder Gliazellen zeigen, dass hier bereits zwei Stunden nach dem auslösenden Stressereignis die Expression der HO-1-mRNA erhöht sein kann (SHIBAHARA 1987, KAIZU 2003). Hier liegen unsere Daten im Einklang mit den bisherigen Untersuchungen mit I/R der Leber, die zeigen, dass eine Induktion der HO-1

in der Leber etwa drei Stunden nach Versuchsbeginn auf Ebene der mRNA und nach etwa sechs Stunden auf Proteinebene nachweisbar ist (RENSING 1999).

Der Nachweis der HO-1-Proteinexpression mit Immunhistochemie bestätigte die mit Western blot Analyse gezeigte Induktion von HO-1 nach hämorrhagischem Schock und Volumentherapie. Diese Induktion erfolgte hauptsächlich in den Hepatozyten der Perizentralregion der Leber. Dagegen war die HO-1-Expression in der Gruppe der scheinoperierten Kontrolltiere nur schwach ausgeprägt und war auf Nichtparenchymzellen beschränkt.

5.3 Auswirkungen der Hemmung der HO-1-Expression nach hämorrhagischem Schock und Volumentherapie auf den hepatozellulären Schaden

HO-1 wird unter physiologischen Bedingungen überwiegend in der Milz sowie in den Kupfferzellen der Leber exprimiert. Unter Auslösung von oxidativem Stress, wie z.B. einem hämorrhagischen Schock mit Volumentherapie, kann die enzymatische Aktivität stark ansteigen. Dieser Aktivitätsanstieg beruht auf einer gesteigerten Expression der HO-1 mRNA und nachfolgender Induktion von HO-1 Protein. Die Regulation der HO-1-Expression erfolgt dabei posttranskriptionell (BAUER I 1998). Die exakte Rolle der HO-1-Induktion, die eine solche I/R-Situation auslöst, sowie die genaue biologische Funktion der einzelnen anfallenden Stoffwechselprodukte, ist bis heute noch nicht im Detail geklärt. Um den Einfluss des Enzyms auf die Entwicklung eines hepatozellulären Schadens zu beurteilen, wurde der geschwindigkeitsbestimmende Schritt im HO-Stoffwechsel blockiert. Diese substratspezifische Blockade der HO-Aktivität wurde mit SnPP-IX durchgeführt, einem kompetitiven Hemmstoff der HO-Aktivität. Die Injektion von SnPP-IX erfolgte sechs Stunden nach Beginn des Versuchprotokolls, d.h. nach einer Stunde hämorrhagischem Schock gefolgt von einer fünfstündigen Reperfusion. Dieser Zeitpunkt der Blockade des HO-Stoffwechsels entspricht dem Zeitpunkt der maximalen Induktion von HO-1 nach Durchführung des hämorrhagischen Schocks mit Volumentherapie.

Als sensitiver und spezifischer Parameter des hepatozellulären Schadens wurde im Serum α -GST Konzentration bestimmt.

Hier zeigte sich ein signifikanter Anstieg der α -GST Werte bei Tieren, welche unter der Blockade des HO-Stoffwechselweges mit SnPP-IX gegenüber den Tieren, welche nicht unter Blockade des HO-Stoffwechsels standen. Folglich führt eine Blockade der HO-

Aktivität zu einem Anstieg des Leberzellschadens, was umgekehrt den protektiven Einfluss der HO-1 unter Bedingungen des hämorrhagischen Schockes und Volumentherapie vermuten lässt. Bereits 1995 wurde von Camhi die These aufgestellt, dass es sich bei HO-1 um ein oxidatives Stressprotein handelt (CAMHI 1995). Die Blockade der HO-Aktivität führt in der Leber zu einem Anstieg des Gefäßwiderstandes und zu einem verminderten Blutfluss (SCHMIDT 2004, BAUER 1996), was auch am isoliert perfundierten Organ gezeigt werden konnte (SUEMATSU 1995). Diese Tatsache lässt sich am ehesten durch die Auswirkungen der CO-Bildung nach Schockinduktion und Volumentherapie im intrahepatischen Blutfluss erklären. In der Niere zeigten sich in einem Sepsismodell vergleichbare Ergebnisse. Hier zeigte sich ein verminderter renaler Blutfluss durch Hemmung der HO-Aktivität und im Gegensatz dazu eine verbesserte glomeruläre Filtrationsrate ohne vorhergehende Blockade, was eine protektive Wirkung unterstreicht. (POOLE 2007). Auch Nath konnte 1992 protektive Eigenschaften durch Induktion der HO-1 unter der Ausprägung einer Rhabdomyolyse zeigen (NATH 1992).

Unterschiedlich schwere Ausmaße eines Leberschadens, z.B. aufgrund eines I/R-Ereignisses, Paracetamolintoxikation oder Abstoßungsreaktionen nach Transplantation können durch die Bestimmung der Serumkonzentrationen unterschiedlicher leberspezifischer Enzyme quantifiziert werden. Hierzu gehören neben der α -GST die labortechnisch bestimmbaren Schadensparameter ALT (Alanin-Aminotransferase), AST (Aspartat-Aminotransferase) sowie GLDH (Glutamatdehydrogenase) und LDH (Laktatdehydrogenase) (ROSEN 1998).

Da unterschiedliche Arten von Leberzellschädigungen aufgrund primärer pathophysiologischer Ereignisse auftreten können, werden Untersuchungen forciert, die ein spezifisches Enzym herauskristallisieren, welches eine hohe Sensitivität und Spezifität für den jeweiligen pathologischen Zustand erfüllt. Erhöhte Werte der α -GST-Serumkonzentration konnten bereits in den 80iger Jahren bei Paracetamolintoxikationen und chronischer Hepatitis nachgewiesen werden (BECKETT 1985, NELSON 1995). Daneben konnten Anstiege durch hämorrhagische Schockzustände (REDL 1995) oder das Krankheitsbild Sepsis (KOO 2000) ausgelöst werden. Von Vorteil sind darüber hinaus eine kurze Plasmahalbwertszeit und eine sehr homogene Verteilung in der gesamten Leber (REDL 1995).

Aus diesen oben geschilderten Studien kann nun gefolgert werden, dass α -GST als ein sehr guter Indikator für Leberzellschädigung unterschiedlicher Ätiologie anzusehen ist.

Die Transaminasen AST und ALT konnten in diesen Untersuchungen keine solch exakten Ergebnisse bezüglich ihrer Sensitivität und Spezifität liefern.

α -GST bietet sich schon durch ihre hohe Konzentration im Zytosol der Hepatozyten (ca. 4-5 % des gesamten Leberproteins (HILEY 1988, HAYES 1991)) für Untersuchungen einer vorliegenden Leberschädigung an. Während des Unterganges von Lebergewebe kommt es zum Übertritt von α -GST ins Serum. Die Serumkonzentration liegt physiologisch beim gesunden Menschen sehr niedrig und beträgt 0,7-14 $\mu\text{g/l}$ (PLATZ 1999).

Vorteile der Bestimmung gegenüber den übrigen o.g. Leberschadensparametern sind bereits durch mehrere Untersuchungen belegt. Der histologische Nachweis für α -GST lässt sich sowohl in den perizentralen, als auch in den periportalen Regionen der Leberläppchen durchführen (HILEY 1988). Da dieser Nachweis auch in der perizentralen Region der Leberläppchen festgestellt werden kann, besteht die Möglichkeit, sehr früh hypoxisch bedingte Nekrosen der Hepatozyten zu erkennen. So konnte experimentell mit Hilfe hepatotoxischer Stoffe bei Untersuchungen an Ratten gezeigt werden, dass eine verstärkte Expression in zentrolobulären Regionen zu finden ist (GIFFEN 2002, Übersichtsartikel in OZER 2008).

5.4 Protektionsmechanismen des HO-Stoffwechsels

Ein hämorrhagischer Schockzustand mit einem Missverhältnis zwischen O_2 -Angebot und -Bedarf auf zellulärer Ebene mit der Konsequenz funktioneller und struktureller hypoxischer Gewebsveränderungen führt an den unterschiedlichen Organen des Organismus zu schwerwiegenden Störungen wie beispielsweise der Entwicklung eines ARDS (acute respiratory distress syndrome) in der Lunge (Inzidenz 100%, Letalität 55%), einem akuten Nierenversagen (Inzidenz 67%, Letalität 60%), einer Mukosa-Störung im Darm oder einem akuten Leberversagen (Letalität 64%) (FAIST 1983, SEEKAMP 1991). Ursächlich wird eine komplexe Kombination von Störungen der Mikrozirkulation, Dysregulation der Immunantwort und das Phänomen I/R angesehen (CRYER 1999). Eine Wiederherstellung der Makrohämodynamik, wie sie nach therapeutisch wirksamer Volumentherapie auftritt, kann in der Mikrostrombahn der Leber zu einer persistierenden Perfusionsheterogenität mit nachfolgendem Untergang von Leberparenchymzellen führen (CLEMENS 1997, VOLLMAR 1996).

Der Aktivierung der HO-1 und damit der verstärkten Bildung der einzelnen Stoffwechselprodukte des HO-Stoffwechsels werden hier protektive Eigenschaften gegen eine Leberschädigung zugeschrieben (RENSING 1999).

Das entstandene CO kann eine protektive Wirkung auf die Durchblutungsregulation der Sinusoide ausüben. Diese Tatsache wird dadurch unterstützt, dass diese nach Verabreichung eines Hemmstoffs der HO-Aktivität gestört ist. Suematsu et al zeigten 1994 erstmals, dass es in der isolierten perfundierten Leber nach spezifischer Blockade der endogenen Produktion von CO durch das Substratanalogon SnPP-IX zu einem Anstieg des portalen Strömungswiderstandes in den Gefäßen kommt. Dieser Effekt war durch die Zufuhr von exogenem CO bzw. durch den Zusatz eines cGMP-Analogons zur Perfusionslösung umkehrbar (SUEMATSU 1994/1995). Bauer et al. konnten einen vergleichbaren Anstieg des portalen Strömungswiderstandes auch nach Blockade der HO-Aktivität *in vivo* im Tiermodell nachweisen (BAUER 1996). Die Verringerung des portalen Strömungswiderstandes scheint also von daher ebenfalls durch die CO-vermittelte Relaxation der glatten Muskulatur in der Pfortader verursacht zu sein (PANNEN 1998). Dies wiederum geht mit einer niedrigen Produktionsrate an Galle (SUEMATSU 1994) und darüber hinaus einer Zunahme der läppchenzentralen Nekrosen einher (RENSING 1999, FORESTI 1999).

Reaktive Sauerstoffspezies führen in der Folge zu Membranstabilität und es werden apoptotische Vorgänge in den einzelnen Zellen ausgelöst. CO kann hier die betroffenen Zellen, wohl am ehesten durch Vermittlung antiapoptotischer und antiinflammatorischer Prozesse, schützen. Ein möglicher Mechanismus der Protektion durch CO kann dabei die Hemmung der Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine sein (OTTERBEIN 2000). Biliverdin entsteht über verschiedene Zwischenprodukte unter Katalyse der HO aus Häm und wird umgehend zu Bilirubin umgewandelt. Der weitere Stoffwechsel findet in der Leber statt, daher muss das noch unkonjugierte, lipophile Bilirubin mit dem Blutstrom dorthin transportiert werden. Biliverdin und Bilirubin als potente antioxidativ wirksame Substanzen sind schon vielfach in ihren Auswirkungen auf Zellschädigung unterschiedlicher Ursache untersucht worden. So konnte die antioxidativ vermittelte antithrombotische Wirksamkeit von Bilirubin mit Hilfe der Intravitalmikroskopie belegt werden (LINDENBLATT 2004). Weiterhin kann Biliverdin die Lipidperoxidation hemmen und antioxidativ in Verbindung mit α -Tocopherol und Lipoprotein wirken. Darüberhinaus konnte durch die einmalige Zufuhr des unspezifischen zellgängigen Antioxidans Trolox (wasserlösliches Vitamin E-Analogon) eine signifikante Reduktion der HO-1-Induktion

erzielt werden. Interessanterweise war dieser Effekt nur in den Parenchymzellen nachweisbar, auf die HO-1-Induktion in nichtparenchymatösen Zellen (Endothelzellen, Kupferzellen) hatte Trolox keinen Einfluss, so dass in diesen Zelltypen die Induktion unterschiedlich reguliert ist. Zudem führte die Gabe von Trolox zu einer signifikanten Verringerung der durch hämorrhagischen Schock mit Volumentherapie induzierten Leberzellschädigung, die anhand der α -GST Werte quantifiziert wurde (RENSING 1999). Ein weiterer möglicher Mechanismus der Zytoprotektion durch die Induktion der HO-Aktivität liegt in der Freisetzung von Eisen aus dem Häm-Molekül. Erhöhte intrazelluläre Eisenspiegel führen zwar zu Apoptose, durch freies Eisen wird jedoch eine Eisen-ATPase induziert, die Eisen aus der Zelle pumpt und somit das oxidative Potential in der Zelle und die Apoptoserate vermindert. Weiterhin wird gleichzeitig mit der HO-1 Ferritin induziert, welches als Speicherprotein für freies Eisen dient. Die Aktivität der HO-1 resultiert also in Freisetzung von Eisen mit konsekutivem Abfangen desselben mittels Ferritin und Transportproteinen und daraus resultierend einem Schutz vor den widrigen Effekten des freien Eisens.

5.5 Ergebnisse und Limitierung einer Mikroarrayanalyse

5.5.1 Grenzen der Mikroarraytechnologie

Die Mikroarraytechnologie wird heutzutage in vielfältiger Art und Weise in der Analyse des Genoms und in Untersuchungen zur differentiellen Genexpression eingesetzt. Hier besteht die Möglichkeit, die RNA-Menge einzelner Gene zu bestimmen und darüber hinaus können auch Genaktivitäten vieler Gene parallel untersucht werden.

Wird nun eine solche große Zahl an Genen parallel untersucht, interessiert der Vergleich der Expressionsstärke auf zellulärer Ebene in Gewebeproben, die sich unter physiologischen homöostatischen Bedingungen befinden gegenüber pathologischen Zuständen. Der Fortschritt, den diese Technik erbrachte, zeigt sich nun darin, dass es möglich erscheint, tausende von Genen und Genprodukten parallel und gleichzeitig zu analysieren. Die Anwendung dieser Mikroarraytechnologie kann Hinweise auf den Status von physiologischen Regulationsmechanismen, biochemischen Wechselwirkungen und Signaltransduktionswegen geben. So soll z.B. eine Verbesserung des Verständnisses darüber erzielt werden, wie ein Organismus auf generalisierte Infektionen reagiert, und damit die Entwicklung von zielsicheren Diagnosekriterien und Behandlungsansätzen

unter dem klinischen Erkrankungsbild der Sepsis erleichtert werden (RUSSWURM 2003).

Damit die Qualität und Aussagekraft der einzelnen Arrays erhöht wird, sollte daher parallel mit Hilfe von alternativen Technologien eine Auswertung erfolgen. Bei den traditionellen Methoden Southern- oder Northern-Blot Analyse gibt es häufig, neben den gesuchten Banden, noch schwächere Banden, die in einzelnen Blots sichtbar werden und somit eindeutige Aussagen zur Ergebnisauswertung und Interpretation erschweren. Ursache hierfür ist eine sogenannte Teilkomplementarität, die solche weitere Banden sichtbar werden lassen. Bei einem Mikroarray werden nun parallel Tausende von Hybridisierungsvorgängen durchgeführt. Hierdurch können sich durchaus auch solche Fehlhybridisierungen potenzieren. Ebenso sind weiterhin die Art des Waschens und die Bedingungen, unter der die Hybridisierung abläuft, entscheidend für die Fehlerrate (STÜTZ 2006).

Eine weitere Schwierigkeit kann bei der Untersuchung von inhomogenen Geweben auftreten. Ein Beispiel für ein absolut inhomogenes Gewebe stellt Untersuchungsmaterial aus Tumorgewebe dar. Hier sollte versucht werden, gezielt Material zu gewinnen, um Zellen nur eines einzelnen Typs untersuchen zu können (HACIA 1999).

Der in der vorliegenden Untersuchung verwendete Atlas Rat Toxicology 1.2 Array[®] der Firma Clontech ist ein spezieller Array, der zur Untersuchung des Expressionprofils unter Stressbedingungen des Organismus abgestimmt ist. Zur Qualitätssicherung enthält das Produkt neun „House keeping“-Gene, deren Expression sollte von den spezifischen Untersuchungsbedingungen nicht beeinflusst werden.

5.5.2 Ergebnisse

Gene, die in der SnPP-IX-Behandlungsgruppe verglichen mit der Vehikel-Kontrollgruppe Unterschiede im Expressionslevel von 1,4-fach und größer zeigten, wurden nach Angaben des Herstellers als differentiell exprimiert definiert. Alle weiteren Gene, die diese 1,4-fache Expressionsschwelle nicht erreichten, wurden folglich auch nicht berücksichtigt. Dieser Schwellenwert einer 1,4-fachen Veränderung der Genexpression ist ein gebräuchlicher Wert, der verwendet wird, um möglichst viele der differentiell exprimierten Gene zu identifizieren. Dieser Wert ist lediglich für sehr schwach exprimierte mRNAs ungeeignet, da dadurch die Anzahl falsch positiver differentiell exprimierter Gene deutlich zunimmt (mündliche Mitteilung der Fa. Clontech). Vergleichbare Werte der Festlegung einer differentiellen Genexpression sind auch in der aktuellen Literatur

beschrieben (JOSEPH 2008). Allerdings gibt es Untersuchungen, in denen die Kriterien strenger definiert sind und die lediglich solche Gene als differentiell exprimiert charakterisieren, sobald die Unterschiede in der Expression $\geq 2,0$ -fach sind (KOWARA 2005, MITSIOS 2007, THIRIET 2002).

Da die Anzahl an unterschiedlichen Proben einer Versuchsbedingung, die mit Mikroarray-Analyse untersucht werden kann, begrenzt ist, muss eine mit Mikroarray-Technologie gezeigte differentielle Genexpression in jedem Falle mit weiteren Techniken wie RT-PCR mit einer größeren Anzahl an Proben näher untersucht und so gegebenenfalls bestätigt werden.

In der aktuellen Untersuchung mit der Mikroarray-Analyse wurden schließlich 69 differentiell exprimierte Gene in unterschiedlichsten Gruppen katalogisiert.

Die unterschiedlich eingruppierten Gene stammten in unserer Versuchsreihe aus den beiden Untersuchungsgruppen Shock-Vehikel und Shock-SnPP-IX.

Aus jeder dieser beiden Gruppen wurde jeweils nur die RNA der Leber eines Tieres zur Untersuchung bereitgestellt. Die Anzahl der untersuchten Tiere wirft zwangsläufig die Frage auf, ob dies eine ausreichende Menge an untersuchten Populationen ist, um signifikante Ergebnisse zu erwarten, was die verstärkte oder abgeschwächte Exprimierung einzelner Gene unter den Bedingungen des hämorrhagischen Schocks mit Blockade des HO-Stoffwechsel betrifft. Es muss davon ausgegangen werden, dass nach Blockade des HO-Stoffwechsels mit SnPP-IX nicht alle Tiere zu 100% identisch reagieren. Somit ist mit einer gewissen biologischen Variabilität, auch der Veränderung der Genexpression im Hinblick auf eine x-fache Hoch- oder Herunterregulierung, zu rechnen. Diese Frage kann daher wohl mit Nein beantwortet werden und in der Folge sollten noch weitere Untersuchungen mit größeren Populationen durchgeführt werden, um eine ausreichende Power zu erreichen. Neuere Array Untersuchungen werden auch – unabhängig von der jeweiligen Fragestellung – mit RNA-Mengen eines Untersuchungspools durchgeführt. Das Ziel biometrischer Verfahren von Tierversuchen ist die Verallgemeinerung der empirischen Beobachtungsergebnisse auf eine Population, d.h. ein Rückschluss von einer Stichprobe (den konkret untersuchten Tieren) auf eine (fiktive) Gesamtheit (z.B. aller prinzipiell möglichen Tiere) unter kontrollierten Fehlentscheidungsrisiken bzw. inferentiellen Gütekriterien. Ziel ist eine Abgrenzung des Versuchsergebnisses vom Zufall. Hauptsächlich verwendet man hierzu statistische Tests (zur Prüfung von Hypothesen, z.B. für inter- und intraindividuelle Vergleiche) und

statistische Schätzungen (für Effektmaße, z.B. Anteil einer Respondergruppe) (GÄBLER 1996).

Die vorliegende Untersuchung kann daher als eine erste „Screening“-Untersuchung für Effekte der Blockade des HO-Stoffwechsels nach hämorrhagischem Schock mit Volumentherapie angesehen werden. Es fällt allerdings in den beiden untersuchten Gruppen auf, dass ganze Gengruppen eine gleichgerichtete eindeutige Hoch- oder Herunterregulierung zeigen.

Aufgrund der vorgegebenen Einteilung des Arrays ist in den Gruppen:

- „Chaperons and heat shock proteins“
- “Heat shock proteins”
- “Intracellular kinase Network members”
- “Transcription Activators and Repressors”

immer eine Hochregulierung unter unseren Versuchsbedingungen festzustellen.

Im Gegensatz dazu ist in den Gruppen:

- „Xenobiotic metabolism“
- „Xenobiotic transporter“

durchgehend eine Herunterregulierung feststellbar.

Nach Ereignissen, die mit I/R vergesellschaftet sind, wird häufig die Exprimierung und Aktivierung von Hitzeschockproteinen beobachtet. Neben dem Stressfaktor Ischämie ist bekannt, dass verschiedene weitere Stressoren die Expression von Hsp induzieren (BAUER I 1998, BINI 2008). Zuerst entdeckt wurde ihre Expression unter erhöhten Temperaturen, die auf die Homöostase des Zellstoffwechsels einwirken. Die Exposition von Zellen mit Schwermetallen, Proteinkinase-C-Stimulatoren, Ca^{2+} -Konzentrationserhöhenden Stoffwechselmetaboliten, Ischämie, Infektionen, NO, Hormonen und Medikamenten (v.a. Antibiotika) können die Expression von Hsp induzieren. Durch ihre Ausschüttung werden Schutzmechanismen der Zelle aktiviert. Die Hsp haben außerdem auch unter Ruhebedingungen wichtige Funktionen, so sind sie für die korrekte Faltung, Zusammenlagerung, den Transport und den Abbau von Proteinen unabdingbar (ELLIS 1989). In der Gruppe der Hsp zeigte sich bei fünf der mit Mikroarray untersuchten Hsp eine unterschiedliche Expression, wobei vier der differentiell exprimierten Gene hochreguliert, eines herunterreguliert waren. Unter den hochregulierten Hsp spielt hier

insbesondere Hsp90 eine wichtige Rolle. Untersuchungen zeigten, dass die Hsp, insbesondere der Familie der Hsp70-Proteine und Hsp90-Proteine, in verschiedene Reifeprozesse der Proteinentwicklung eingebunden sind und hierbei eine bedeutsame Rolle einnehmen (WELCH 1992). Die molekularen Chaperone Hsp70 und Hsp90 sind verantwortlich für die Faltung und Aktivierung körperlicher Substrateiweiße. Zu den wichtigsten Vertretern von Hsp70- und Hsp90-abhängigen Proteinen zählen Steroidhormonrezeptoren, Transkriptionsfaktoren, Kinasen und auch das Tumorsuppressor Protein p53. Erhöhte Hsp90-Level in humanen Krebszellen weisen auf einen potentiellen Zusammenhang von Tumorwachstum und Überleben hin (CHEN 1996).

Das Zusammenspiel und die Interaktion dieser beiden Hsp sind von enormer Wichtigkeit für das Überleben von Zellen und Organismen (WEGELE 2004). Hsp90 ist z.B. maßgeblich daran beteiligt, dass einfache Aminosäureketten zu funktionierenden Proteinen mit einer genau definierten räumlichen Struktur gefaltet werden. Besonders unter Bedingungen, bei denen die Zelle durch Hitze, Vergiftungen oder Sauerstoffmangel hohem Stress ausgesetzt ist, kommt es zu einer verstärkten Hsp90-Expression.

Die notwendige Energie für seine Funktion gewinnt Hsp90 durch die langsame Spaltung von ATP. Dabei ändert sich die Gestalt des Proteins. Wie bei einer makroskopischen Maschine bewegen sich einzelne Teile gegeneinander, allerdings nur um einige Nanometer (HESSLING 2009).

Die Zelle bekommt hier erst die Möglichkeit, adäquate Reaktionen auf pathophysiologische Belastungsreaktionen zu zeigen, unter der Vorstellung, dass das Hauptziel zellulären Stresses in der Proteinsynthese befindliche Proteine sind bzw. Proteine, die aus diesen Situationen heraus, neu synthetisiert werden. Eine sehr hohe Konzentration von Hsp70 lässt sich im Nukleus und Nukleolus von Zellen, die einem Hitzeschock unterzogen wurden, eindeutig zeigen (PELHAM 1984, VELAZQUEZ 1984, WELCH 1984).

Aufgrund ihrer antiinflammatorischen, antioxidativen und antiapoptotischen Eigenschaften zählt die HO-1 zu einem der bedeutensten protektiven Proteine des Organismus. Bei der Regulation der HO-1-Expression spielen aktivierte Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B, AP-1 und AP-2 und deren Bindung in der Promotorregion des HO-1-Gens eine wichtige Rolle. Diese werden als wichtige regulatorische Elemente der HO-1-Induktion als Antwort auf oxidativen Stress,

Zellschaden, Wachstum und unterschiedliche zelluläre Differenzierungsprozesse angesehen (ELBIRT 1999, MORITA 2005).

Hämorrhagischer Schock mit Volumentherapie führt, wie auch in der vorliegenden Untersuchung gezeigt, zu einer Induktion der Expression von HO-1.

Nach Blockade der HO-Aktivität mit SnPP-IX zeigte die HO-1 von allen untersuchten Genen die stärkste Überexprimierung um den Faktor 13,2. Die beobachtete starke Veränderung der HO-1-Genexpression ist dadurch zu erklären, dass SnPP-IX als falsches Substrat der HO die Expression von HO-1 mRNA und Protein induziert, gleichzeitig wird jedoch die Gesamt-HO Aktivität gehemmt.

In der Gruppe „Metabolism of cofactors, vitamins and related substances“ zeigen sich unter den o.g. Bedingungen neben der HO-1, die den höchsten Wert der Überexprimierung zeigt (13,2-fach), die Glutathion-S-Transferase (GST) und die Aldehyddehydrogenase als hochregulierte Gene.

GST gehört zu einer Multigen-Familie von Enzymen, die viele verschiedene exogene und endogene Stoffe entgiften, seltener auch aktivieren. In der menschlichen Leber stellen sie bis zu 4% der löslichen Proteine dar und katalysieren die Anlagerung von Glutathion an eine Vielzahl von potentiell genotoxischen Produkten. Anfallende Wasserstoffperoxide werden durch Katalasen oder Glutathionperoxidasen zu H_2O und O_2 detoxifiziert. Katalasen finden sich in Peroxisomen und metabolisieren ausschließlich die oben beschriebene H_2O_2 -Abbaureaktion. Die Glutathionperoxidase hat auch ihren Anteil an der Entgiftung organischer Hydroperoxiden (z.B. Lipidhydroperoxid). Bei dieser Reaktion entsteht aus zwei Molekülen Glutathion (GSH) die oxidierte Form Glutathiondisulfid (GSSG), die durch Reaktion der Glutathionreduktase unter Verbrauch von NAD(P)H wieder in GSH überführt werden kann (JONES 1981). Unter pathophysiologischen Bedingungen, wie zum Beispiel im I/R-Syndrom, reicht die Kapazität der endogenen Mechanismen zur Entgiftung freier Sauerstoffradikale nicht aus. Durch den massiven Anfall von Sauerstoffradikalen in der frühen Reperfusionphase kommt es zum zellulären Verbrauch von GSH. Die Reaktion der Glutathionreduktase ist jedoch aufgrund des zellulären Mangels an Energieträgern (z.B. ATP) deutlich vermindert. In der Folge führen die Radikale über bereits genannte Mechanismen zur zellulären Dysfunktion und im Makroorganismus schließlich bis hin zu einem irreversiblen Organversagen. Jennische beobachtete am I/R-Modell der Leber, dass ein Mangel an Glutathion, pharmakologisch oder diätetisch induziert, in einem weitaus intensiveren hepatozellulären Schaden nach I/R mündet als in Lebern mit physiologischem GSH-Gehalt (JENNISCHE 1984).

Marubayashi et al. infundierten Ratten exogenes Glutathion vor Beginn der Ischämiephase. Es zeigte sich eine gesteigerte Resynthese von ATP sowie eine deutlich verminderte Bildung von Lipidperoxiden nach Reperfusion (MARUBAYASHI 1986). Daraus wird deutlich, dass dem Glutathionsystem eine herausragende Rolle in der Entgiftung freier Sauerstoffradikale im I/R-Syndrom zukommt.

In der vorliegenden Studie zeigte sich ein signifikanter Anstieg der α -GST-Serumkonzentration nach hämorrhagischem Schock mit Volumentherapie als Marker einer Leberschädigung, mit einer weiteren signifikanten Zunahme nach Blockade des HO-Stoffwechsels mit SnPP-IX. Dieser Nachweis auf Proteinebene mit ELISA war auf Ebene der mRNA, hier mit Mikroarray, nicht zu verzeichnen. Die hepatische mRNA-Expression der α -GST war unverändert nach Blockade des HO-Stoffwechsels mit SnPP-IX verglichen mit der Vehikelkontrolle. Es ist hierbei allerdings zum Einen durchaus denkbar, dass die erhöhte Serumkonzentration an α -GST darauf beruht, dass geschädigte Leberzellen das Protein in den Extrazellulärraum freisetzen, was letztendlich zu einem Eintritt in die Zirkulation und damit erhöhten Serumkonzentrationen einhergeht, ohne dass eine Veränderung der Transkription der mRNA zugrunde liegt. Eine weitere mögliche Erklärung ist, dass die mRNA-Konzentration wieder auf das normale Niveau gefallen ist, während der nachfolgende Proteinanstieg zu diesem Untersuchungszeitpunkt noch eine signifikante Induktion zeigt. Da in der vorliegenden Untersuchung die Expression von α -GST-Protein als Serummarker im zeitlichen Verlauf untersucht wurde, nicht jedoch die Expression der mRNA in der Leber zu jedem Untersuchungszeitpunkt, kann eine abschließende Aussage über den exakten zeitlichen Verlauf der Expression von α -GST-mRNA und Protein in der Leber nicht gemacht werden.

Die einzelnen Isoenzyme der GST können unter verschiedenen pathophysiologischen Bedingungen unterschiedlich reguliert werden. Im Gegensatz zu α -GST war die mRNA eines weiteren Isoenzym, der GST-Yb2, das z.B. bei pathophysiologischen Zuständen wie Hyperbilirubinämie, induziert ist, erhöht. Zu Serumkonzentrationen des Isoenzym GST-Yb2 gibt es unter den Bedingungen des hämorrhagischen Schocks mit Volumentherapie bisher keine Untersuchungen.

Eine verstärkte Expressierung der Alkoholdehydrogenase (ADH) unter den Bedingungen der I/R ist in unserem durchgeführten Mikroarray nicht zu beobachten, sondern eine Herunterregulierung des Hauptenzym der Oxidation von Alkohol zu Acetaldehyd. Dieser

erste Schritt im Abbau von Alkohol in Säugetieren ist ein reversibler chemisch katalysierter Vorgang. Weitere Organdysfunktionen, die aus einer I/R-Situation resultieren, enden allerdings in einem Anstieg der ADH. Unter den Bedingungen der Mesenterialischämie und einem nachfolgenden I/R-Ereignis ist ein deutlicher Anstieg von ADH zu verzeichnen. Hier in unserem durchgeführten Mikroarray zeigt sich lediglich die Subgruppe ADH 1 erniedrigt, bei allerdings neun verschiedenen ADH Enzymen, die hier unterhalb des geforderten Unterschieds des Expressionslevels von 1,4-fach zu finden sind (GUMASTE 2005).

Auch klinisch haben in der Pathophysiologie der Leber die beiden Laborparameter ADH und α -GST, neben weiteren Labormesswerten, ihren Stellenwert zur Abschätzung eines Leberschadens.

Weiterhin ist eine Erhöhung der Superoxiddismutase (SOD) als einem Vertreter der Stressproteine feststellbar. Hier wurde eine deutliche, 2,7-fache, Hochregulierung gemessen.

Die SOD ist wahrscheinlich das wichtigste intrazellulär und auch extrazellulär vorkommende antioxidativ wirkende Enzym. Dieses Enzym befindet sich überwiegend im Intrazellulärraum, wo sie das Superoxidanion zu H_2O_2 und O_2 dismutiert und somit wird die intrazelluläre Superoxidanion-Konzentration niedrig gehalten (HAGLUND 1991). Erhöhte Konzentrationen dieses Enzyms finden sich hauptsächlich in Erythrozyten und Hepatozyten wie Winterbourn und Mitarbeiter bereits 1985 publizierten. Das anfallende H_2O_2 wird durch Katalase oder Glutathionperoxidase zu H_2O und O_2 detoxifiziert. Eine Induktion der SOD könnte unter den hier untersuchten Bedingungen dazu beitragen, eine fehlende anti-oxidative Aktivität der HO nach Applikation von SnPP-IX zu kompensieren.

Da es sich um erste Screening-Untersuchungen in Bezug auf den HO-Stoffwechsel unter Schockbedingungen handelte, wurden mit dem Ziel, regulierende Gene der Apoptose-Kaskade zu untersuchen, diese herausgegriffen und mit RT-PCR eine weitere Analyse einer größeren Anzahl von Proben durchgeführt.

Hierzu wurden Annexin V, TNF Rezeptor, Caspase-3 und Fas-Ligand näher untersucht. Nach HO-Blockade wurde mit Mikroarray-Analyse eine um das 1,7-fache erhöhte Expression von Annexin V gezeigt. Dies deutet darauf hin, dass eine Blockade des HO-Stoffwechsels eine Hochregulierung des Apoptose regulierenden Annexin V nach sich zieht. In einem Umkehrschluss kann damit gezeigt werden, dass die antiapoptischen Effekte unter HO-1-Expimierung und hier wahrscheinlich vermittelt durch das

entstehende CO gewährleistet wären. Allerdings ist dieses Ergebnis unter der Berücksichtigung zu interpretieren, dass lediglich eine tendenziell verstärkte Induktion von Annexin V mit RT-PCR nachweisbar ist, ohne ein relevantes Signifikanzniveau zu erreichen. Weiterhin ist eine Hochregulierung auch für den untersuchten TNF-Rezeptor zu beobachten. Die mit Mikroarray-Analyse nachgewiesene Induktion ist schwach ausgeprägt, allerdings konnte hier mit RT-PCR eine signifikante Induktion gezeigt werden. Auch dies würde bedeuten, dass hier der antiapoptotische Effekt von HO-1 unter der Blockade der HO-Aktivität verloren geht. Die Genexpression von Fas-L und Caspase-3 waren nach Blockade des HO-Stoffwechsels nahezu unverändert, wie mit Mikroarray gezeigt. Auch die RT-PCR-Analyse einer größeren Anzahl an Proben konnte keine signifikante Veränderung der Expression der beiden Gene zeigen. Die gefundenen Ergebnisse der Expression von Fas-Ligand und Caspase-3 lassen somit keine Interpretation bezüglich pro- oder antiapoptotischer Effekte der HO in diesem Modell zu. Vor diesem Hintergrund muss die Anzahl der untersuchten Tiere pro Gruppe kritisch hinterfragt werden. Hier sind weitere Untersuchungen zu fordern, um eindeutige Aussagen treffen zu können.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass unter Bedingungen eines kompensierten, reversiblen Schockmodells mit anschließender Retransfusion eine Induktion der HO-1-Expression auf Proteinebene erfolgt. Die HO-1-Expression in der Leber erfolgt nach einem zelltypspezifischen Muster. Durch hämorrhagischen Schock mit Volumentherapie wird die HO-1-Expression überwiegend in Hepatozyten induziert, wobei die Induktion vor allem in der Perizentralregion des Leberazinus stattfindet.

Blockade der HO-Aktivität führte zu einer signifikanten Verschlimmerung des Schock-induzierten Leberschadens.

Weiterhin ging die Blockade des HO-Stoffwechsels zum Zeitpunkt der maximalen HO-1-Induktion mit Veränderungen der hepatischen Genexpression einher. Hierbei erfolgte eine, z.T. signifikante, Hochregulierung von Genen, die an der Apoptose beteiligt sind.

Ein Teil der gefundenen Ergebnisse hinsichtlich Hoch- oder Herunterregulierung verschiedener Gene unter unseren Versuchsbedingungen geben Hinweise darauf, dass die Induktion von HO-1 hinsichtlich der Entstehung eines hepatozellulären Schadens in weitere wichtige Stoffwechselvorgänge und Signaltransduktionswege des Organismus eingreift, die sowohl zur Zytoprotektion als auch zu vermehrtem Zelltod beitragen können. Blockade des HO-Stoffwechsels mit SnPP-IX führte zu dem hier gewählten

Untersuchungszeitpunkt allerdings lediglich zu einer schwachen Veränderung der Expression der untersuchten Gene, wie mit Mikroarray- und RT-PCR-Analyse gezeigt. Bei der näheren Untersuchung Apoptose-regulierender Gene konnte dabei für den TNF-Rezeptor eine signifikante Hochregulierung gezeigt und mit RT-PCR bestätigt werden. Die biologische Funktion und ein möglicher Zusammenhang mit der verstärkten Leberschädigung nach HO-Blockade sind bisher unklar.

Ob die Unterschiede der hepatischen Genexpression zu einem früheren Zeitpunkt nach Blockade des HO-Stoffwechsels ausgeprägter sind und sich damit eine Korrelation der Hoch- oder Herunterregulierung Apoptose-regulierender Gene mit der Verstärkung des Leberschadens herstellen lässt, kann anhand der vorliegenden Untersuchung nicht beantwortet werden. Daher müssen hier weitere Untersuchungen folgen, um die hier erreichten Ergebnisse zu bestätigen.

6 Literaturverzeichnis

1. ACCP/SCCM CONSENSUS CONFERENCE (1992a) Definition for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. Crit Care Med 20: 864 - 74
2. ACCP/SCCM CONSENSUS CONFERENCE (1992b) Definition for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. Chest 101: 1644 - 55
3. AHRENDT SA, CHOW JT, XU LH, YANG SC, EISENBERGER CF, ESTELLER M, HERMAN JG, WU L, DECKER PA, JEN J, SIDRANSKY D. (1999) Molecular detection of tumor cells in bronchoalveolar lavage fluid from patients with early stage lung cancer. J Natl Cancer Inst. 91: 332 - 39
4. ALAM J, STEWART D, TOUCHARD C, BOINAPALLY S, CHOI AM, COOK JL. (1999) NrF2, a Cap'n'collar transcription factor, regulates induction of the hemeoxygenase-1 gene. J Biol Chem 274: 26071 - 78
5. ALAM J, KILLEEN E, GONG P, NAQUIN R, HU B, STEWART D, INGELFINGER JR, NATH KA. (2003) Heme activates the heme oxygenase-1 gene in renal epithelial cells by stabilizing NrF2. Am J Physiol Renal Physiol 284: 743 - 52
6. ALAM J, COOK JL. (2007) How many transcription factors does it take to turn on the heme oxygenase-1 gene? Am J Respir Cell Mol Biol 36: 166 - 74
7. ALON U, BARKAI N, NOTTERMAN DA, GISH K, YBARRA S, MACK D, LEVINE AJ. (1999) Broad patterns of gene expression revealed by clustering analysis of tumor and normal colon tissues probed by oligonucleotide arrays. Proc Natl Acad Sci USA 96: 6745 - 50
8. ARBABI S, MAIER R V. (2002) Mitogen-activated protein kinases. Crit Care Med 30: 74 - 79

9. BACH FH. (2002) Heme oxygenase-1 as a protective gene. *Wien Klin Wochenschrift* 114: 1 - 3
10. BALLA G, JACOB HS, BALLA J, ROSENBERG M, NATH K, APLE F, EATON JW, VERCELOTTI GM. (1992) Ferritin: A cytoprotective antioxidant strategem of endothelium. *The journal of biological chemistry* 267: 18148 - 153
11. BARRET M, SCHEFFER A, BEN-DOR A, SAMPAS N, LIPSON D, KINCAID R, TSANG P, CURRY B, BAIRD K, MELTZER P, YAKHINI Z, BRUHN L, LADERMAN S. (2004) Comparative genomic hybridization using oligonucleotide microarrays and total genomic DNA. *PNAS* 101: 17765 - 70
12. BAUER I, WANNER GA, RENSING H, ALTE C, MIESCHER EA, WOLF B, PANNEN BHJ, CLEMENS MG, BAUER M. (1998) Expression pattern of heme oxygenase isoenzymes 1 and 2 in normal and stress-exposed rat liver. *Hepatology* 27: 829 - 38
13. BAUER M, PANNEN BHJ, BAUER I, HERZOG C, WANNER GA, HANSELMANN R, ZHANG JX, CLEMENS MG, LARSEN R. (1996) Evidence for a functional link between stress response and vascular control in hepatic portal circulation. *Am J Physiol* 271: 929 - 35
14. BAUER M, RENSING H, BAUER C, BAUER I, LARSEN R. (1997) Organ specific expression pattern of a carbon monoxide-generating stress protein (haeme-oxygenase-1) after haemorrhagic shock and resuscitation. *Der Anästhesist* 46: 339 - 42
15. BAUER M, BAUER I. (2002) Heme Oxygenase-1: Redox Regulation and Role in the Hepatic Response to Oxidative Stress. *Antioxidants & Redox Signaling* 4: 769 - 81

16. BAUER M, PAXIAN M, KORTGEN A. (2004) Akutes Leberversagen. Aktuelle Aspekte zur Diagnostik und Therapie. *Der Anästhesist* 53: 511 - 30
17. BAUER M, BRUNKHORST F, WELTE T, GERLACH H, REINHART K. (2006) Sepsis – Aktuelle Aspekte zu Pathophysiologie, Diagnostik und Therapie. *Der Anästhesist* 55: 835 - 45
18. BEAL AL, CERRA FB. (1994) Multiple organ failure syndrome in the 1990`s. Systemic inflammatory response and organe dysfunction. *JAMA* 271: 226 - 33
19. BEBIEN M, SALINAS S, BECAMEL C, RICHARD V, LINARES L, HIPSKIND RA. (2003) Immediate-early gene induction by the stresses anisomycin and arsenite in human osteosarcoma cells involves MAPK cascade signaling to ELK 1, CREB, SRF. *Oncogene* 22: 1836 - 47
20. BECKETT GJ, CHAPMAN BJ, DYSON EH, HAYES JD. (1985) Plasma glutathione S-transferase measurements after paracetamol overdose: evidence for early hepatocellular damage. *Gut* 26: 26 - 31.
21. BERG RD. (1999) Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Adv Exp Med Biol* 473: 11 - 30
22. BINI R, OLIVERO G, TROMBETTA A, CASTAGNA E, COTOGNI P. (2008) Effects of Dimethyl Sulfoxide, Pyrrolidine Dithiocarbamate, and methylprednisolone on Nuclear Factor B and Heat Shock Protein 70 in a Rat Model of Hemorrhagic Shock. *J Trauma* 64: 1048 - 54
23. BONE RC, BALK RA; CERRA FB. (1992) Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest* 101: 1644 - 55
24. BOYER JL, GRAF J, MEIER PJ. (1992) Hepatic transport systems regulating pH, cell volume, and bile secretion. *Annu Rev Physiol* 54: 415 - 38

25. BRADLEY SE. (1949) Variation in hepatic blood flow in man during health and disease. *New Engl J Med.* 240: 456 - 61
26. BRUENE B, ULLRICH V. (1987) Inhibition of platelet aggregation by carbon monoxide is mediated by activation of guanylate cyclase. *Mol Pharm* 32: 497 - 504
27. BRUNKHORST FM, ENGEL C, BONE H-G. (SEPNET) (2005) Epidemiology of severe sepsis and septic shock in Germany – Results from the German Prevalence Study. *Crit Care* 9 (Suppl 1) : 196
28. BUSSE R. (2005) *Gefäßsystem und Kreislaufregulation* in Schmidt R, Thews G: *Physiologie des Menschen*. 29. Aufl. Springer, Berlin, Heidelberg, New York 603 - 63
29. CARDELL LO, UEKI IF, STJARNE P, AGUSTI C, TAKEYAMA K, LINDEN A. (1998) Bronchodilatation in vivo by carbon monoxide, a cyclic GMP related messenger. *Br J Pharmacol* 124: 1065 - 68
30. CHAMHI SL, ALAM J, OTTERBEIN L, SYLVESTER SL, CHOI AM. (1995) Induction of HO-1 gene expression by lipopolysaccharide is mediated by AP-1 activation. *American J Resp Cell Molec Bio* 13: 387 - 98
31. CHANG L, KARIN M. (2001) Mammalian MAP Kinase signalling cascades. *Nature* 410: 37 - 40
32. CHEN CF, CHEN Y, DAI KD, CHEN PL, RILEY DJ, LEE WH. (1996) A new member of the hsp90 family of molecular chaperones interacts with the retinoblastoma protein during mitosis and after heat shock. *Mol Cell Biol* 16: 4691 - 99
33. CHOI AMK, 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* 15: 9 - 19

34. CLEMENS MG, BAUER M, PANNEN BHJ, BAUER I, ZHANG JX. (1997) Remodeling of hepatic microvascular responsiveness after ischemia/reperfusion. *Shock* 8: 80 - 85
35. CRUSE I, MAINES MD. (1988) Evidence suggesting that the two forms of heme oxygenase are products of different genes. *J of Biol Chem* 263: 3348 - 53
36. CRYER HG, LEONG K, MC ARTHUR DL, DEMETRIADES D; BONGARD FS, FLEMING AW, HIATT JR, KRAUS JF. (1999) Multiple organ failure: by the time you predict it, it's already there. *J Trauma* 46: 597 - 604
37. DEGTEREV A, BOYCCE M, YUAN J. (2003) decade of caspases. *Oncogene* 22: 8543 - 67
38. DEITCH EA. (1990) The role of intestinal barrier failure and bacterial translocation in the development of systemic infection and multiple organ failure. *Arch Surg* 125: 403 - 404
39. EARN SHEW WC, MARTINS LM, KAUFMANN SH. (1999) Mammalian caspases: Structure, activation, substrates and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 68: 383 - 424
40. ELBIRT KK, WHITMARSH AJ, DAVIS RJ, BONKOVSKY HL. (1998) Mechanism of sodium arsenite-mediated induction of heme oxygenase-1 in hepatoma cells. Role of mitogen activated protein kinases. *J Biol Chem* 273: 8922 - 8931
41. ELBIRT KK, BONKOVSKY HL. (1999) Heme oxygenase: recent advances in understanding its regulation and role. *Proc Assoc Am Physicians* 111: 438 - 447

42. ELLIS RJ, HEMMINGSEN SM. (1989) Molecular chaperones: proteins essential for the biogenesis of some macromolecular structures. *Trends Biochem Sci* 14: 339 - 42
43. EWING JF, MAINES MD. (1991) Rapid induction of heme oxygenase-1 mRNA and protein by hyperthermia in rat brain: heme oxygenase-2 is not a heat shock protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 5364 - 68
44. EWING JF, RAJU VS, MAINES MD. (1994) Induction of heart HO-1 (Hsp 32) by hyperthermia: possible role in stress mediated elevation of cyclic 3',5'-guanosine monophosphate. *J Pharm Exper Ther* 271: 408 - 14
45. FAIST E, BAUE AE, DITTMER H, HEBERER G. (1983) Multiple organ failure in polytrauma patients. *J Trauma* 23: 775 - 87
46. FAYBIK P, HETZ H, KRENN CG. (2003) Liver support in fulminant liver failure after hemorrhagic shock. *Wien Klin. Wochenschrift* 115: 595 - 98
47. FORESTI R, MOTTERLINI R. (1999) The HO Pathway and its Interaction with NO in Control of Cellular Homeostasis. *Free Rad Res* 31: 459 - 75
48. FU K, SARRAS MP, DE LISLE RC, ANDREWS GK. (1997) Expression of oxidative stress-responsive genes and cytokine genes during caerulein-induced acute pancreatitis. *Am J Physiol* 273: 696 - 705.
49. GAMEN S, ANEL A, LASIERRA P, ALAVA MA, MARTINEZ-LORENZO MJ, PINEIRO, NAVAL J. (1997) Doxorubicin-induced apoptosis in human T-cell leukemia is mediated by caspase-3 activation in a Fas-independent way. *FEBS Lett* 417: 360 - 64
50. GÄBLER E. (1996) *Biometrische Methodik pharmakologischer Tierexperimente*. G. Fischer Verlag

51. GASPARRI R, JANNIS N, FLAMENG W, LERUT T, VAN RAEMDONCK D. (1999) Ischemic preconditioning enhances donor lung preservation in the rabbit. *Eur J Cardiothorac Surg* 16: 639 - 46
52. GIBBS RA and Rat Genome Sequencing Project Consortium. (2004) Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature* 428: 493 - 521
53. GIFFEN PS, PICK CR, PRICE MA, WILLIAMS A, YORK MJ. (2002) Alpha-glutathione S-transferase in the assessment of hepatotoxicity – its diagnostic utility in comparison with other recognized markers in the Wistar Han rat. *Toxicol Pathol* 30: 365 - 72
54. 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* 101: 604 - 12
55. GUMASTE UR, JOSHI MJ, MUORYA DT, BARDE PV, SHRIVASTAV GK, GHOLE VS. (2005) Alcohol dehydrogenase: a potential new marker for diagnosis of intestinal ischemia using rat as a model. *World J Gastroenterol* 11: 912 - 916
56. HACIA JG. (1999) Resequencing and mutational analysis using oligonucleotide microarrays. *Nat Genet* 21: 42 - 47
57. HAGLUND U, GERDIN B. (1991) Oxygen-free radicals (OFR) and circulatory shock. *Circ Shock* 34: 405 - 411
58. HAUNSTETTER A, IZUMO S. (1998) Apoptosis Basic Mechanisms and Implications for Cardiovascular Disease. *Circ Res* 82: 1111 - 29
59. HAYES PC, BOUCHIER IAD, BECKETT GJ (1991) Glutathione S-transferase in humans in health and disease. *Gut* 32: 813 - 818

60. 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* 336: 241 - 50
61. HAWKER F. (1991) Liver dysfunction in critical illness. *Anaesth Intensive Care* 19: 165 - 181
62. HENGARTER M. (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407: 770 - 776
63. HESSLING M, RICHTER K, BUCHNER J. (2009) Dissection of the ATP-induced conformational cycle of the molecular chaperone Hsp90. *Nat Struct Mol Biol* 16 287 - 93
64. HILEY C, FRYER A, BELL J, HUME R, STRANGE RC. (1988) The human glutathione S-transferases: immunohistochemical studies of the developmental expression of alpha and pi-class isoenzymes. *Biochem J* 254: 255 - 59
65. HOETZEL A, SCHMIDT R. (2006) Kohlenmonoxid – Gift oder potenzielles Therapeutikum. *Der Anästhesist* 55: 1068 - 79
66. JACOBSON MD, WEIL M, RALFF MC. (1997) Programmed cell death in animal development *Cell* 88: 347 - 54
67. JAESCHKE H, FARHOOD A. (1991) Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Am J Physiol* 260: 335 - 62
68. JAESCHKE H. (1998) Mechanisms of reperfusion injury after warm ischemia of the liver. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 5: 402 - 08
69. JAESCHKE H, LEMASTERS JJ. (2003) Apoptosis versus oncotic Necrosis in Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury. *Gastroenterology* 125: 1246 - 57

70. JAESCHKE H, HASEGAWA T. (2006) Role of neutrophils in acute inflammatory liver injury (Invited Review) *Liver Int* 26: 912 - 19
71. JENNISCHE E. (1984) Possible influence of glutathione on postischemic liver injury. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand.* 92: 55 - 64
72. JONES DP, EKLOW L, THOR H, ORRENIUS S. (1981) Metabolism of hydrogen peroxide in isolated hepatocytes: relative contributions of catalase and glutathione peroxidase in decomposition of endogenously generated H₂O₂. *Arch Biochem Biophys* 210: 505 - 16
73. JOSEPH P, HE Q, UMBRIGHT C. (2008) Heme-oxygenase 1 Gene Expression is a Marker for Hexavalent Chromium-Induced Stress and Toxicity in Human Dermal Fibroblasts. *Toxicological Sciences* 103: 325 - 34
74. JUAN SH, CHENG TH, LIN HC, CHU YL, LEE WS. (2005) Mechanism of concentration dependent induction of heme-oxygenase 1 by resveratrol in human aortic smooth muscle cells. *Biochem Pharmacol* 69: 41-8
75. KAIZU T, TAMAKI T, TANAKA M, UCHIDA Y, TSUCHIHASHI S, KAWAMURA A, KAKITA A. (2003) Preconditioning with tin-protoporphyrin IX attenuates ischemia/reperfusion injury in the rat kidney. *Kidney Int* 63: 1393 - 1403
76. KAROW T. (2003) Kapitel „Herz Kreislauf“ in KAROW T, LANG R: „Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie“
77. KERR JFR. (1965) A histochemical study of hypertrophy and ischaemic injury of rat liver with special reference to changes in lysosomes. *J Path Bact* 90: 419 - 27
78. KERR JFR, WYLLI AH, CURRIE AR. (1972) Apoptosis : A basic biological phenom with wideranging implications in tissue kinetics *Br J Cancer* 26: 239 - 57

79. KIEMER AK, BILDNER N, WEBER NC, VOLLMAR AM. (2003) Characterization of heme oxygenase 1 (Hsp 32) induction by the Atrial Natriuretic Peptide in human endothelial cells. *Endocrinology* 144: 802 - 12
80. KIETZMANN T, SAMOYLENKO A, IMMENSCHUH S. (2003) Transcriptional regulation of heme oxygenase 1 gene expression by MAP Kinases of the JNK and p38 pathways in primary cultures of rat hepatocytes. *J Biol Chem* 278: 17927 - 936
81. KNELL AJ, DUKES DC. (1976) Dialysis procedures in acute liver coma. *Lancet* 2: 402 - 03
82. KRAMMER PH. (2000) CD 95's deadly mission in apoptosis. *Nature* 407: 789 - 95
83. KOO DJ, ZHOU M, CHAUDRY IH, WANG P. (2000) Plasma alpha-glutathione S-transferase: a sensitive indicator of hepatocellular damage during polymicrobial sepsis. *Arch Surg* 135: 198 - 203
84. KOWARA R, KARACZYN A, CHENG RYS, SALNIKOW K, KASPRZAK K. (2005) Microarray analysis of altered gene expression in murine fibroblasts transformed by nickel(II) to nickel(II)-resistant malignant phenotype *Toxicol Appl Pharmacol* 205: 1 - 10
85. KURATA S, MATSUMOTO M, TSUJI Y, NAKAJIMA H. (1996) Lipopolysaccharide activates transcription of the heme oxygenase gene in mouse M1 cells through oxidative activation of NF-kappaB. *Europ J Biochem* 239: 566 - 71
86. KUTTY RK, MAINES MD. (1981) Purification and characterization of biliverdin reductase from the rat liver. *J Biol Chem* 256: 3956 - 62

87. LAI IR, MA MC, CHEN CF, CHANG KJ. (2004) The protective role of heme oxygenase-1 on the liver after hypoxic preconditioning in rats. *Transplantation* 77: 1004 - 8
88. LAVROSKY Y, SONG CS, CHATTERJE B, ROY AK. (2000) Age-dependent increase of HO-1 gene expression in the liver mediated by NF-kappaB. *Mechan Ageing Develop* 114: 49 - 60
89. LEE PJ, ALAM J, JIANG BH, SEMENZA G, CHOI AMK. (1996) Regulation of heme oxygenase-1 (HO-1) after hypoxia. *Am J Respir Crit Care Med* 153: A 29
90. LEITLINIEN ZUR THERAPIE MIT BLUTKOMPONENTEN UND PLASMADERIVATEN (2009) 4. überarbeitete und erweiterte Auflage. Vorstand und Wissenschaftlichem Beirat der Bundesärztekammer. Deutscher Ärzte-Verlag, Köln
91. LINDENBLATT N, BORDEL R, SCHARECK W, MENGER MD, VOLLMAR B. (2004) Vascular heme oxygenase-1 induction suppresses microvascular thrombus formation in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24 : 601 - 6
92. LÖFFLER G, PETRIDES P. (1998) *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York 5. Aufl. 257ff.
93. LÖFFLER G, PETRIDES P. (2000) *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 6. Aufl. 705ff.
94. MAINES MD. (1988) Heme oxygenase: Function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *FASEB J* 2: 2557 - 68
95. MAINES MD. (1997) The heme oxygenase system: a regulator of a second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37: 517 - 54

96. MAINES MD. (1997) Regulation of heme oxygenase-2 by glucocorticoids in neonatal rat brain: characterization of functional glucocorticoid response element. *Biochem Biophys Acta.* 1351: 89 - 104
97. MARKS GS, BRIEN JF, NAKATSU K, MC LAUGHLIN BE. (1991) Does carbon monoxide have a physiological function? *Trends Pharmacol Sci* 12: 185 - 88
98. MAROTTO ME, THURMANN RG, LEMASTERS JJ. (1988) Early midzonal cell death during low-flow hypoxia in the isolated, perfused rat liver: protection by allopurinol. *Hepatology* 8: 585 - 90
99. MARTIN GS, MANNINO DM, EATON S, MOSS M. (2003) The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 – 2000. *N Engl J Med* 348:1546 - 54
100. MARUBAYASHI S, DOHI K, OCHI K, KAWASAKI T. (1986) Role of free radicals in ischemic rat liver cell injury: prevention of damage by alpha-tocopherol administration. *Surgery* 99: 184 - 92
101. MARZI I. (1994) Bedeutung der Leber für den Verlauf des SIRS nach Schock, Trauma und bei Sepsis. *Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther.* 29: 41 - 46
102. MC COUBREY WK, HUANG TJ, MAINES MD. (1997) Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3 *Europ J Biochem* 247: 725 - 35
103. MITSIOS N, SAKA M, KRUPINSKI J, PENNUCCI R, SANFELIU C, WANG Q, RUBIO F, GAFFNEY J, KUMAR P, KUMAR S, SULLIVAN M, SLEVIN M. (2007) A microarray study of gene and protein regulation in human and rat brain following middle cerebral artery occlusion, *Neuroscience* 8: 93
104. MIYASHITA T, REED JC. (1995) Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80: 293 - 99

105. MORADPOUR D, BLUM HE. (1999) DNA Chip Technology. *DMW* 124: 1395 - 96
106. MORITA T. (2005) Heme oxygenase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 1786 - 95
107. MOTTERLINI R, FORESTI R, BASSI R, GREEN CJ. (2000) Curcumin, an antioxidant and anti-inflammatory agent, induces heme oxygenase-1 and protects endothelial cells against oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 28: 1303 -12
108. NICHOLSON DW. (2000) From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. *Nature* 407: 810 - 16
109. NAKAMURA S, NISHIYAMA R; YOKOI Y, SUZUKI S, BABA S, MURO H. (1995) Hepatic release of endothelin-1 after warm ischemia – reperfusion injury and its hemodynamic effects. *Transplantation* 59: 679 - 84
110. NATH DA, BALLA G, VERCELOTTI GM. (1992) Induction of heme oxygenase is a rapid protective response in rhabdomyolysis in the rat. *J Clin Invest* 90: 267 - 70
111. NELSON DR, HERBERT LL, OLIVER D, QIANG KP, DAVIS GL, LAU JYN. (1995) Alpha-glutathione S-transferase as a marker of hepatocellular damage in chronic hepatitis C virus infection. *Am J Clin Path* 104: 193 - 98
112. NISHIDA J, MC Cuskey RS, MC DONNELL D, FOX ES. (1994) Protective role of NO in hepatic microcirculatory dysfunction during endotoxemia. *Am J Physiol* 267: 1135 - 41
113. O'GRADY JG, GIMSON AES, O'BRIEN CJO, PUCKNELL A, HUGHES RD, WILLIAMS R. (1988) Controlled trials for of charcoal hemoperfusion and prognostic factors in fulminant hepatic failure. *Gastroenterology* 94: 1186 - 92

114. OHLMANN A, GIFFHORN-KATZ S, BECKER I, KATZ N, IMMENSCHUH S. (2003) Regulation of heme oxygenase-1 gene expression by anoxia and reoxygenation in primary rat hepatocyte cultures. *Exp Biol Med (Maywood)* 228: 584 - 89
115. OTTERBEIN LE, CHOI AMK. (2000) Heme oxygenase: colors of defense against cellular stress. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279: 1029 - 37
116. OZER J, RATNER M, SHAW M, BAILEY W, SCHOMAKER S. (2008) The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. *Toxicology* 245: 194 - 205
117. PANNEN BH, BAUER M, NOLDGE-SCHOMBURG E, ZHANG JX, ROBOTHAM JL, CLEMENS MG, GEIGER KK. (1997) Regulation of hepatic blood flow during resuscitation from hemorrhagic shock: Role of nitric oxide and endothelins. *Am J Physiol* 272: 2736 - 45
118. PANNEN BH, AL-ADILI F, BAUER M, CLEMENS MG, GEIGER KK. (1998) Role of endothelin and nitric oxide in hepatic reperfusion injury in the rat. *Hepatology* 27: 755 - 64
119. 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* 62: 2025 - 33
120. PANNEN BH, KÖHLER N, HOLE B, BAUER M, CLEMENS MG, GEIGER KK. (1998) Protective role of endogenous CO in hepatic microcirculatory dysfunction after hemorrhagic shock in rats. *J Clin Invest* 102: 1220 - 28
121. PAXIAN M, BAUER I, RENSING H, JAESCHKE H, MAUTES A, KOLB S, WOLF B, STOCKHAUSEN A, JEBLICK S, BAUER M. (2003) Recovery of hepatocellular ATP and „pericentral apoptosis“ after hemorrhage and resuscitation. *FASEB Journal* 17: 993 - 1003

122. PEARSON G, ROBINSON F. (2001) Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways: Regulation and Physiological Functions. *Endocr* 22: 153 - 83
123. PELHAM HRB. (1984) Hsp70 accelerates the recovery of nucleolar morphology after heat shock. *EMBO J* 3: 3095 - 3100
124. PLATZ KP, MUELLER AR, MÜLLER C, WENIG M, SCHUMACHER G, STEINMÜLLER T, KÖTTGEN E, NEUHAUS P. (1999) Indications for determination of alpha-glutathione-S-transferase after liver transplantation. *Transplant Proc* 31: 462 - 64
125. POOLE B, WANG W, CHEN YC, ZOLTY E, FALK S, MITRA A, SCHRIER R. (2005) Role of heme oxygenase-1 in endotoxemic acute renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol* 289: 1382 - 85
126. POSS KD, TONEGAWA S. (1997) Heme oxygenase 1 is required for mammalian iron reutilization. *Proc Natl Acad Sci* 94: 10919 - 924
127. RAJU VS, MAINES MD. (1994) Coordinated expression and mechanism of induction of Hsp 32 mRNA by hyperthermia in rat organs. *Biochem Biophys Acta* 1217: 273 - 80
128. RAPPAPORT AM. (1973) The microcirculatory hepatic unit. *Microvasc Res* 6: 212 - 28
129. REDL H, SCHLAG G, PAUL E, DAVIES J. (1995) Plasma glutathione S-transferase as an early marker of posttraumatic hepatic injury in non-human primates. *Shock* 3: 395 - 97
130. REGEL G, GROTZ M, WELTNER T, STURM JA, TSCHERNE H. (1996) Pattern of organ failure following severe trauma. *World J Surg* 20: 422 - 29
131. RENSING H, BAUER M. (2001) Multiorganversagen. *Der Anästhesist* 50: 819 - 41

132. RENSING H, BAUER I, DATENE V, PÄTAU C, PANNEN B, 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. 27: 2766 - 75
133. RIXEN D, RAUM M, BOUILLION B, NEUGEBAUER, AG Polytrauma der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie. (2002) Der Base Excess als Prognose-Indikator bei Polytrauma-Patienten. Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther 37: 347 - 349
134. ROSEN HR, MARTIN P, GOSS J, DONOVAN J, MELINEK J, RUDICH S, IMAGAWA DK, KINKHABWALA M, SEU P, BUSUTTIL RW, SHACKLETON CR. (1998) Significance of early aminotransferase elevation after liver transplantation. Transplantation 65: 68 - 72
135. RUSSWURM S, DEIGNER HP, REINHART K. (2003) Microarray in Sepsis: Tool or Toy? Intensive Care Med 55 - 64 Annual update
136. RYTER SW, ALAM J, CHOI AM. (2006) Heme oxygenase-1/carbon monoxide:from basic science to therapeutic applications. Physiol Rev 86: 583 - 50
137. SAUER IM, GERLACH JC. (2002) Modular extracorporeal liver support. Artif Organs 26: 703 - 06
138. SAUER IM, KARDASSIS D, ZEILINGER K, PASCHER A, GRUENWALD A, PLESS G, IRGANG M, KRAEMER M, PUHL G, FRANK J, MULLER A R, STEINMULLER T, DENNER J, NEUHAUS P, GERLACH J C. (2003) Clinical extracorporeal hybrid liver support - phase I study with primary porcine liver cells. Xenotransplantation 460 - 469

139. SCAPAGNINI G, FORESTI R, CALABRESE V, GIUFFRIDA AM, GREEN CJ, MOTTERLINI R. (2002) Caffeic acid phenethyl ester and curcumin: a novel class of heme oxygenase-1 inducers. *Mol Pharmacol* 61: 554 - 61
140. SCHENA M, SHALON D, DAWIS RW, BROWN PO. (1995) Quantitative monitoring of gene-expression patterns with a complementary-DNA microarray. *Science* 270: 467 - 470
141. SCHIEBLER, SCHMIDT, ZILLES. (1997) *Anatomie*. 7. Auflage, Springer Verlag. Berlin, Heidelberg, New York S. 586
142. SCHMIDT R, HOETZEL A, BAECHLE T, LOOP T, HUMAR M, BAUER M, Pahl HL, GEIGER KK, PANNEN BH. (2004) Isoflurane pretreatment lowers portal venous resistance by increasing hepatic heme oxygenase activity in the rat liver in vivo. *J Hepatol* 41: 706 - 13
143. SEEKAMP A, REGEL G, STURM JA, TSCHERNE H. (1991) Liver failure as part of multiple organ failure following polytrauma. *Unfallchirurg* 94: 502 - 07
144. SEN S, WILLIAMS R, JALAN R. (2005) Emerging indications for albumin dialysis. *Am J Gastroenterology* 100: 468 - 75
145. SHI Y. (2004) Caspase activation, inhibition, and reactivation: a mechanistic view. *Protein Sci*: 13: 1979 - 87
146. SHIBAHARA S, MULLER RM, TAGUCHI H. (1987) Transcriptional control of rat heme oxygenase by heat shock. *J Biol Chem* 262: 12889 - 892
147. SKOVSTED P, PRICE ML, PRICE HL. (1970) The effects of short acting barbiturats on arterial pressure, preganglionic sympathetic activity and barostatic reflexes. *Anaesthesiology* 33: 10 - 18

148. SMITH I, KUMAR P, MOLLOY S, RHODES A, NEWMAN PJ, GROUNDS RM, BENNET ED. (2001) Base excess and lactate as prognostic indicators for patients admitted to intensive care. *Intensive Care Med* 27: 74 - 83
149. SOUTHERN EM. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98: 503 - 17
150. SPAHN DR. (1998) Optimale und kritische Hämoglobinkonzentration beim Intensivpatienten aus klinischer Sicht. Volume 35, Supplement 1, *Intensivmedizin*
151. STOCKER R, YAMAMOTO Y, MC DONAGH AF, GLAZER AN, AMES BN. (1987) Billirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* 235: 1043 - 46
152. STUETZ J, AHLBORN C, RICHERT C. (2006) *Bioforum 05/06*, GIT Verlag, GmbH & Co. KG, Darmstadt
153. SUEMATSU M, GODA N, SANO T, KASHIWAGI S, ISHIMURA Y. (1995) Carbon monoxide : an endogenous modulator of sinusoidal tone in the perfused rat liver. *J Clin Invest* 96: 2431 - 37
154. SUEMATSU M, KASHIWAGI S, SANO T, GODA N. (1994) Carbon monoxid as an endogenous mediator of vascular perfusion. *Biochem Biophys Res Commun* 205: 1333 - 37
155. SYLVESTER JT, MC GOWAN C. (1978) The effects of agents that bind to cytochrome P-450 on hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Circ Res* 43: 429 - 37
156. TAKAHASHI T, MORITA K, AKAGI R, SASSA S. (2004) Heme oxygenase-1: a novel therapeutic target in oxidative tissue injuries. *Curr Med Chem* 11: 1545 - 61

157. TENHUNEN R, MARVER HS, SCHMID R. (1968) The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. Proc Natl Acad Sci USA 61: 748 - 755
158. THANOS D, MANIATIS T. (1995) NF-kappa B: a lesson in family values. Cell 80: 529 - 32
159. THIRIET N, LADENHEIM B, McCOY MT, CADET J. (2002) Analysis of Ecstasy (MDMA)-induced transcriptional responses in the rat cortex. The FASEB Journal. 16: 1887 - 94
160. VEDERNIKOV YP, GRÄSER T, VANIN AF. (1989) Similar endothelium-independent arterial relaxation by carbon monoxide and nitric oxide. Biomed Biochem Acta 48: 601 - 3
161. VELAZQUEZ JM, LINDQUIST. (1984) Hsp70: nuclear concentration during environmental stress: cytoplasmic storage during recovery. Cell 36: 655 - 63
162. VERMA A, HIRSCH DJ, GLATT CE, RONNET GV, SNYDER SH. (1993) Carbon monoxide: a putative neural messenger. Science 259: 381 – 84
163. VINCENT JL, BIHARI DJ, SUTER PM. (1995) The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe. Results of the European Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC) Study. EPIC International Advisory Committee. JAMA 274: 639 - 644
164. VOLLMAR B, GLASZ J, LEIDERER R, POST S, MENGER MD. (1994) Hepatic microcirculatory perfusion failure is a determinant of liver dysfunction in warm ischemia-reperfusion. Am J Pathol 145: 1421 – 31
165. VOLLMAR B, RÜCKER M, MENGER MD. (1996) A new method for the intravital microscopic quantification of hepatic sinusoidal perfusion failure using the dye bisbenzamide H33342 Microvasc Res Mar 51: 250 - 59

166. VON DOBSCHUETZ E, SCHMIDT R, SCHOLTES M, THOMUSCH O, SCHWER C, GEIGER KK, HOPT UT, PANNEN BHJ. (2008) Protective Role of Heme Oxygenase-1 in Pancreatic Microcirculatory Dysfunction after Ischemia/Reperfusion in Rats. *Pancreas* 36: 377 - 84
167. WAISMAN Y, EICHACKER PQ, BANKS SM, HOFFMANN WD, MACVITTIE TJ, NATANSON C. (1993) Acute hemorrhage in dogs: Construction and validation of models to quantify blood loss. *J Appl Physiol* 74: 510 - 19
168. WANG P, HAUPTMANN JG, CHAUDRY I. (1990) Hemorrhage produces depression in microvascular blood flow which persists despite fluid resuscitation. *Circ Shock* 32: 307 - 18
169. WANG K, GAN L, JEFFERY E, GAYLE M, GOWN AM, SKELLY M, NELSON PS, NG WV, SCHUMMER M, HOOD L, MULLIGAN J. (1999) Monitoring gene expression profile changes in ovarian carcinomas using cDNA microarray. *Gene* 229: 101-08
170. WEDEKIND S. (2006) Der Anästhesist "Spezial". Im Rahmen des „7. International Symposium of Albumin Dialyses in liver diseases“. Mai 2006.
171. WELCH WJ, FERAMISCO JR (1984) Nuclear and nucleolar localization of the 72.000 dalton heat shock protein in heat shocked mammalian cells. *J Biol Chem* 259: 4501 - 10
172. WELCH WJ. (1992) Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins and implications for medicine and disease. *Physiol Rev* 72: 1063 - 81
173. WEN W, BERNSTEIN I, LESCALLET J, BEAZER-BARCLAY Y, SULLIVAN-HALLEY J, WHITE M, PRESS M. (2000) Comparison of TP53 Mutations Identified by Oligonucleotide Microarray and Conventional DNA Sequence Analysis. *Cancer Research* 2716 - 22

174. WEGELE H, MULLER L, BUCHNER J. (2004) Hsp70 and Hsp90 - a relay team for protein folding, *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 151: 1 - 44
175. WINTERBOURN CC. (1985) Free-radical production and oxidative reactions of hemoglobin. *Environ Health Perspect* 64: 321 - 30
176. YACHIE A, NIIDA Y, WADA T, IGARASHI N, TOMA T, KOIZUMI S. (1999) Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency. *J Clin Invest* 103: 129 - 35
177. YANG J, LIU X, BHALLA K, KIM CN, IBRADO AM, CAI J, PENG TI, JONES DP, WANG X. (1997) Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 275: 1129 - 32
178. YOSHIDOME H, KATO A, EDWARDS MJ, LENTSCH AB. (1999) Interleukin-10 suppresses hepatic ischemia/reperfusion injury in mice: implications of a central role for nuclear factor kappa B. *Hepatology* 30: 203 - 08
179. ZWACKA RM, ZHANG Y, ZHOU W, HALLDORSON J, ENGELHARDT JF. (1998) Ischemia/Reperfusion Injury in the liver of BALB/c Mice activates AP-1 an NF-kappaB independently of IkappaB degradation. *Hepatology* 28: 1022 - 30

7 Danksagung

Hiermit möchte ich allen danken, die zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. med. R. Larsen, Direktor der Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie, danke ich für die Möglichkeit, die Experimente im anästhesiologischen Forschungslabor durchführen zu können.

Frau PD Dr. rer. nat. I. Bauer möchte ich für die Themenstellung, die gute Betreuung und insbesondere für die Leitung der Arbeit sowie Ihre Ratschläge bei der Zusammenstellung der Arbeit danken,

Herrn Prof. Dr. med. H. Rensing danke ich für die Diskussion und Korrekturen während der Erstellung dieser Arbeit.

Frau B. Wolf danke ich für die Unterstützung und Mithilfe in der Umsetzung einzelner Experimente.

Ich danke meinen Eltern für die ständige Motivation und Unterstützung bis zur Fertigstellung dieser Dissertation.

Auch möchte ich allen denen danken, die während der Zeit der Fertigstellung dieser Arbeit an mich gedacht und ständig motiviert haben.

8 Lebenslauf

Björn Jung

Geburtstag/-ort 17. Januar 1976, St. Ingbert

Familienstand: ledig

Nationalität: Deutsch

Konfession römisch-katholisch

Schulbildung

1982 -1986 Grundschule in St.Ingbert

1986 - 1995 Albertus Magnus Gymnasium St. Ingbert (Allgemeine Hochschulreife)

Zivildienst

1995 - 1996 Caritas St. Ingbert

Berufsausbildung

1996 -2003 Studium der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes

1999 Ärztliche Vorprüfung

2000 1. Staatsexamen

2002 2. Staatsexamen

2003 3. Staatsexamen und vorl. Approbation

2003 – 2004 Arzt im Praktikum, Klinik für Neurologie, Universitätskliniken des Saarlandes

2004 Approbation und Assistenzarzt, Klinik für Anästhesiologie, Universitätskliniken des Saarlandes.

2009 Facharzt, Klinik für Anästhesiologie Universitätskliniken des Saarlandes

9 ANHANG

Tabelle Mikroarray

	GRUPPE	UP	DOWN	RATIO
I	Amino acid metabolism Aminosäurestoffwechsel			
1	glutamate oxaloacetic transaminase 1 (GOT1); transaminase A; cytoplasmic aspartate aminotransferase		1.4	0.69
2	glutathione synthetase (GSH synthetase; GSH-S; GSS); glutathione synthase	1.5		1.49
3	Tyrosine aminotransferase (TAT); L-tyrosine:2-oxoglutarate aminotransferase		2.8	0.36
II	Basic transcription factors			
4	transcription factor HES-1		1.9	0.54
III	Cell surface antigens Zelloberflächen-Antigene			
5	MHC class II antigen RT1.B beta	1.6		1.58
6	syndecan	1.8		1.75
7	transferrin receptor (TFRC); CD71 antigen		1.4	0.71
IV	Chaperones and heat shock proteins Begleiter und Hitze Schock Proteine			
8	heat shock 90-kDa protein beta (Hsp90-beta); Hsp84; HSPCB	1.7		1.67
9	heat shock 90-kDa protein A (Hsp90A; HSPCA); Hsp86 [rat homolog of human]	1.6		1.58
10	Hsp70/Hsp90-organizing protein (HOP); p60 protein	1.6		1.62
11	heat shock 90-kDa protein A (Hsp90A; HSPCA); Hsp86 [rat homolog of human]	1.6		1.58
12	T-complex protein 1 gamma subunit (TCP1-gamma); CCT-gamma (CCT3; CCTG); TRIC5 [rat homolog of human]		1.4	1.40
V	Complex Lipid Metabolism Fettstoffwechsel			
13	cytochrome P450 VII (CYP7); cholesterol 7-alpha-monooxygenase; cholesterol 7-alpha-hydroxylase		1.5	0.67
14	apolipoprotein AII (APOA2)	1.4		1.44
15	alcohol sulfotransferase A; hydroxysteroid sulfotransferase A; STA; androsterone-sulfating sulfotransferase (AD-ST); ST-40		2.5	0.4
16	cytochrome P450 IIC11 (CYP2C11); P450(M-1); P450H; P450-UT-A; UT2		1.7	0.58
VI	Drug Resistance Proteins			
17	P glycoprotein sister protein	1.4		1.45
VII	Energy metabolism Energistoffwechsel			
18	alcohol dehydrogenase A subunit; alcohol dehydrogenase class 1 (ADH1)		1.5	0.65
VIII	Extracellular transporters and carriers Extrazelluläre Transport und Trägerproteine			
19	apolipoprotein AII (APOA2)	1.4		1.44
20	insulin-like growth factor-binding protein 1 (IGF-binding protein 1; IGFBP1)	1.4		1.41

IX	General trafficking proteins			
21	insulin-like growth factor II receptor (IGF2R)	1.8		1.83
X	Growth factors, cytokines and chemokines Wachstumsfaktoren, - zytokine, - chemokine			
22	tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha; TNFA); cachectin		1.5	0.67
XI	Heat shock proteins Hitze Schock Proteine			
23	Heat shock proteins 27 kDa	2.2		2.23
XII	Intracellular adaptors&Receptor associated proteins			
24	heat shock 90-kDa protein beta (Hsp90-beta); Hsp84; HSPCB	1.7		1.67
XIII	Intracellular Kinase Network members			
25	mitogen-activated protein kinase kinase 2 (MAP kinase kinase 2; MAPKK2; MAP2K2; PRKMK2); MAPK/ERK kinase 2 (MEK2)	1.4		1.43
26	protein kinase C beta I (PKC-beta I; PRKCB1; PKCB); PKC-beta II (PRKCB2)	1.5		1.52
XIV	Intracellular Transducers and modulators			
27	transferrin receptor (TFRC); CD71 antigen		1.4	0.71
28	junD proto-oncogene	1.5		1.46
XV	Metabolism of Cofactors, Vitamins and related Substances			
29	glutathione S-transferase Yb2 subunit (GST Yb2); GST mu (GSTM2)	1.6		1.64
30	aldehyde dehydrogenase 1	1.6		1.59
	branched chain acyl-CoA oxidase 2 (ACOX2); trihydroxycoprostanoyl-CoA oxidase (THCOX)		1.5	0.65
31	heme oxygenase 1 (HO1; HMOX1)	13.2		13.21
XVI	Metabolism Enzymes Stoffwechsellzyme			
32	phosphoenolpyruvate carboxykinase		2.1	0.47
33	mitochondrial superoxide dismutase 2 (SOD2)	2.7		2.72
34	uricase; urate oxidase (UOX)		1.6	0.62
XVII	Nucleotide Metabolism Nukleotidstoffwechsel			
35	microsomal UDP-glucuronosyltransferase 1-3 (UDPGT); UGT-1C; UGT1.3	1.4		0.71
36	UDP-glucuronosyltransferase 1		2.3	0.44
37	UDP-glucuronosyltransferase 2B		2.0	0.5
XVIII	Oncogenes Tumor suppressors Tumorsuppressorgene			
38	B-cell leukemia/lymphoma protein 2 (BCL2)		1.4	0.71
39	junD proto-oncogene	1.5		1.46
XVIX	Other extracellular communications proteins			
40	sonic hedgehog		1.5	0.67
XX	Phospholipases&Phosphoinositol Kinase			
41	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta polypeptide (YWHAZ); 14-3-3 protein zeta/delta; protein kinase C inhibitor protein 1 (KCIP1); mitochondrial import stimulation factor S1 subunit	1.5		1.49

XXI	Post translational Modification Proteines			
42	FK506-binding protein 12 (FKBP12)	1.4		1.44
43	p23; 23-kDa progesterone receptor-associated protein [rat homolog of human]	1.5		1.45
XXII	Protein modification enzymes			
44	cytochrome P450 reductase (POR)		1.4	0.69
45	thiosulfate sulfurtransferase (TST); rhodanese	1.5		1.48
XXIII	Ribosomal proteins			
46	ribosomal protein L13A	1.9		1.95
XXIV	Simple Lipid Metabolism Einfacher Fettstoffwechsel			
47	cytochrome P450 IIB1 (CYP2B1)		1.6	0.62
XXV	Transcriptions Proteins Transkriptionsproteine			
48	GOS 24 (zinc finger transcriptional factor)	1.5		1.48
XXVI	Transcriptions Activators and repressors			
49	Inhibitor of DNA Binding I	1.5		1.55
50	Inhibitor of DNA Binding II	1.4		1.42
51	junD proto-oncogene	1.5		1.46
52	interferon regulatory factor 2 (IRF2)	1.7		1.71
XXVII	Voltage gated Ion channels spannungsabhängige Ionenkanäle			
53	annexin V (ANX5); lipocortin 5; placental anticoagulant protein I (PAP-I); endonexin II; calphobindin I (CBP-I); PP4; thromboplastin inhibitor; vascular anticoagulant alpha (VAC-alpha); anchorin CII	1.7		1.73
XXVIII	Other intracellular Transducers, Effectors and Modulators			
54	Growth arrest&DANN damage inducible protein GADD 45	1.6		1.61
55	liver fatty acid-binding protein (L-FABP); Z-protein; squalene- & sterol-carrier protein (SCP)		1.4	0.7
XXIX	Other metabolism enzymes			
56	membrane-bound + soluble catechol-O-methyltransferase (MB-COMT + S-COMT)		1.4	0.71
XXX	Other Receptors (by Ligands)			
57	sulfonylurea receptor		1.6	0.65
XXXI	Other stress response proteins Stress Proteine			
58	Growth arrest&DANN damage inducible protein GADD 45	1.6		1.61
59	pancreatitis-associated protein 1 (PAP1); peptide 23; islet of Langerhans regenerating protein 2 (REG2)	2.2		2.20
60	clusterin (CLU); testosterone-repressed prostate message 2 (TRPM2); apolipoprotein J (APOJ); 114ulphated glycoprotein 2 (SGP2); dimeric acid glycoprotein (DAG)	1.4		1.44

XXXII	Xenobiotic metabolism Fremdstoff Stoffwechsel			
61	glutathione S-transferase subunit 5 theta (GST5-5)		1.4	0.71
62	cytochrome P450 VII (CYP7); cholesterol 7-alpha-monooxygenase; cholesterol 7-alpha-hydroxylase		1.5	0.67
63	membrane-bound + soluble catechol-O-methyltransferase (MB-COMT + S-COMT)		1.4	0.71
64	microsomal UDP-glucuronosyltransferase 1-3 (UDPGT); UGT-1C; UGT1.3		1.4	0.71
65	cytochrome P450 IIB1 (CYP2B1)		1.6	0.62
66	UDP-glucuronosyltransferase 1		2.3	0.44
67	UDP-glucuronosyltransferase 2B		2.0	0.5
XXIII	Xenobiotic transporter Fremdstoff Transporter			
68	organic cation transporter 2 (OCT2)		1.4	0.7
69	renal organic anion transporter (ROAT1); multispecific organic anion transporter (OAT1)		1.4	0.71

10 Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
Abb.	Abbildung
ACCP	American College of Chest Physicians
ADH	Alkoholdehydrogenase
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
AP-1	Aktivator Protein 1
ATP	Adenosintriphosphat
α -GST	Glutathion-S-Transferase alpha
BCL 2	B-Zell Lymphom 2
β 2	Beta 2
BE	Basendefizit
BGA	Blutgasanalyse
bzw	beziehungsweise
Ca^{2+}	Calcium
$^{\circ}\text{C}$	Celsius
CO	Kohlenmonoxid
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Nukleosidtriphosphate
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPIC	European-Prevalence-of-Infection-in-Intensive-Care
ERK	Extrazellulär regulierte Kinase
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathiondisulfid
GTP	Guanosin Tri Phosphat
h	Stunde
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
HO-1	Hämoxygenase 1
HO-2	Hämoxygenase 2
HO-3	Hämoxygenase 3
Hsp 32	Hitzeschockprotein 32
HZV	Herzzeitvolumen
ICD 10	International Classification of Diseases and Related Health Problems
IL-1	Interleukin 1
I κ B	Inhibitionsfaktor κ B
I/R	Ischämie Reperfusion
KHK	Koronare Herzkrankheit
KG	Körpergewicht
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	Mitogen aktivierte Kinase
MAPKK	MAP Kinase Kinase
MAPKKK	MAP Kinase Kinase Kinase
MAD	Mittlerer arterieller Druck
MgCl_2	Magnesiumchlorid

mM	Millimolar
MODS	multiple organ dysfunction syndrome
ml	Milliliter
min	Minute
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
μl	Mikroliter
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NaOAc	Natriumacetat
NF-κB	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' aktivierter B-Zellen
NF-e2	Nuclear factor erythroid 2
Nm	Nanometer
Nrf2	NF-E2-related factor-2
NYHA	New York Heart Association
NO	Stickstoffmonoxid
o.g.	oben genannte
O ₂	Sauerstoff
PCR	Polymerasekettenreaktion
PS	Phosphatidylserin
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
SCCM	Society of Critical Care Medicine
SDS	Natriumdodecylsulfat
SepNet	Kompetenznetzwerk Sepsis
SIRS	Systemic inflammatory response syndrome
SnPP-IX	Zinn Protoporphyrin IX
SSC	Standard Saline Zitrat
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
UV	Ultraviolett
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem