

*Aus der Klinik für für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie,
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Thomas Volk*

Hämoglobin-Glutamer 200 verursacht eine hepatozelluläre Dysfunktion nach hämorrhagischem Schock durch Induktion einer verstärkten Endothelin-1 Freisetzung

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2010**

vorgelegt von: Daphne Elisabeth Pavlidis

geb. am: 15.11.1983 in Frankfurt/Main

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Summary: Endothelin-1 contributes to hemoglobin glutamer-200-mediated hepatocellular dysfunction after hemorrhagic shock	2
3. Einleitung	3
3.1 Organversagen nach hämorrhagischem Schock	3
3.2 Stellenwert der Leber im Schocksyndrom	5
3.2.1 Aufbau und Funktion der Leber	5
3.2.2 Hepatozelluläre Veränderungen im hämorrhagischen Schock	7
3.3 Künstliche Sauerstoffträger	9
3.4 Endothelin-1	11
3.5 Zytokinantwort im hämorrhagischen Schock	13
3.6 Modelle	14
3.6.1 Hämorrhagisches Schockmodell	14
3.6.2 Präkonditionierung zur Induktion der verzögerten Wirkung von HbG	16
3.7 Fragestellung	17
4. Material und Methodik	18
4.1 Versuchstiere	18
4.2 Versuchsdesign	18
4.2.1 Versuchsgruppen	18
4.2.2 Versuchsprotokolle	19
4.3 Versuchsdurchführung	20
4.3.1 Anästhesie der Versuchstiere	20
4.3.2 Pharmakologische Vorbehandlung der Versuchstiere	21
4.3.3 Chirurgische Präparation	21
4.3.3.1 Besonderheit der Gruppen mit Bosentan	22
4.3.4 Hämorrhagischer Schock und Reperfusion	23
4.3.5 Intravitalmikroskopie (IVM)	23
4.3.5.1 Chirurgische Vorbereitung	24
4.3.5.2 Durchführung der Intravitalmikroskopie	25
4.4 Plasmaverschwinderate von Indocyaningrün (PDR _{ICG})	26
4.5 Applizierte Lösungen	26
4.5.1 Vollelektrolytlösung	26

4.5.2	Hämoglobin-Glutamer 200 (HbG)	27
4.5.3	Bosentan	27
4.5.4	Fluorescein-Isothiocyanat-Lösung	27
4.6	Fluoreszenz-Zell-Markierung	27
4.7	Erfassung der Untersuchungsparameter	28
4.7.1	Hämodynamik	28
4.7.2	Intravitalmikroskopische Auswertung	28
4.7.2.1	Mitochondrialer Redox-Status	28
4.7.2.2	Anzahl der perfundierten Sinusoide (pS)	29
4.7.2.3	Mittlerer sinusoidaler Durchmesser (Ds)	29
4.7.2.4	Erythrozyten-Flussgeschwindigkeit (V_{ery})	29
4.7.2.5	Volumetrischer Blutfluss (VBF)	29
4.7.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von Endothelin-1	30
4.7.3.1	Isolierung von RNA aus dem Lebergewebe	30
4.7.3.2	Reverse Transkription	31
4.7.3.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	32
4.7.3.4	Gel-Elektrophorese zur Auswertung der PCR	34
4.7.4	Immunhistochemische Messung der GluS-1	35
4.7.5	Bestimmung der Zytokinspiegel im Serum	36
4.7.6	Bestimmung der Leberenzyme im Serum	38
4.7.7	Blutgasanalyse	38
4.8	Statistische Auswertung	38
4.8.1	Berechnung der Versuchstieranzahl und Nullhypothesen	38
4.8.2	Statistische Auswertung	38
4.8.3	Graphische Darstellung der Ergebnisse	39
5.	Ergebnisse	40
5.1	Makrohämodynamik	40
5.2	Blutgasanalyse	42
5.3	Hepatozellulärer Schaden nach Hämorrhagie und Reperfusion	44
5.4	Endothelin-1 Expression nach hämorrhagischem Schock und Reperfusion	45
4.3	GluS-1 Proteinexpression im Lebergewebe	47

4.4	Intravitalmikroskopische Auswertung	50
4.4.3	Parameter der sinusoidalen Mikroperfusion	50
4.4.3.1	Sinusoidaler Durchmesser	50
4.4.3.2	Anzahl der perfundierten Sinusoide	50
4.4.3.3	Mittlere Erythrozytenflussgeschwindigkeit	53
4.4.3.4	Volumetrischer Blutfluss	53
4.5	Mitochondrialer Redoxstatus	55
4.6	Indocyaningrün-Plasmaverschwinderate (PDR _{ICG})	58
4.7	Zytokinspiegel im Serum (TNF- α und IL-10)	60
4.8	Zusammenfassung der Ergebnisse	62
5	Diskussion	63
5.3	Problemstellung	63
5.4	Diskussion von Material und Methodik	65
5.4.3	Tiermodell	65
5.4.4	Hämorrhagischer Schock	66
5.4.5	Intravitalmikroskopie	67
5.4.6	Messmethoden	69
5.4.7	ICG-Plasmaeliminationsrate	70
5.5	Diskussion der Ergebnisse	71
5.6	Schlussfolgerung	75
6	Literaturverzeichnis	76
7	Publikationen	86
8	Danksagung	87
9	Lebenslauf	88

1. Zusammenfassung

Die Transfusion von humanen Erythrozytenkonzentraten ist ein wichtiger Bestandteil der Therapie akuter, starker Blutungen. Künstliche Sauerstoffträger, wie Hemoglobin Glutamer-200 (HbG), könnten eine potentielle Alternative zu Erythrozytenkonzentraten darstellen. Diese sind zwar in der Lage das Sauerstoffangebot im Gewebe zu verbessern. Jedoch führte die Anwendung dieser Produkte zu einer Erhöhung der Mortalität. Eine Verschlechterung der Mikrozirkulation sowie eine pro-inflammatorische Zytokinausschüttung hervorgerufen durch eine vermehrte Induktion von Endothelin-1 könnte hierfür verantwortlich sein.

In der vorliegenden Studie sollte deshalb der HbG-abhängige Einfluss von Endothelin-1 (ET-1) auf die hepatische Mikrozirkulation, Leberfunktion sowie Zytokinreaktion nach hämorrhagischem Schock untersucht werden.

24 Stunden nach Vorbehandlung mit Vollelektrolytlösung (Vehikel) oder HbG wurden männliche Sprague-Dawley Ratten (200-300g; n=8/Gruppe) einem hämorrhagischen Schock (MAP: 30-40mmHg für 1 Stunde) gefolgt von einer zweistündigen Reperfusion unterzogen. Zusätzlich wurde in jeder Gruppe Bosentan als unspezifischer ET Rezeptor Blocker zur Beurteilung der ET-1 Wirkung verabreicht. Die Quantifizierung der ET-1 Expression erfolgte mittels PCR. Die Mikrozirkulation und der sauerstoffabhängige Redoxstatus (NAD(P)H-Autofluoreszenz) wurden mittels Intravitalmikroskopie untersucht. Die Leberfunktion wurde mittels der Indocyaningrün-Verschwinderate im Plasma (PDR_{ICG}) und die Zytokinspiegel im Serum (TNF- α und IL-10) mittels ELISA quantifiziert.

Die Vehikel-Vorbehandlung führte nach Schock/Reperfusion zu einer Erhöhung der ET-1 Expression, des hepatozellulären Schadens, der NAD(P)H-Autofluoreszenz sowie der Zytokinkonzentration und einer Verschlechterung der Mikrozirkulation und PDR_{ICG} . Die Vorbehandlung mit HbG zeigte eine weitere Erhöhung der ET-1 Expression und des hepatozellulären Schadens verbunden mit einer weiteren PDR_{ICG} Abnahme. Die Blockade der ET-Rezeptoren mit Bosentan führte nur in den Tieren nach HbG-Vorbehandlung zu einer Verbesserung der PDR_{ICG} und Leberperfusion mit vermindertem hepatozellulären Schaden und NAD(P)H. Zusätzlich wurde die Zytokinfreisetzung in Richtung einer anti-inflammatorischen Antwort moduliert.

Die Ergebnisse lassen annehmen, dass die Induktion von ET-1 von wesentlicher Bedeutung für die verzögerten negativen Effekte nach HbG-Behandlung ist.

2. Summary

Endothelin-1 contributes to hemoglobin glutamer-200-mediated hepatocellular dysfunction after hemorrhagic shock

Transfusion of human blood remains one of the most important strategies in the therapy of hemorrhagic shock after trauma or elective surgery. Hemoglobin glutamer-200 (HbG) might be an alternative to human blood. However, artificial oxygen carriers are initially successful to restore oxygen supply but may induce organ dysfunction and increase mortality several days after application in terms of delayed side effects. Impairment of microcirculation and an inflammatory cytokine response through induction of endothelin(ET)-1 may contribute.

We investigated the role of HbG-dependent ET-1 effects on liver microcirculation and liver function as well as on cytokine response in a model of hemorrhagic shock and reperfusion (H/R).

Male Sprague-Dawley rats (200-300g, n=8/group) were pretreated with Ringer's solution (vehicle) or HbG 24 hours before H/R. ET-receptors were blocked with bosentan to determine ET-1 related effects. ET-1 expression pattern was measured by polymerase-chain-reaction (PCR). Sinusoidal perfusion and redox state (NADPH-autofluorescence) were assessed using intravital microscopy. Hepatocellular function was measured using Indocyanine green clearance rate (PDR_{ICG}), cytokine levels were quantified by an enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA).

After vehicle-pretreatment H/R increased ET-1, hepatocellular injury, NAD(P)H and cytokine levels. Sinusoidal perfusion and PDR_{ICG} decreased. After HbG-pretreatment a further increase of ET-1 and hepatocellular injury was observed, while PDR_{ICG} further decreased. Application of bosentan after HbG but not after vehicle-pretreatment significantly improved PDR_{ICG} and liver perfusion, while NAD(P)H and hepatocellular injury decreased. Furthermore, cytokine release changed to an anti-inflammatory response.

These data suggest an HbG dependent increase of ET-1 which may contribute to delayed side effects under shock conditions.

3. Einleitung

3.1 Organversagen nach hämorrhagischem Schock

Das Multiorganversagen (MOV) gehört aufgrund der hohen Letalitätsrate zu den häufigsten Todesursachen auf klinischen Intensivstationen. Ein MOV kann sich als Folge eines hämorrhagischen Schocks entwickeln, welcher wiederum aus starken Blutverlusten nach Trauma, chirurgischen Eingriffen, Verbrennungen u.a resultiert. Ein MOV ist definiert als ein gleichzeitiges oder sequentielles Ausfallen verschiedener lebenswichtiger Organsysteme des Körpers (Tilney 1973; Levine 1996; Heckbert 1998; Jarrar 1999; Rensing 2001; Durham 2003; Ulvik 2007).

Starke Blutverluste führen zu einer Verminderung des zirkulierenden Blutvolumens im menschlichen Körper. Im Verlauf kann sich hieraus ein hämorrhagischer Schock entwickeln, der sich durch eine Minderperfusion der Organe und somit entstehende Dysbalance zwischen O₂-Bedarf und –Angebot charakterisiert (Adams 2001). Dadurch entsteht eine Störung der Mikrozirkulation mit Gewebhypoxie, Beeinträchtigung des Zellstoffwechsels und Anhäufung toxischer Stoffwechselprodukte. Zu Beginn sind diese funktionellen Veränderungen reversibel, im protrahierten Verlauf führen sie jedoch zu irreversiblen Schäden und schließlich zu Organversagen.

Um einen hämorrhagischen Schock durch einen fortschreitenden Blutverlust zu kompensieren, initiiert der Körper die Aktivierung des sympathiko-adrenergen Systems. Dies führt zu peripherer Vasokonstriktion und Mobilisierung kardialer Reserven und dadurch zu einer Zentralisierung des Kreislaufes. Hierunter versteht man eine Umverteilung des zirkulierenden Blutvolumens zugunsten primär lebenswichtigen Organe, wie Herz und Gehirn, mit resultierender Minderdurchblutung von Organen, die in der akuten lebensbedrohlichen Situation von untergeordneter Bedeutung erscheinen (beispielsweise Niere, Leber, Magen-Darm-Trakt und Muskulatur). Aufgrund der Minderversorgung dieser Organe entwickelt sich eine ausgeprägte Mikrozirkulationsstörung, die eine Schlüsselposition in der durch Hypoxie hervorgerufenen Gewebe- und Organschaden einnimmt, was wiederum die Entwicklung eines MOV bedeuten kann (Nuytinck 1988; Deitch 1992; Keel 2005).

Im Vordergrund der Therapie eines hämorrhagischen Schocks steht die schnelle chirurgische Versorgung der Blutungsquelle sowie eine adäquate

Volumensubstitution zur Kompensation des Blutverlustes. Andernfalls kann sich durch die Aktivierung des sympathiko-adrenergen System zur Kompensation des zunehmenden Blutverlustes ein Circulus viciosus ausbilden, der die Prognose der Patienten entscheidend verschlechtert (Bickell 1994). Die Unterbrechung des entstehenden Perfusionsdefizits und die Aufrechterhaltung der Sauerstoffversorgung der Organe ist von entscheidender Bedeutung zur Reduktion des Organversagens, wodurch eine Reduktion der Letalität erreicht werden kann (Carrico 2002).

Größere Blutverluste können nicht nur nach traumatischen Ereignissen, sondern auch im Rahmen von aufwendigen elektiven chirurgischen Eingriffen vorkommen. Durch adäquate Vorbereitung des Patienten und angepasstes perioperatives Management soll ein starker Blutverlust mit entsprechend negativen Folgen minimiert bzw. verhindert werden. Hierzu zählen die engmaschige Kontrolle der Vitalparameter, die suffiziente Volumentherapie und eine rechtzeitige Transfusion von Erythrozytenkonzentraten, die ein makro- und mikrohämodynamisches Perfusionsversagen mit Ausbildung eines Sauerstoffmangels lebenswichtiger Organe verhindern soll.

Auch wenn eine Hämorrhagie adäquat therapiert wird, kann eine vorübergehende Minderdurchblutung der Organe sekundäre Komplikationen verursachen. So führt ein Perfusionsdefizit über eine anaerobe Stoffwechsellage zu vermehrter Bildung von Sauerstoffradikalen, toxischen Stoffwechselprodukten sowie vermehrter Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen wie TNF- α (Tumor Necrosis Faktor alpha). Diese werden durch eine nachfolgende Reperfusion des ischämischen Gewebes freigesetzt, wodurch eine generalisierte Immunmodulation stattfindet (Bahrami 1997; Jarrar 1999; Jarrar 2000.) und sich als Folge das systemische inflammatorische Syndrom („Systemic Inflammatory Response Syndrom“, SIRS) manifestieren kann.

Unter SIRS versteht man einen „generalisierten“ Entzündungsprozess, der durch eine Vielzahl von Ereignissen ausgelöst wird und durch die Aktivierung verschiedener inflammatorischer Mediatorsysteme charakterisiert ist. Diese können wiederum durch die Freisetzung von vasoaktiven und permeabilitätsteigernden Substanzen zu einer kritischen Störung der Mikrozirkulation führen und somit die Bildung eines Multiorganversagens begünstigen (Baue 1998; Seekamp 1998; Keel 2005).

Gemäß den Richtlinien der “American College of Chest Physicians (ACCP)/ Society of Critical Care Medicine (SCCM) Consensus Conference Committees” von 1991

wurde der Begriff des Multiorganversagens (MOV) durch die Bezeichnung des "Multiple Organ Dysfunction Syndrome (MODS)" abgelöst und ist als Auftreten von Organdysfunktionen bei Akutkranken mit der Notwendigkeit einer intensivmedizinischen Intervention zur Aufrechterhaltung der Homöostase definiert (Bone 1992). Die Entwicklung eines SIRS und darauf folgenden MODS stellt für polytraumatisierte Patienten einen der wichtigsten prognostischen Faktoren dar (Ertel 1994; Ulvik 2007).

Die Letalität bei Versagen von vier oder mehr Organsystemen liegt trotz erheblicher Fortschritte in der Akutbehandlung, die sich vor allem auf symptomatische Therapie beschränkt, noch bei fast 100% (Durham 2003). Deshalb ist die Prävention einer Ischämie und konsekutiven Hypoxie von entscheidender Relevanz zur Reduktion der Letalität (Ertel 1994), da auch eine adäquate Reperfusion die früh nach Hämorrhagie einsetzenden Funktionsverluste der Organe unter Umständen nicht dauerhaft wiederherstellen kann (Wang 1990; Wang 1990; Wang 1991).

3.2 Stellenwert der Leber im Schocksyndrom

3.2.1 Aufbau und Funktion der Leber

Die Leber ist aufgrund ihrer zahlreichen vitalen Funktionen eines der bedeutsamsten Organe des Körpers.

Neben der Speicherung und Metabolisierung von Kohlenhydraten, Proteinen und Lipiden, zum Beispiel im Rahmen der Proteinbiosynthese, Gluconeogenese und Konjugation von Gallensäuren ist die Leber verantwortlich für die Eliminierung toxischer Stoffwechselprodukte. Zusätzlich nimmt die Leber eine Rolle als Immunorgan ein (Malarkey 2005).

Aminosäure- stoffwechsel	Protein- stoffwechsel	Kohlenhydrat- stoffwechsel	Entgiftungsfunktion	Bilirubin- stoffwechsel	Cholesterin- stoffwechsel
Aufbau von Aminosäuren (AS) Abbau von AS über Harnstoffbio- synthese	Synthese von Plasmaproteinen: Gerinnungs- faktoren Akute-Phase- Proteine Apoproteine Albumin	Gluconeogenese, Glycogenolyse Glycogenbildung, Glykolyse	Metabolisierung von Xenobiotika v. a. über Cytochrom-P450- abhängige Monooxygenasen	Konjugation und Exkretion von Bilirubin	De- novo- Synthese Exkretion Bildung von Gallensäuren und Steroiden

Tabelle 1: Überblick über die wichtigsten Funktionen der Leber

Die Leber setzt sich aus einer Vielzahl von Zellen zusammen. Grundsätzlich wird in parenchymatöse und nicht-parenchymatöse Zellen unterteilt. Die parenchymatösen Zellen, auch Hepatozyten genannt, bilden 80% des Lebervolumens und 60% der Gesamtzellzahl der Leber (Malarkey 2005; Kmiec 2001). Sie sind verantwortlich für die Synthese-, Stoffwechsel-, und Exkretionsleistung der Leber.

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

Als von der Anzahl her bedeutsamsten nicht-parenchymatösen Zellen mit 20% der Leberzellen stellen die sinusoidalen Endothelzellen einen hochspezialisierten Zellverband dar. Aufgrund seiner Fenestrierung, fehlenden Basalmembran und Vielzahl von Oberflächenrezeptoren unterscheidet er sich von Endothelzellen anderer Gefäßabschnitte (Wisse 1996; Braet 2002; Enomoto 2004; Smedsrod 2004). Kupferzellen sind ortständige Makrophagen der Sinusoide. 60% aller Makrophagen des Körpers befinden sich in der Leber, zu ihren Funktionen gehört die direkte (unspezifische) Elimination von Mikroorganismen und Tumorzellen durch Phagozytose sowie die Unterstützung des spezifischen Abwehrsystems durch Antigenpräsentierung und Produktion kostimulierender Zytokine wie z.B. reaktive

Sauerstoffmetaboliten, Eicosanoide, Stickstoffmonoxid (NO), Kohlenstoffmonoxid (CO) und den Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) (Bouwens 1992; Wisse 1996; Kmiec 2001; Naito 2004; Wake 2004; Malarkey 2005). Die Kupferzellen spielen so eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie des Schocksyndroms sowie über die Expression von Hämoxxygenase-1 in der Regulation des Häm-Stoffwechsels und der Bilirubin-Exkretion (Hirano 2001; Kobayashi 2002).

Itozellen stellen 10% der nicht-parenchymatösen Zellen der Leber dar. Sie entsprechen den Perizyten des perisinusoidalen Raums und werden auch als Sternzellen oder Fettspeicherzellen bezeichnet. Als Charakteristikum weisen sie eine hohe Dichte an perinukleären Fettkörperchen auf, in denen unter physiologischen Bedingungen 80% des Gesamtbestandes des Körpers an Vitamin A gespeichert ist (Suematsu 1993; Sato 2003). Sie liegen außerdem den sinusoidalen Endothelzellen auf und stehen mit Hilfe ihrer bis zu 40 μ m langen dendritischen Zellausläufern in Kontakt zu den Parenchymzellen der Leber. Aufgrund kontraktiler Ausläufer aus Alpha-SM-Actin in diesen Dendriten sind die Itozellen für die Regulation des sinusoidalen Durchmessers und somit der Mikrozirkulation der Leber verantwortlich (Skalli 1989; Kawada 1993; Rensing 2002).

3.2.2 Hepatozelluläre Veränderungen im hämorrhagischen Schock

Hypoxieschäden, die durch eine Minderperfusion der Leber bei hämorrhagischem Schock auftreten, können die Schutzfunktion der Leber beeinträchtigen. Aus dem Pfortadersystem gelangen vermehrt Endotoxine und Bakterien in den Blutkreislauf, die die Detoxifikationskapazität der Lebermakrophagen überschreiten kann, sodass durch den Übertritt dieser Substanzen in den pulmonalen und systemischen Kreislauf eine Sepsis begünstigt wird (Marzi 1994).

Sämtliche Zellsysteme der Leber werden während eines hämorrhagischen Schocks beeinflusst. Neben der direkten hepatozellulären Schädigung kommt es zu einer Funktionsstörung der Endothelzellen (Schwellung, Expression von Adhäsionsrezeptoren, Endothelschädigung), verstärkter Aktivierung der Kupferzellen (Phagozytose, Mediatorenfreisetzung) und der Ito-Zellen (Verkürzung der kontraktile Elemente, Vasokonstriktion). Insbesondere die pathophysiologischen Veränderungen der nicht-parenchymatösen Zellen führen zu Störungen der

Lebermikrozirkulation mit Störung der sinusoidalen Perfusion und Dysregulation der Hepatozytenfunktion (Vollmar 1993). Als direkte Hypoxiefolge kommt es in der Leber nach Schock zu perizentraler Hepatozytennekrose, im Rahmen der Ischämie und Reperfusion kommt es durch Bildung von Sauerstoffradikalen zu einer weiteren midzonalen Schädigung.

Die Schwere der Leberfunktionsstörung korreliert mit dem Voranschreiten des dekompenzierten Schocks (Kobelt 1994), sodass angenommen werden kann, dass diese eine Basis für das Versagen weiterer Organsysteme darstellt. Eine intakte Leberfunktion ist demnach wichtig als Schutz vor Dekompensation und Entstehen eines MODS im hämorrhagischen Schock, da ein manifestes Leberversagen im Rahmen eines MODS einen prognostisch limitierenden Faktor darstellt, auch aufgrund der therapeutisch begrenzten Möglichkeiten (Marzi 1994).

Somit ist das Erhalten einer intakten Leberfunktion nach hämorrhagischem Schock ein wichtiger Ansatzpunkt in der Therapie nach Schock und Prävention eines MODS.

Mikrozirkulationsstörungen scheinen bei der Entwicklung eines Leberversagens unter Schock eine kausale Rolle zu spielen (Nunes 1970; Vollmar 1993; Vollmar 1995). Diese sind gekennzeichnet durch eine Inhomogenität der Kapillardurchblutung, ungenügendem Sauerstoff- und Substratantransport sowie gestörtem Abtransport von Metaboliten mit nachfolgender Hypoxie und Azidose des Gewebes. Unter hämorrhagischem Schock kommt es zu einer Reduzierung der perfundierten Sinusoide und gleichzeitig zu einer Abnahme des sinusoidalen Durchmessers (Koo 1977), resultierend in einem mikrovaskulären Versagen des sinusoidalen Netzwerkes der Leber (Clemens 1997). Die Einschränkung der Mikrozirkulation korreliert hierbei mit dem eingeschränkten Energiestoffwechsel und einer Einschränkung der Leberfunktion.

Störungen der Mikrozirkulation aufgrund des hämorrhagischen Schocks sind dabei nicht auf die Leber beschränkt, sondern entstehen auch in anderen Organen, wie z.B. Darm und Pankreas (Garrison 1998; Krejci 2000).

Es wurde festgestellt, dass diese Reduzierung des mikrovaskulären Blutflusses trotz adäquater Volumengabe und somit Verbesserung der Makrozirkulation in der Schocktherapie weder verbessert noch verhindert werden konnte (Wang 1990). Ein Erfolg der Schocktherapie wäre somit eine Normalisierung der Mikrozirkulation neben

der Erholung der Makrozirkulation. Durch eine intakte Mikrozirkulation kann auch der Ischämie-Reperfusionsschaden positiv beeinflusst werden (Chun 1994).

3.3 Künstliche Sauerstoffträger

Die Substitution von humanen Erythrozytenkonzentraten stellt immernoch einen wichtigen Pfeiler in der Therapie von hämorrhagischem Schock, sowohl im Rahmen von Trauma als auch bei perioperativem Blutverlust, dar.

Neben der Infektionsgefahr mit humanpathogenen Viren wie z.B. HIV oder Hepatitis und anaphylaktischen Reaktionen im Rahmen einer Transfusion mit menschlichen Erythrozytenkonzentraten, sind diese auch nur limitiert verfügbar (Amberson 1949). Ein Blutgruppen-unabhängiger, immer verfügbarer Blutersatzstoff zur Substitution bei großem Blutverlust ist klinisch deshalb von besonderem Interesse.

In den letzten Jahrzehnten wurden mehrere künstliche Sauerstoffträger, die als Alternativen zur allogenen Bluttransfusion einsetzbar sein sollten, entwickelt. Diese sind in der Lage, die Sauerstoffträgerfunktion der Erythrozyten zu übernehmen (Levy 2003). Vor allem DCLHb (Diasparin-crosslinked hemoglobin) und Hämoglobin-Glutamer 200 (HbG) waren aufgrund der vielen gemeinsamen Charakteristika zu humanem Blut vielversprechend. Viele Studien mit DCLHb haben jedoch multiple negative Nebenwirkung von azellulärem Hämoglobin nachgewiesen (Mondoro 1998; Everse 1997). Klinischen Studien zeigten, dass eine Behandlung mit DCLHb nach hämorrhagischem Schock (Sloan 1999) oder ischämischem Infarkt (Saxena 1999) die Mortalität deutlich erhöhte. Als wesentlicher Grund für die erhöhte Letalität nimmt man eine, durch das azelluläre Hämoglobin verursachte, Vasokonstriktion aufgrund einer erhöhten NO-Affinität des azellulären Hämoglobins an. Die Vasokonstriktion führt zu Störung der Mikrozirkulation und daraus resultierender Organdysfunktion (Doherty 1998). Diese Wirkung war nicht direkt nach der DCLHb Gabe, sondern verzögert nach mehreren Tagen zu beobachten. Die klinisch Erprobung von DCLHb wurde mittlerweile aufgrund dieser negativen Ergebnisse in Phase-III Studien (Keipert 1993; Winslow 2000; Winslow 2003) gestoppt.

Hämoglobin-Glutamer (HbG) ist ein bovines, polymerisiertes, azelluläres Hämoglobinmolekül, welches von sämtlichen Plasmaproteinen und Zellbestandteilen der Erythrozyten gereinigt wurde. Wie DCLHb wurde dieser künstliche

Sauerstoffträger als Alternative zur allogenen Erythrozytentransfusion entwickelt (Levy 2003). Auch wenn klinische Studien eine gute Verträglichkeit dieser Lösung demonstrierten (Sprung 2002), zeigten experimentellen Studien widersprüchliche HbG-vermittelte Ergebnisse.

Einerseits führte eine Vorbehandlung mit HbG 24 Stunden vor Schock zu einer Erhöhung der Organdysfunktion und Mortalität (Kubulus 2005) sowie eine Reperfusion mit HbG zu einer mangelnden Wiederherstellung der Perfusion und der Sauerstoffabgabe ans Gewebe (Driessen 2003). Andererseits konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit HbG den mittleren arteriellen Blutdruck anheben und das Sauerstoffangebot im Gewebe nach hämorrhagischem Schock (Driessen 2007) oder Schädelhirntrauma (King 2005) verbessern kann.

Die Mechanismen dieser sich widersprechenden Effekte sind nicht eindeutig geklärt. Eine negative Modulation der Mikrozirkulation durch Vasokonstriktion sowie eine direkte Zelltoxizität mit darauffolgender Organdysfunktion scheinen für die verzögerten negativen Effekte dieser Lösungen von wesentlicher Bedeutung zu sein. Zum Einen können die artifizielle Sauerstoffträger eine Vasokonstriktion durch eine erhöhte NO-Affinität (Winslow 2003; Olson 2004), eine durch Sauerstoff vermittelte Konstriktion der druckregulierenden Gefäße (Winslow 2003) oder durch eine vermehrte Bildung von Endothelin-1 (Cocks 1991; Ohlstein 1992; Lin 2001) induzieren.

Zusätzlich könnte das durch den Abbau des freien Hämoglobins freigesetzte Eisen als Pro-Oxidant, die Bildung von freien Wasserstoffradikalen (OH⁻) in der Fenton oder Haber-Weiss-Reaktion (Goldman 1998) begünstigen und somit eine zelluläre Dysfunktion durch eine mitochondriale Schädigung beschleunigen (Duvigneau 2008). Darüber hinaus ist eine vermehrte Bildung von ET-1 mit einer pro-inflammatorischen Reaktion, welche zu einer Steigerung der Organfehlfunktion und Mortalität beitragen kann, assoziiert (Sabaa 2008).

Entsprechend ist die Erforschung der direkten und verzögerten Auswirkungen dieser Lösungen auf die Mikrozirkulation und Organfunktion und deren zugrundeliegende Mechanismen von entscheidender Bedeutung, um zukünftig sichere Präparate entwickeln zu können.

3.4 Endothelin-1

Die Mikrozirkulation der Leber wird durch unterschiedliche vasoaktive Substanzen reguliert, welche durch Stressereignisse, wie z.B. Ischämie, induzierbar sind. Hierzu gehören Stickstoffmonoxid (NO), Kohlenstoffmonoxid (CO) und Endothelin-1 (ET-1). CO und NO wirken vasodilatierend, während ET-1 vasokonstriktorische Eigenschaften aufweist (Rensing 2002). Durch Beeinflussung des Sinusoiddurchmessers scheinen diese einen bedeutenden Einfluss auf die nach ischämischen Stressereignissen beobachtete Perfusionsheterogenität in der Leber und somit auf das mikrovaskuläre Perfusionsversagen zu haben (Rensing 2002).

Die ET-1 Wirkung wird vorwiegend über Endothelin-Rezeptoren auf Ito-Zellen vermittelt, welche unter anderem für die Regulation des Lebersinusoiddurchmessers und somit der hepatischen Mikrozirkulation verantwortlich sind (Kawada 1993; Zhang 1994).

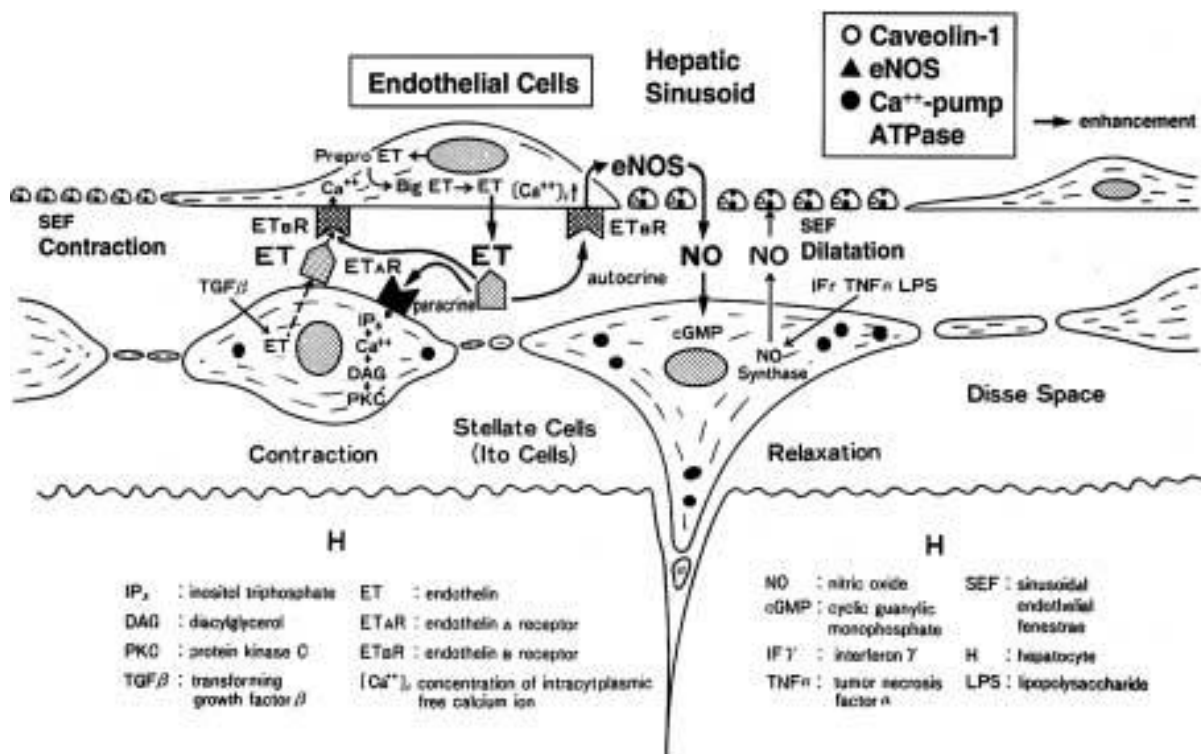


Abbildung 1: Lokale Regulationsmechanismen der sinusoidalen Mikrozirkulation der Leber.

Das vasokonstriktorische ET-1 sowie das vasodilatatorische NO werden von der sinusoidalen Endothelzelle sezerniert. ET-1 wirkt sowohl exokrin auf die hepatischen Ito-Zellen (HSC) über ET_A-Rezeptoren als auch endokrin direkt auf die sinusoidale Endothelzelle über ET_B-Rezeptoren. Dies resultiert durch Erhöhung des intrazellulären Ca²⁺ in einer Konstriktion mit Zunahme des sinusoidalen Widerstands. Eine Ca²⁺-Calmodulin gesteuerte Bildung von NO führt im Gegensatz dazu zu einer Dilatation der Ito-Zellen und sinusoidalen Endothelzellen mit Reduzierung des sinusoidalen Widerstandes. (nach Oda 2003).

Unter Schockbedingungen kommt es zu einer vermehrten Expression des Vasokonstriktors ET-1 und der vasodilatatorisch wirkenden Hämoxxygenase-1 (Rensing 2002). In Abhängigkeit der Expression, könnte die überwiegende Induktion von ET-1 zu einer Vasokonstriktion und somit einer Verschlechterung der Mikrozirkulation unter hämorrhagischem Schock führen.

Die Präkonditionierung mit HbG induziert zwar die Bildung von HO-1, eine erhoffte Verbesserung der Mikrozirkulation konnte jedoch nicht festgestellt werden (Kubulus 2005). Im Gegensatz, HbG führte zu einer Zunahme von Organversagen und

hierdurch zu einer Erhöhung der Mortalität nach hämorrhagischem Schock (Kubulus 2005).

Der genaue Mechanismus ist bis jetzt nicht geklärt. Eine HbG-bedingte Zunahme der Expression von Endothelin-1 könnte jedoch eine wichtige Rolle spielen, da freies Hämoglobin bekannterweise zu einer Erhöhung der ET-1 Expression führt (Lin 2001).

3.5 Zytokinantwort im hämorrhagischen Schock

Eine überschießende Aktivierung von inflammatorischen Zellen und Mediatoren im Rahmen von schweren Traumata, hämorrhagischem Schock und Ischämie-Reperfusionsschäden scheint eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung von Organschäden und Organversagen zu spielen (Roumen 1993; Hildebrand 2005).

Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) ist ein pro-inflammatorisches Zytokin, welches vor allem von Makrophagen und Monozyten gebildet wird. Neben seiner zytolytisch bzw. zytostatischen Wirkung auf Tumorzellen hat es Einfluss auf Entzündung, Sepsis, Hämatopoese, Angiogenese, Wundheilung, Immunabwehr und den Lipid- und Proteinstoffwechsel.

Bei Patienten mit MODS und nach Trauma und Hämorrhagie konnte ein deutlicher Anstieg von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α festgestellt werden (Roumen 1993; Hildebrand 2005; Seekamp 1998), wobei der erhöhte TNF- α Spiegel mit einer erhöhten Sterblichkeit nach Trauma korrelierte (Roumen 1993).

Im Gegensatz dazu ist Interleukin-10 (IL-10) ein anti-inflammatorisches Zytokin, welches von T-Helferzellen exprimiert wird und zu einer Inhibition der Makrophagen führt. Ursprünglich wurde es aufgrund dieser Eigenschaft als „cytokine synthesis inhibitor factor“ (CSIF) identifiziert. IL-10 supprimiert unter anderem die Bildung von TNF- α und die T-Zell-vermittelte Immunreaktion. Darüber hinaus konnte IL-10 eine besondere Bedeutung in der Gegenregulation der frühen inflammatorischen Reaktion nach Trauma und Hämorrhagie zugeschrieben werden (Schneider 2004). Eine fehlende Hochregulation von IL-10 bei Trauma-Patienten könnte so zu einer verstärkten Organdysfunktion führen (Khadaroo 2004).

Da Serum-Zytokinpiegel bei polytraumatisierten Patienten mit generalisiertem Ischämie-Reperfusionsschaden nach hämorrhagischem Schock mit der Entwicklung

von MODS korrelieren, könnten diese früh posttraumatisch als prädiktive Faktoren genutzt werden (Seekamp 1998; Hildebrand 2005).

Eine durch HbG zusätzlich zur negativen Beeinflussung der Mikrozirkulation vermittelte Hochregulation der pro-inflammatorischen mit Suppression der anti-inflammatorischen Zytokine könnte die beobachtete Zunahme der Organdysfunktion und Letalität erklären.

3.6 Modelle

3.6.1 Hämorrhagisches Schockmodell

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

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

Der CaO_2 ist definiert als:

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

wobei Hb die Hämoglobinkonzentration (g/dl), der PaO_2 der Sauerstoffpartialdruck im arteriellen Blut und O_2Sat die Hämoglobin- O_2 -Sättigung darstellt. Daraus ergibt sich, dass ein Herabsetzen des Blutflusses, der Hämoglobinkonzentration oder der Hämoglobinsauerstoffsättigung einen direkten Einfluss auf den Sauerstofftransport hat.

Die Abnahme des arteriellen Sauerstoffgehaltes wird als Hypoxämie bezeichnet, beim hämorrhagischen Schock spricht man von einer anämischen Hypoxämie (durch niedrigen Hb). Weiterhin können bei Herabsetzen des Sauerstofftransportes adaptive Veränderungen des Sauerstoffverbrauches (VO_2) auftreten, die als

kompensatorische Mechanismen die Gewebe vor Änderungen des Blutflusses und der Hämoglobinkonzentration schützen.

Aufgrund der komplexen Auswirkungen eines hämorrhagischen Schocks auf den Organismus und der zentralen Position der Leber mussten die Untersuchungen in Tierversuchen unternommen werden.

Zur Auswahl standen verschiedene Kleintiermodelle für den hämorrhagischen Schock. Dabei unterscheidet man Modelle, bei denen ein definiertes Blutvolumen entnommen wird, sogenannte „fixed volume hemorrhage“-Modelle, und Modelle, bei denen ein definierter Blutdruck aufrecht erhalten wird, sogenannte „fixed pressure hemorrhage“-Modelle. Außerdem existieren Modelle, die mit unkontrollierter Hämorrhagie arbeiten um so eine möglichst kliniknahe Situation zu erzeugen. Diese haben jedoch den erheblichen Nachteil, einen nicht standardisierten Blutverlust und Grad der Hypotension zu haben und sind so nur gering reproduzierbar. Deshalb wurde ein Modell mit kontrollierter Hämorrhagie gewählt. Ein Modell mit definiertem Blutdruck erlaubt ein genaues Monitoring und die Kontrolle von Hypotension, Dauer des Schocks und Volumen und ist nicht vom Hydratationszustand des Tieres abhängig. Die Wahl fiel demnach auf ein „fixed pressure hemorrhage“-Modell, um ein möglichst hohes Maß an Standardisierung und Reproduzierbarkeit einer Simulation einer Low-flow-Ischämie zu erreichen.

Weitere Faktoren, die die Modelle beeinflussen, sind die Verwendung von Heparin und Anästhesie. Prophylaktische Heparinisierung und Anästhesie führen zu einer Organprotektion (Lomas-Niera 2005), d.h. dass bei heparinisierten und anästhesierten Tieren zur Erzielung eines vergleichbaren pathophysiologischen Endpunktes wie Dekompensation oder Organschaden längere Hypotensionsphasen als bei nicht-heparinisierten, nicht-anästhesierten Tieren notwendig sind.

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

Aus ethischen Gründen wurde auf eine Anästhesie der Tiere nicht verzichtet. Die Versuchstiere wurden mittels Phenobarbital, einem langwirksamen Barbiturat, narkotisiert. Um das Modell kliniknah zu gestalten, wurde der mittlere arterielle Druck (MAP) auf 35 ± 5 mmHG gesenkt und die Dauer des Schocks auf 60 Minuten festgelegt. Zur Volumentherapie wurde ein Substitutionsschema, basierend auf der Retransfusion von 60% des entzogenen Blutverlustvolumens und Ringerlaktatlösung entsprechend dem dreifachen Blutverlustvolumen, angewendet. Darunter ergab sich

eine leichte Hämodilution mit Hämatokritwerten zwischen 25 und 30%, wie sie auch klinisch nach überlebtem Schockereignis angestrebt wird, sowie eine Wiederherstellung des MAP und der Herzfrequenz mit supranormalen Herzzeitvolumina (HZV).

In der vorliegenden Arbeit wurde ein hämorrhagisches Schockmodell am Kleintier angewandt, um mögliche verzögerte negative Auswirkungen einer Vorbehandlung mit HbG auf die hepatische Mikrozirkulation zu demaskieren und untersuchen zu können.

3.6.2 Präkonditionierung zur Induktion der verzögerten Wirkung von HbG

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

Normalerweise soll durch dieses Verfahren eine Expression unterschiedlicher protektiver Mediatoren induziert werden, die einer Ischämie-bedingten Organdysfunktion und somit einer Schock-induzierten Letalität entgegenwirken.

In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch dieses Verfahren gewählt, nicht um eine protektive Präkonditionierung durchzuführen, sondern um verzögerte Effekte des hämoglobin-basierten Sauerstoffträgers HbG zu untersuchen.

3.7 Fragestellung

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

1. Beeinflusst die Vorbehandlung mit HbG die Mikrozirkulation der Rattenleber und die hepatozelluläre Funktion nach Hämorrhagie und Reperfusion?
2. Führt die Vorbehandlung mit HbG zu einer Konstriktion der Sinusoide der Rattenleber nach Hämorrhagie und Reperfusion?
3. Ist die eventuell auftretende Konstriktion der Sinusoide auf eine verstärkte Induktion der ET-1 Expression durch HbG zurückzuführen?
4. Verhindert eine Blockade der ET-1 Rezeptoren den HbG-vermittelten Einfluss auf die Mikrozirkulation?
5. Verhindert eine Blockade der ET-1 Rezeptoren einen HbG vermittelten Zellschaden?
6. Welchen Einfluss hat die Vorbehandlung mit HbG auf die Zytokinantwort von TNF- α und IL-10 nach H/R und ist diese von der ET-1 Freisetzung abhängig?

4. Material und Methodik

4.1 Versuchstiere

Alle Tierversuche wurden gemäß den Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes und nach Zustimmung durch die örtliche Tierschutzbehörde durchgeführt. Als Versuchstiere dienten insgesamt 80 männliche Sprague- Dawley-Ratten (Charles River, Fa. Wiga, Sulzheim, Deutschland) mit einem Gewicht von 200-300g, entsprechend einem Alter von 8-10 Wochen. Bis zum Tag des Versuches befanden sich die Tiere unter klimatisierten Bedingungen (Lufttemperatur 22-24°C, relative Luftfeuchtigkeit ca. 60%) in der Versuchstierhaltung des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie, Universität des Saarlandes, Homburg/Saar (Tierschutzbeauftragte Frau Dr. med. vet. M. Frings). Die Fütterung erfolgte mit Standardlaborfutter sowie Wasser ad libitum.

Nur Versuchstiere, die keine Anzeichen auf Erkrankung aufwiesen, wurden in die Versuchsreihe aufgenommen.

4.2 Versuchsdesign

Die Studie erfolgte in zwei Studienabschnitten. Eine Versuchsreihe diente der Untersuchung der Auswirkung der pharmakologischen Präkonditionierung auf die Mikrozirkulation nach hämorrhagischem Schock und Reperfusion.

Die zweite Versuchsreihe diente zur quantitativen Bestimmung der Auswirkung der pharmakologischen Präkonditionierung auf die Leberfunktion nach hämorrhagischem Schock und Reperfusion.

4.2.1. Versuchsgruppen

Die Zuteilung der Tiere auf die jeweiligen Versuchsgruppen erfolgte randomisiert.

Als Referenzgruppe (Sham) dienten Tiere, die nicht vorbehandelt und keinem Schock unterzogen wurden.

Vor Versuchsbeginn wurden alle Tiere gewogen, um eine gewichtsadaptierte Applikation der entsprechenden Substanz gewährleisten zu können.

Vorbehandlung	Anzahl der Tiere	
	IVM	ICG
Keine (Sham)	n = 8	n = 8
Vehikel (Vollelektrolytlösung)	n = 8	n = 8
Vehikel+Bosentan (Vollelektrolytlösung+ Bosentan)	n = 8	n = 8
HbG	n = 8	n = 8
HbG + Bosentan	n = 8	n = 8
Gesamt	n = 40	n = 40

Tabelle 1: Einteilung der Versuchsgruppen

4.2.2. Versuchsprotokolle

Die Versuchstiere der Schock-Gruppen wurden 24 Stunden vor Einleitung des hämorrhagischen Schocks mit 30 ml/kg Vollelektrolytlösung (Vehikel) oder 1 g/kg Hämoglobin-Glutamer gelöst in 30 ml/kg Vollelektrolytlösung (HbG, Biopure, Amsterdam, Niederlande) intravenös in Äthernarkose vorbehandelt. 24 Stunden nach Vorbehandlung wurden die Tiere (Vehikel, HbG, jeweils n=8) einem einstündigen hämorrhagischen Schock und nachfolgend einer zweistündiger Reperfusion unterzogen. Anschließend erfolgte die intravitalmikroskopische Beurteilung der Mikrozirkulation.

Zur Quantifizierung der Leberfunktion wurde im zweiten Studienabschnitt (Vehikel, HbG, jeweils n=8) 24 Stunden nach Vorbehandlung ein hämorrhagischer Schock durchgeführt. Nach der 2-stündigen Reperfusion erfolgte dann die Bestimmung der Plasmaverschwinderrate von Indocyaningrün (PDR_{ICG}).

In weiteren Versuchsgruppen erfolgte die Beurteilung der physiologischen Bedeutung der ET-1 Expression auf die Mikrozirkulation und Leberfunktion nach hämorrhagischem Schock. Hierzu wurden 24 Stunden nach Vorbehandlung mit Vollelektrolytlösung oder HbG die ET-Rezeptoren durch intravenöse Injektion des unspezifischen ET-Rezeptor Antagonisten Bosentan (Actelion, Allschwil, Schweiz, 10mg/kg) 15 min vor Beginn des hämorrhagischen Schocks blockiert (Vehikel+Bosentan; HbG+Bosentan; jeweils n=8).

Zum Vergleich wurden scheinoperierte Tiere (Sham) analog zu den präkonditionierten Schock-Gruppen präpariert und untersucht, wobei in diesen Gruppen keine vorangehende Vorbehandlung und kein hämorrhagischer Schock durchgeführt wurde.

Am Ende der Versuche wurde Lebergewebe zur Analyse der Endothelin-1 und der Glutathionsynthetase-1 (GluS-1) Expression entnommen. Zusätzlich wurde zur Quantifizierung der Leberenzyme und der Zytokinantwort Serum aserviert.

Vor Einleitung des hämorrhagischen Schocks (t_0), zum Ende des hämorrhagischen Schocks (t_1) und am Ende der Reperfusionphase (t_2) wurden direkt nach Blutentnahme Blutgasanalysen durchgeführt.

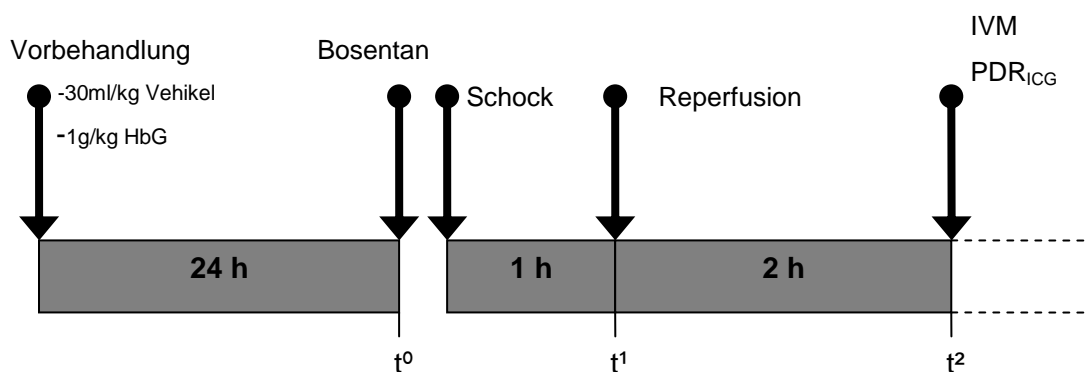


Abbildung 1: Darstellung des zeitlichen Ablaufes der Versuche.

Vehikel: Vollelektrolytlösung; *HbG:* Hämoglobin-Glutamer-200; *Schock:* hämorrhagischer Schock; *IVM:* Intravitalmikroskopie; *PDR_{ICG}:* Plasmaverschwinderate von Indocyaningrün
 t^0 , t^1 , t^2 : Zeitpunkte der Blutgasanalysen.

4.3. Versuchsdurchführung

4.3.1 Anästhesie der Versuchstiere

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

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

Die Hauptversuche mit anschließender Intravitalmikroskopie bzw. Messung der PDR_{ICG} erfolgten dagegen unter Pentobarbitalnarkose (Narcoren®, Merial GmbH,

Hallbergmoos), wobei das Anästhetikum zunächst intraperitoneal (initial 50 mg/kg KG i.p.) und nach Anlage des zentralvenösen Zugangs intravenös verabreicht wurde. Diese Methode wurde gewählt, um eine lang dauernde wirksame Anästhesie und Analgesie bei vorhandener Spontanatmung erreichen zu können.

4.3.2 Pharmakologische Vorbehandlung der Versuchstiere

Nach Anlage einer sterilen Venenverweilkanüle (24 G, Optiva W, Medex Medical Ltd., Rossendale, Großbritannien) in eine Schwanzvene erfolgte über diese 24 Stunden vor Beginn der Schockversuche eine pharmakologische Vorbehandlung. Den Tieren wurde insgesamt 30 ml/kgKG Flüssigkeit langsam injiziert, wobei je nach Zuteilung zur Versuchsgruppe entweder nur Vollelektrolytlösung (Vehikel) oder HbG (1 g/kg KG) gelöst in der Vollelektrolytlösung appliziert wurde.

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

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

4.3.3 Chirurgische Präparation

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

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

Im nächsten Schritt erfolgte die stumpfe Präparation der rechten Vena jugularis externa. Anschließend wurde nach kranialer Ligatur das Gefäß eröffnet und der Zentralvenenkatheter (ZVK; Polyethylen (PE) 50-Kunststoffschlauch) platziert, der durchvorgelegte Fäden proximal der Punktionsstelle einfach und distal zweifach gesichert wurde. Nach Anlage des ZVK wurden über diesen für die weitere Dauer der Präparation Vollelektrolytlösung zur Sicherung des Basisbedarfs (10ml/kg KG/h) über

einen Perfusor (Perfusor® segura FT, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) appliziert. Über den ZVK erfolgte außerdem die weitere Pentobarbitalgabe zur Aufrechterhaltung der Narkose sowie später die Retransfusion des Blutes und der Vollelektrolytlösung während der Reperfusionsphase.

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

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

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

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

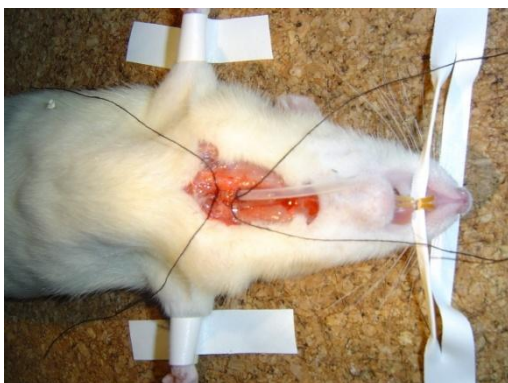


Abbildung 2: Hals-Situs nach Einlage der Trachealkanüle



Abbildung 3: Nach Ende der Präparation

4.3.3.1 Besonderheit der Gruppen mit Bosentan

In diesen Gruppen erfolgte nach beendeter Präparation des Halses 15 Minuten vor Induktion des hämorrhagischen Schocks die intravenöse Injektion von Bosentan.

4.3.4 Hämorrhagischer Schock und Reperfusion

Die Induktion und Aufrechterhaltung des hämorrhagischen Schocks erfolgte in Anlehnung an das isobare, heparinfreie Schockmodell nach WIGGERS und INGRAHAM (1946): Die Infusion von Vollelektrolytlösung (10 ml/kg KG/h) wurde beendet und der mittlere arterielle Blutdruck durch raschen arteriellen Blutentzug auf 35 ± 5 mmHg gesenkt und für die Dauer von 60 Minuten in diesem Bereich konstant gehalten, wobei endogenen Kompensationsversuchen durch weitere Blutentnahmen begegnet wurden. Das entzogene Blut wurde mit Zitrat-Phosphat-Dextrose (0,14ml/ml Blut) antikoaguliert und in den Entnahmespritzen (5ml) zur Retransfusion aufbewahrt.

Nach Ende der 60-minütigen Schockphase wurde zunächst eine arterielle Blutprobe ($t^1 = 0,3$ ml) zur Blutgasanalyse entnommen. Im Anschluss daran begann die Reperfusionsphase. Zunächst wurden 60% des entnommenen und antikoagulierten Blutes über 10 Minuten langsam retransfundiert. Des Weiteren erfolgte über die nächste Stunde die Infusion von Vollelektrolytlösung entsprechend der Menge von 200% des entnommenen Blutvolumens und in der sich anschließenden 2. Stunde der Reperfusionsphase die Infusion von Vollelektrolytlösung entsprechend der Menge von 100% des entnommenen Blutvolumens mittels Perfusor.

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

4.3.5 Intravitalmikroskopie (IVM)

Der intravitalmikroskopische Arbeitsplatz setzte sich wie folgt zusammen:

1. Mikroskop Zeiss Axiovert 135 (Carl Zeiss Inc., Göttingen, Deutschland) mit 5-fach Objektivrevolver bestückt mit zwei Objektiven (Zeiss A-Plan 5x NA 0.12 / 40x NA 0.50).
2. Beleuchtungseinheit, die sich zusammensetzte aus einer 100 W Quecksilberlampen (HBO 100W OFR, Osram, Augsburg, Deutschland) und verschiedenen Filtersätzen (Exzitation 485 nm, diachronischer Spiegel 510 nm, Emission 515-565 nm)

3. Rechner-Einheit zur Bildaufnahme, bestehend aus einer hochauflösenden digitalen Kamera (C 4742-95, Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Herrsching, Deutschland), angeschlossen an einen Standard-PC (Pentium 4, 3.0 GHz). Alle Bilder wurden mittels hochauflösender Software (SimplePCI, Version 5.3, Compix Inc. Imaging Systems, Cranberry Township, USA) aufgenommen.

4.3.5.1 Chirurgische Vorbereitung

Nach Beendigung der zweistündigen Reperfusionphase und Entnahme der Blutprobe t² erfolgte die Präparation der Versuchstiere unter anderem für die Intravitalmikroskopie.

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

Anschließend erfolgte die Mobilisierung des linken Leberlappens, indem das Lig. Falciforme und weitere Bänder zwischen den Leberlappen vorsichtig durchtrennt wurden. Hiernach wurde das Versuchstier auf der linken Körperseite auf der vorbereiteten Arbeitsplatte fixiert und der linke Leberlappen auf einem in die Arbeitsplatte eingearbeitetem Objektträger ausgelagert (Abbildung 6).

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



Abbildung 4: IVM-Arbeitsplatz

4.3.5.2 Durchführung der Intravitalmikroskopie

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

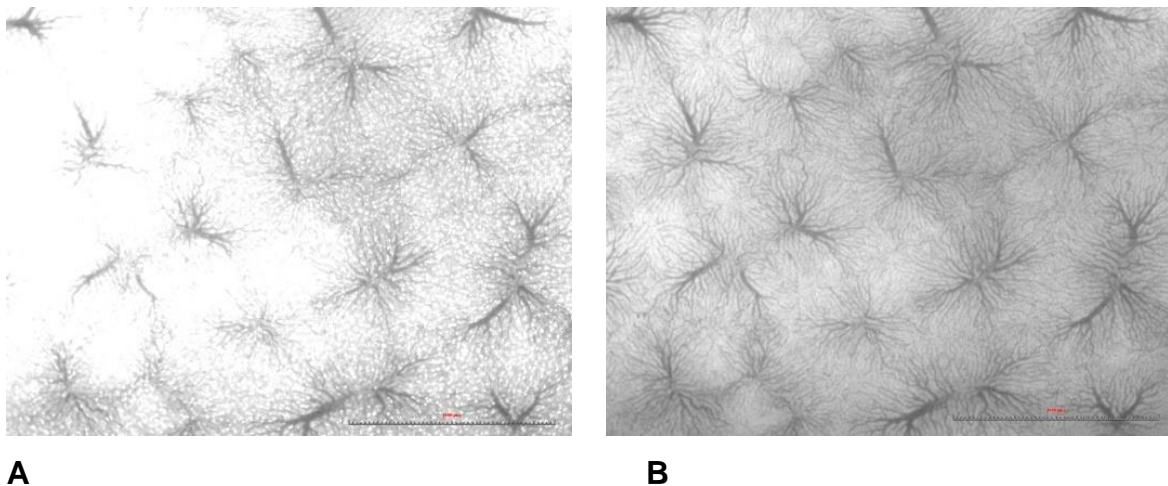


Abbildung 5: Aufnahmen zur NAD(P)H-Autofluoreszenz.

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

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

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

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

4.4 Plasmaverschwinderate von Indocyaningrün (PDR_{ICG})

Die Beurteilung der exkretorischen Leberfunktion erfolgte anhand der Plasmaverschwinderate von Indocyaningrün. ICG (Pulsion, München, Deutschland) wurde unmittelbar vor der Infusion in destilliertem Wasser in einer Konzentration von 2,5mg/ml frisch gelöst. Nach Schock und zweistündiger Reperfusion wurde den Tieren über den Jugularvenenkatheter ICG in einer Dosierung von 5mg/h eine Stunde lang mittels eines Perfusors appliziert, um ein steady state zu erreichen. Zur Vermeidung der Phototoxizität wurden sämtliche Schläuche und Spritzen mit Aluminiumfolie geschützt. 15 min vor Entnahme der Blutproben wurden die Tiere mit 300IE/kg KG vollheparinisiert. Nach Abschalten des ICG-Perfusors erfolgten die Blutentnahmen von jeweils 0,3ml zu den Zeitpunkten 0, 2, 4, 6, 8, 10, 15 und 20 Minuten. Die Blutproben wurden direkt nach Entnahme bei 10000 U/min über 5 Minuten zentrifugiert und der Serumüberstand zur Messung der PDR_{ICG} abpipetiert. Die Auswertung erfolgte über eine spektrophotoskopische Messung, wobei jeweils zwei Messungen pro Serumprobe bei einer Wellenlänge von 800nm durchgeführt und gemittelt wurden. Als Nullreferenz diente eine Serumprobe vor ICG-Gabe. Unter Verwendung einer Dosis-Wirkungs-Beziehung wurden die Mittelwerte in die entsprechende Plasmakonzentration umgerechnet. Die PDR_{ICG} wurde als prozentualer Konzentrationsabfall des ICG im Plasma pro Minute [%/min] definiert.

4.5 Applizierte Lösungen

4.5.1. Vollelektrolytlösung

Als Vollelektrolytlösung wurde Sterofundin®ISO (B. Braun, Melsungen, Deutschland), eine sterile und pyrogenfreie isotone Fertiginfusionslösung, verwendet.

4.5.2 Hämoglobin-Glutamer-200 (HbG)

HbG (Biopure, Amsterdam, Niederlande), eine bovine auf Hämoglobin basierende Lösung in steriler pyrogenfreier Elektrolytlösung, wurde nach Alliquotierung unter Lichtabschluss im Kühlschrank aufbewahrt. Die Applikation erfolgte durch intravenöse Injektion in einer Dosierung von 1g/kg Körpergewicht.

4.5.3 Bosentan

Bosentan (Actelion, Allschwil, Schweiz), ein Endothelin-1-Rezeptor-Antagonist, wurde unter sterilen Bedingungen in Aqua ad injectabilia gelöst und 15 min vor Schock in einer Dosierung von 10mg/kg intravenös appliziert.

4.5.4 Fluorescein- Isothiocyanat-Lösung

Fluorescein- Isothiocyanat (FITC, 5%, 0,2ml, MG 150.000, Exzitationsmaximum 492nm, Fluka 46946; SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) wurde gemäß Herstellerangaben mit Wasser für Injektionszwecke aufgelöst. Unmittelbar vor Anfertigung der Aufnahmen der sinusoidalen Mikrozirkulation wurden jeweils 0,05 ml der Fluoreszenzfarbstofflösung während der Intravitalmikroskopie intravenös verabreicht.

Die FITC-Lösung führt durch rasche Extravasation zu einer Kontrastanhebung des Gewebes und somit zu Hervorhebung der dunklen Sinusoide, was die Erfassung der Mikrozirkulation mittels FITC-markierter Erythrozyten vereinfacht.

4.6 Fluoreszenz-Zell-Markierung

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

wurde das Gemisch für 3 Stunden bei 25°C im Wasserbad unter Lichtabschluss inkubiert.

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

4.7 Erfassung der Untersuchungsparameter

4.7.1 Hämodynamik

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

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

4.7.2 Intravitalmikroskopische Auswertung

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

4.7.2.1 Mitochondrialer Redox-Status

Zur intravitalmikroskopischen Beurteilung des mitochondrialen Redox-Status des Lebergewebes wurden die einzelnen Azini markiert und die NAD(P)H-

Autofluoreszenz in den markierten Feldern densitometrisch bestimmt. Pro Gesichtsfeld wurde die NAD(P)H-Autofluoreszenz in mindestens 6 Azini gemessen. Die Darstellung erfolgte als Durchschnitts-Intensität pro Leberazinus.

4.7.2.2 Anzahl der perfundierten Sinusoide (pS)

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

4.7.2.3 Mittlerer sinusoidaler Durchmesser (Ds)

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

4.7.2.4 Erythrozyten-Flussgeschwindigkeit (V_{ery})

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

4.7.2.5 Volumetrischer Blutfluss (VBF)

Der VBF wurde mit Hilfe folgender Formel berechnet: $VBF = V_{\text{ery}} * \pi * (Ds/2)^2$

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

4.7.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von Endothelin-1

4.7.3.1 Isolierung der RNA aus dem Lebergewebe

Zur RNA-Isolierung wurden zunächst pro 1g tiefgefrorenem Lebergewebe 5ml Guanidinisothiocyanatlösung (mit 36µl Mercaptoethanol/5ml) gegeben und dann das Gewebe mit Ultra-Turrax bei maximaler Geschwindigkeit für etwa 30sec homogenisiert.

Zur eigentlichen RNA Extraktion und Präzipitation wurden dann je nach Ausgangsvolumen des Homogenats folgende Mengen an Lösungen zugesetzt und nach jeder Zugabe gemischt:

Volumen des Homogenats [ml]	2	5	10
2M NaOAc pH 4,0 [ml]	0,2	0,5	1,0
Phenol	2,0	5,0	10,0
CHCl ₃ /isoamylalk. 49:1	0,4	1,0	2,0

Das Gemisch wurde erst für 30min im Eisbad inkubiert, dann 30min bei 4000U/min und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde die Probe erneut ins Eisbad gestellt, die obere Phase (welche die RNA enthält) vorsichtig komplett abpipettiert. Die gewonnene Probe wurde dann in einem frischen Gefäß 1:1 mit Isopropanol gemischt, gevortext und über Nacht bei -20°C eingefroren (RNA ist in Isopropanol bei -20°C stabil).

Im Anschluss wurde die RNA-Suspension erneut gevortext, 1-2ml der Suspension in ein Eppendorfgefäß abpipettiert und bei maximaler Geschwindigkeit 30min lang zentrifugiert. Bei klarem Überstand und weißem Pellet wurde zunächst der Überstand abgegossen, dann das Pellet mit 0,5-0,8ml 70%igem Ethanol umspült und gevortext, nochmals 5min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und nun der Überstand komplett entfernt.

Nachdem das Pellet getrocknet war (Raumtemperatur, ca. 5min) wurde dieses in 300µl DEPC Wasser gelöst und nach Zugabe von 30µl 3M NaOAc pH 5,2 und 600µl 100% EtOH gevortext und 30min lang zentrifugiert. Das Pellet wurde dann nach erneuter Abnahme des Überstandes ein letztes Mal mit 0,5-0,8ml 70%igem Ethanol gewaschen und 5min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Das nun

gewaschene Pellet wurde erneut bei Raumtemperatur getrocknet und in 10-150µl DEPC Wasser gelöst.

Zum Schluss wurde die OD₂₆₀ der 1:250 verdünnten Lösung der RNA in DEPC Wasser bestimmt (1 OD = 40µg RNA/ml da bei 1:250 Verdünnung: OD x 40 x 250 = µg/ml).

4.7.3.2 Reverse Transkription

Mit dieser Methode kann die gewonnene mRNA in cDNA umgeschrieben werden. Die cDNA ist somit eine exakte Kopie des transkribierten Gens, jedoch ohne die nichtkodierenden Intron-Abschnitte.

Die neugebildete cDNA wurde dann als Template für die PCR verwendet.

Zunächst wurde die mRNA mit DEPC-Wasser (Firma: Sigma) verdünnt (1µg/µl) und anschließend 1µl der mRNA bei 37°C unter Zugabe von DEPC-Wasser, DNase und RNase-Inhibitor 30min lang inkubiert. Dieser Schritt diente der Entfernung von eventuell vorhandenen chromosomalen DNA-Fragmenten unter Schutz der mRNA. Nach Inkubation wurde dann der Ansatz auf 65°C erhitzt, um die DNase durch Denaturierung zu inaktivieren. Im Anschluß wurde der Ansatz im Eisbad auf 4°C abgekühlt. Die Reverse Transkription erfolgte nach dem Standardprotokoll zur MuLV-Transkriptase der Firma MBI Fermentas unter folgenden Bedingungen:

	Ansatz	
50 mM MgCl ₂	2µl	
5x PCR Puffer Fermentas	4µl	
dNTP mix (je 12,5mM)	1,6µl	
RNase Inhibitor Fermentas	0,5µl	
MuLV RT Fermentas [200 U]	1µl	
Oligo-T	1µl	
Random hexamer	1µl	
DEPC Wasser	7,9µl	
RNA	1µl	Separat zuletzt pipettieren

Der Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 20µl wurde kurz gevortext, abzentrifugiert und anschließend folgenden Schritten unterzogen:

- Inkubation bei 20°C für 10min
- Inkubation bei 37°C für 59min
- Inkubation bei 95°C für 5min
- Abkühlen der Probe auf 4°C für 10min

Die nun erhaltene cDNA wurde bei -80°C bis zur Durchführung der Polymerase-Ketten-Reaktion gelagert.

4.7.3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR, engl.: Polymerase Chain Reaction) erlaubt eine einfache Amplifikation beliebiger Nukleinsäureabschnitte *in vitro*. Dies erfolgt über die DNA-Polymerasen, welche an freie 3'-OH-Enden von kurzen DNA-Oligonukleotiden (sog. Primer) weitere Basen, komplementär zur Matrize, anhängen. Diese Primer binden an spezifischen Sequenzen jeweils an einem der beiden DNA-Stränge upstream und downstream des gewünschten, zu amplifizierenden DNA-Abschnittes.

Der jeweilige Reaktionsansatz durchläuft während der PCR einen dreistufigen Temperaturzyklus. Im ersten Schritt wird die cDNA, die als Vorlage dient („template DNA“) bei hoher Temperatur denaturiert und so in Einzelstränge zerlegt. Im zweiten Schritt hybridisieren die spezifischen Primer bei niedriger Temperatur mit der DNA („Annealing“).

In einem dritten Schritt, dem sog. Elongationsschritt, bindet die DNA-Polymerase an den 3'OH-Enden der Primer und füllt die einzelsträngigen DNA-Moleküle, unter Verwendung der Desoxynukleotiden (dNTPs), zu einem DNA-Doppelstrang auf. Das Ergebnis dieses Syntheseschrittes sind somit zwei neue doppelsträngige DNA-Moleküle. Durch mehrfache zyklische Wiederholung dieses Vorgangs erhält man eine exponentielle Anreicherung (die sog. Amplifikation) des zwischen den beiden Primern liegenden DNA-Abschnittes.

Als Polymerase wird hier eine thermostabile DNA-Polymerase benötigt, da diese selbst bei den hohen Temperaturen, während der Denaturierung der DNA, stabil

bleibt und nicht ihre Aktivität verliert. Hier wurde die Taq DNA-Polymerase der Firma MBI verwendet.

Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen im „Eppendorf Mastercycler gradient“ durchgeführt:

Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (25µl):

Steriles Wasser	16,725µl
10x PCR-Puffer	2,5µl
50mM MgCl	0,75µl
dNTP Mix 12,5mM	0,4µl
Primer sense [20 pmol]	1µl
Primer antisense [20 pmol]	1µl
Taq Polymerase [5 U/µl]	0,125µl
cDNA (template)	2,5µl

PCR-Protokoll:

Denaturierung	95°C	5min.	Denaturierung der Template DNA
35 Zyklen	95°C	30sec.	Denaturierung
	60°C	60sec.	Annealing
	72°C	60sec.	Elongation
Elongation	72°C	7min.	Elongation nicht vollständiger Produkte

Primer Endothelin-1: (MWG-Biotech AG)

rat_ppET-1_sense 5'-CCT CCT CTT CTT CTG ATC CCT TTG- 3'

rat_ppET-1_antisense 5'-TGT CTT TTT GGT GAG CAC ACT GG- 3'

Primer Kontrolle:

rat_gapdh_sense 5'-TCC CTC AAG ATT GTC AGC AA-3'

rat_gapdh_antisense 5'- AGA TCC ACA ACG GAT ACA TT-3'

4.7.3.4 Gel-Elektrophorese zur Auswertung der PCR

Agarose-Gelelektrophorese ist die Standardmethode zum Auftrennen, Charakterisieren und Reinigen von DNA-Fragmenten. Sie beruht auf Wanderungseigenschaften der negativ geladenen DNA-Moleküle in einem Feld konstanter, elektrischer Spannung, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit proportional zur angelegten Spannung ist. Die Migrationseigenschaften der Moleküle werden sowohl von ihrer Größe ($-\log_{10} MW$), wie auch vom Salzgehalt des Puffers und der Beschaffenheit der Gelmatrix bestimmt. Die Trägermatrix besteht aus Agarose, einem aus Algen gewonnenen neutralen Polysaccharid. Die Wahl der geeigneten Gelkonzentration ermöglicht die Auftrennung von Fragmenten in einem Bereich von 0,2-50kb.

Die durch die PCR erhaltenen, amplifizierten DNA-Abschnitte wurden anschließend zur Beurteilung mit Hilfe der Gel-Elektrophorese aufgetrennt. Dazu wurden die Taschen des Agarosegels jeweils mit der amplifizierten DNA und einem DNA-Marker (MBI Fermentas) gefüllt und über Elektrophorese bei 80 Volt für etwa 45 min aufgetrennt. Nach Beendigung der Gel-Elektrophorese wurde das Agarose-Gel mit dem interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffe Ethidiumbromid gefärbt und die DNA-Banden unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 302 nm sichtbar gemacht und ausgewertet.

4.7.4 Immunhistochemische Messung der GluS-1

Zur Erfassung des zellspezifischen Expressionsmusters der GluS-1 (als Marker der mitochondrialen Sauerstoffversorgung) nach zweistündiger Reperfusionzeit wurden formalinfixierte Paraffinschnitte der zu untersuchenden Leber verwendet.

Zunächst wurde die endogene Peroxidase-Aktivität durch Inkubation in 3%-iger H₂O₂-Methanol blockiert. Nach Behandlung der Schnitte mit normalem Pferdeserum wurden die Schnitte bei 37°C für eine Stunde mit monoklonalen Anti-Ratten GluS-1 Mäuse-Antikörpern (1:200; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) inkubiert. Als zweiter Antikörper diente ein Anti-Maus-Pferdeantikörper, welcher den Streptavidin-Biotin-Complex der Peroxidase markierte. 3,3'-Diaminobenzidin und 3%iges COCl₂ wurden zur Fluoreszenz verwendet. Die Schnitte wurden mit Hematoxylin gefärbt.

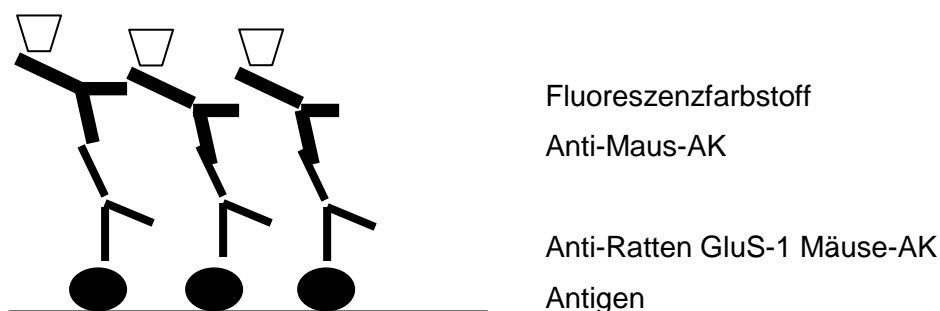


Abbildung 6: Dargestellt ist das Prinzip der indirekten Immunhistochemie. Das Antigen (hier GluS 1) wird mit einem Anti-Ratten-GluS 1-AK der Maus gekoppelt, dieser wird mit einem Anti-Maus-AK markiert, welcher wiederum mit Fluoreszenzfarbstoff detektiert wird. Die Intensität der Fluoreszenz ist dann proportional zur Anzahl der GluS-1 Expression.

4.7.5 Bestimmung der Zytokinspiegel im Serum

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

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

Bei den Zytokinassays handelte es sich um kommerziell erhältliche ELISA-Kits (BD OptiEIA™; BD Biosciences, Pharmingen, Heidelberg) die alle nach dem „Sandwichprinzip“ (Abbildung 7) arbeiten. Das zu bestimmende Zytokin wurde dabei zwischen zwei Antikörpern eingebettet. Diese beiden Antikörper binden an zwei verschiedenen Epitopen des zu messenden Zytokins. Nur bei spezifischer Bindung des Zytokins an den Antikörper 1 kann auch der mit dem Enzym für die Farbreaktion gekoppelte Antikörper 2 binden. Unspezifische Bindungen werden durch mehrfache Waschschriffe gelöst. Somit ist die Intensität der Farbreaktion proportional zur Menge des gebundenen Zytokins.

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

- Beschichtung der 96-Well-Mikrotiterplatten (Nunc immunoplate; Fa. Nunc; Wiesbaden) mit 50 μ l/well Beschichtungspuffer, einem 0,1 molaren Carbonat/Bicarbonat- Puffer, der 4 μ l/ml capture antibody (monoklonaler Antikörper) enthielt.
- Inkubation der beschichteten Platten bei 4°C für mindestens 12 Stunden
- Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Platte sechs Mal mit Waschlösung gewaschen. Diese Waschlösung wurde aus phospatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) unter Zugabe von 0,05% Tween hergestellt.
- Durch Zugabe von in PBS gelöstem fetalen Kälberserum (10% FCS/ PBS-Blockierungspuffer) wurden noch unbesetzte freie Bindungsstellen des Kunststoffes eine Stunde bei Raumtemperatur abgesättigt.
- Nach erneutem dreimaligem Waschen mit der Waschlösung erfolgte dann das Auftragen der Standartverdünnungsreihen und der zu analysierenden Proben mit einer sich anschließenden Inkubation bei 27°C über zwei Stunden. Während dieses Schrittes geht der am Boden der Platte gebundene Antikörper eine Verbindung mit dem zu messenden Zytokin ein.
- Durch sechsmaliges Waschen werden alle ungebundenen Proteine entfernt.

- Nach Auftragen von 100µl/well eines Sekundärantikörpers, der an ein weiteres Epitop des Zytokins bindet und Peroxidase gekoppelt ist, wird die Platte erneut bei 27°C eine Stunde lang inkubiert.
- Zugabe von 100µl/well Substratlösung (Tetramethylbenzidin (TMB) in Dimethylformamid (DMF)) und Inkubation der Platte im Dunkeln.
- Stoppen des Reaktionsschrittes nach ausreichender Farbreaktion nach etwa 20 Minuten mit 50µl 1- molarer Schwefelsäure (H₂SO₄).
- Anschließend folgt die photometrische Messung der Extinktion bei 450nm gegen Verdünnungspuffer (Referenzwellenlänge 620nm), die der umgesetzten Menge Substrat und damit Zytokinkonzentration der Probe proportional ist.

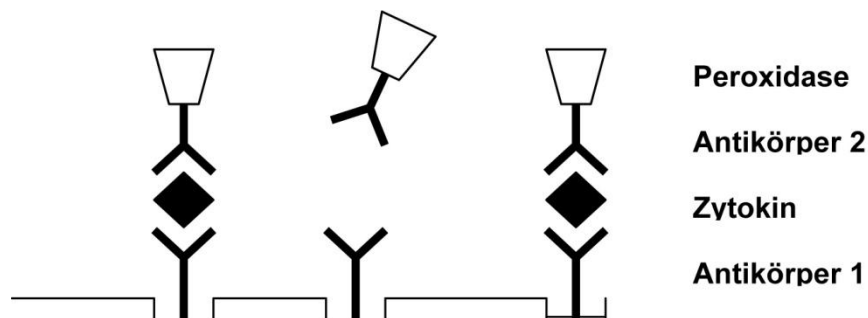


Abbildung 7: Schematische Darstellung des „Sandwich-Prinzips“ der ELISA-Messsysteme. Nur wenn das Zytokin das Antikörper 1 gebunden hat, kann auch Antikörper 2, der mit dem Enzym für die Farbreaktion gekoppelt ist, binden. Die beiden Antikörper binden an 2 verschiedene Epitope des Zytokins. Die Intensität der Farbreaktion ist proportional zur Menge der gebundenen Zytokine, da die unspezifischen Bindungen in mehrfachen Waschschritten gelöst werden.

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

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

4.7.6 Bestimmung der Leberenzyme im Serum

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

4.7.7 Blutgasanalyse

Die während des Versuches (t^0 = vor Schockbeginn; t^1 =Ende des Schocks; t^2 =Ende des Reperfusion) entnommenen Blutproben wurden direkt nach Entnahme maschinell (Nova pHox®plus L, Nova Biochemical Corporation, Waltham, USA) ausgewertet; bestimmt wurden $p\text{aO}_2$, $p\text{CO}_2$, Hämatokrit und Basenüberschuss.

4.8 Statistische Auswertung

4.8.1. Berechnung der Versuchstierzahl und Nullhypothesen

Die Berechnung der Gesamttiere erfolgte unter Berücksichtigung von Erfahrungswerten aus früheren Studien, nach der von KASTENBAUM et al. (1970) beschriebenen Methode.

Hierbei wurde ein α -Fehler von 0,05 und ein β -Fehler von 0,1 zugrunde gelegt.

Folgende Nullhypothesen wurden festgelegt:

- Die Vorbehandlung mit HbG führte nicht zu einer Veränderung der Weite der Lebersinusoide, der Zahl der perfundierten Sinusoid, des sinusoidalen Widerstandes und der Erythrozytenflussgeschwindigkeiten
- Die Gabe von Bosentan nach HbG-Vorbehandlung führt nicht zu einer Verbesserung der Weite der Lebersinusoide, der Zahl der perfundierten Sinusoid, des sinusoidalen Widerstandes und der Erythrozytenflussgeschwindigkeiten
- Die Gabe von Bosentan nach Vollelektrolytlösung-Vorbehandlung führt nicht zu einer Verbesserung der Weite der Lebersinusoide, der Zahl der perfundierten Sinusoid, des sinusoidalen Widerstandes und der Erythrozytenfluss-

geschwindigkeiten gegenüber Tieren mit HbG- Vorbehandlung und/oder reiner Vehikel-Vorbehandlung bzw. Tieren mit HbG und Bosentan

- HbG führt nicht zu einer zusätzlichen Induktion der Endothelin-1 Expression gegenüber Vehikel

4.8.2 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe des Softwarepaketes SigmaStat® (Version 2.0, Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA) vorgenommen.

Bei normalverteilten Daten kam die One Way Analysis of Variance (ANOVA) zur Anwendung, bei nichtparametrischer Verteilung die Kruskal-Wallis ANOVA on Ranks. Bei Durchführung statistischer Tests wurde zusätzlich der Student-Newman-Keuls post-hoc Test eingesetzt. Als Signifikanzniveau wurde ein p-Wert von $<0,05$ festgelegt.

4.8.3 Graphische Darstellung der Ergebnisse

Die graphische Aufarbeitung erfolgte über das Softwarepaket SigmaPlot® (Version 5.02, Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA). Die Daten wurden als Mittelwert \pm Standard Error of the Mean (SEM) angegeben.

5. Ergebnisse

5.1 Makrohämodynamik

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

Die Einleitung des hämorrhagischen Schocks führte zu einem initial starken Abfall des MAP und der HF. Die Retransfusion von 60% des entnommenen Blutes am Ende der Schockperiode und die anschließende Reperfusionphase führten zu einer kompletten Erholung der hämodynamischen Parameter in der Vehikel-Gruppe. Im Gegensatz dazu wiesen die HbG-präkonditionierten Tiere eine lang anhaltende Suppression des MAP auf. Die zusätzliche Applikation von Bosentan verhinderte die komplette Erholung des MAP in der Vehikel-Gruppe und führte zu einer weiteren Depression des MAP in der HbG-Gruppe (Tabelle 1).

	Ausgangswert	Schockende	Beginn Reperfusion	Ende Reperfusion
Vehikel				
MAP	127±6	35±1 ^{*b}	110±5 ^b	118±5
HR	326±15	285±25	294±14	320±16
Vehikel + Bosentan				
MAP	129±3	32±1 ^{*b}	99±2 ^{*b}	104±5 ^b
HR	320±13	259±13 ^{*b}	281±18 [*]	316±21
HbG				
MAP	125±6	35±1 ^{*b}	80±8 ^{*b#}	108±4 ^b
HR	350±13	273±12 ^{*b}	293±11 ^{*b}	331±18
HbG + Bosentan				
MAP	117±5	33±1 ^{*b}	88±4 ^{*b#}	101±6 ^b
HR	337±13	272±8 ^{*b}	273±8 ^{*b}	310±15
Sham				
MAP	125±6	121±5	119±7	126±7
HR	330±16	375±20	395±17	386±13

Tabelle 1: Tabellarische Darstellung der hämodynamischen Daten der Versuchstiere während des Versuchsablaufs. Zum Vergleich dient die scheinoperierte Gruppe (Sham) ohne Schockbehandlung. Vehikel: Vollelektrolytlösung-Präkonditionierung; HbG: Hämoglobin-Glutamer 200-Präkonditionierung; Bosentan: ET-1-Rezeptorblocker; MAP: mittlerer arterieller Druck [mmHg]; HF: Herzfrequenz [Schläge/min]. Daten sind Mittelwerte ± SA von n=8/Gruppe. ^bp<0.05 vs. Ausgangswert; ^{*}p<0.05 vs. Sham; [#]p<0.05 vs. Kontrolle. ANOVA und Student-Newman-Keuls.

5.2 Blutgasanalyse

Die Ausgangswerte der respiratorischen Parameter (pO_2 , pCO_2) und des Säure-Base-Haushaltes (pH, Basenüberschuss) waren in allen Versuchsgruppen im Normbereich.

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

Die Applikation von Bosentan hatte keinen weiteren Effekt auf die Parameter der Blutgasanalyse im Vergleich zu den entsprechenden Gruppen ohne Bosentan (Tabelle 2).

Tabelle 2 (folgende Seite): Tabellarische Darstellung der Blutgasanalysen der untersuchten Gruppen zu Beginn des Versuches (Ausgangswert), am Ende der Schockphase (Ende Schock) und am Ende des Versuches direkt vor der Intravitalmikroskopie (Ende Reperfusion). Zum Vergleich dient die scheinoperierte Gruppe ohne Schockbehandlung (Sham). Vehikel: Vollelektrolytlösung-Präkonditionierung; HbG: Hämoglobin-Glutamer 200-Präkonditionierung; Bosentan: ET-1-Rezeptorblocker; Die Daten sind Mittelwerte \pm SA von $n=8$ /Gruppe. ^a $p<0.05$ vs. Ende Schock; ^b $p<0.05$ vs. Ausgangspunkt; * $p<0.05$ vs. Sham. ANOVA und Student-Newman-Keuls.

	Ausgangswert	Ende Schock	Ende Reperfusion
pH			
Vehikel	7.34±0.01	7.36±0.02	7.42±0.04
Vehikel+Bosentan	7.38±0.01	7.37±0.02	7.42±0.02
HbG	7.37±0.02	7.31±0.03 ^b	7.42±0.02 ^a
HbG+Bosentan	7.34±0.02	7.35±0.02	7.43±0.01 ^{b a}
Basenüberschuss [mmol/l]			
Vehikel	-1.36±1.03	-10.14±1.69 ^b	1.83±1.42 ^a
Vehikel+Bosentan	-2.11±1.41	-10.01±1.14 ^b	0.44±1.04 ^a
HbG	-1.23±1.00	-11.85±1.34 ^b	1.66±1.47 ^a
HbG+Bosentan	-2.59±1.69	-13.60±1.07 ^b	0.41±1.29 ^a
pCO₂ [mmHg]			
Vehikel	44.8±2.7	27.3±3.3 ^b	42.5±5.2 ^a
Vehikel+Bosentan	36.3±2.8	27.0±2.4 ^b	37.1±3.3 ^a
HbG	41.4±2.3	25.5±2.1 ^b	40.4±3.8 ^a
HbG+Bosentan	40.9±3.6	22.1±1.7 ^b	37.4±2.5 ^a
pO₂ [mmHg]			
Vehikel	77.2±8.0	122.5±8.3 ^b	87.6±6.2 ^a
Vehikel+Bosentan	88.6±4.5	127.6±9.7 ^b	89.7±5.3 ^a
HbG	72.4±4.6	111.7±8.6 ^b	82.7±7.3 ^a
HbG+Bosentan	66.1±6.1	120.8±5.1 ^b	68.3±4.9 ^a
Sham			
pH	7.39±0.02	7.36±0.01	7.36±0.02
Basenüberschuss [mmol/l]	-1.11±0.53	-0.55±0.56	-0.79±0.45
pCO ₂ [mmHg]	42.1±1.5	39.4±2.5	36.0±3.8
pO ₂ [mmHg]	75.9±2.3	72.8±4.2	80.3±4.8

5.3 Hepatozellulärer Schaden nach Hämorrhagie und Reperfusion

Die Abschätzung des hepatozellulären Schadens erfolgte durch Messung des Enzym-Gehalts von ASAT, ALAT und GLDH im Blutserum. Hämorrhagischer Schock und anschließende Reperfusion erhöhten signifikant ASAT, ALAT und GLDH gegenüber Sham in allen Schockgruppen. HbG-Präkonditionierung führte zu einem zusätzlichen, nicht signifikanten Anstieg der Leberenzyme im Vergleich zu der Vehikel-Gruppe. Die Gabe des ET-Blockers Bosentan hatte keinen weiteren Einfluss auf die Induktion der Leberenzyme in Vehikel-präkonditionierten Tieren. Nach HbG-Präkonditionierung verhinderte Bosentan den schockbedingten Anstieg der Leberenzyme (Tabelle 3).

	ALT	ASAT	GLDH
Vehikel	98±28.7 ^{*\$}	190±33.2 [*]	13.1±2.6 [*]
Vehikel+Bosentan	92.5±29.2 ^{*\$}	190±32.9 [*]	11.5±3.1 [*]
HbG	159±94.7 ^{*\$}	356±194.5 [*]	15.7±5.8 [*]
HbG+Bosentan	36±4.6	116±14.5	6.5±3.9
Sham	34±5.5	94±15.4	5.6±0.3

Tabelle 3: Hepatozellulärer Schaden in den untersuchten Gruppen am Versuchsende. Zum Vergleich dient die scheinoperierte Gruppe ohne Schockbehandlung (Sham). ALAT: Alaninaminotransferase [Einheiten/L]; ASAT: Aspartataminotransferase [Einheiten/L]; GLDH: Glutamatdehydrogenase [Einheiten/L]; Vehikel: Vollelektrolytlösung-Präkonditionierung; HbG: Hämoglobin-Glutamer 200-Präkonditionierung; Bosentan: ET-1-Rezeptorblocker; Die Daten sind Mittelwerte ± SA von n=8/Gruppe. ^{*}p<0.05 vs. Sham; ^{\$}p<0.05 vs. HbG+Bosentan. ANOVA und Student-Newman-Keuls.

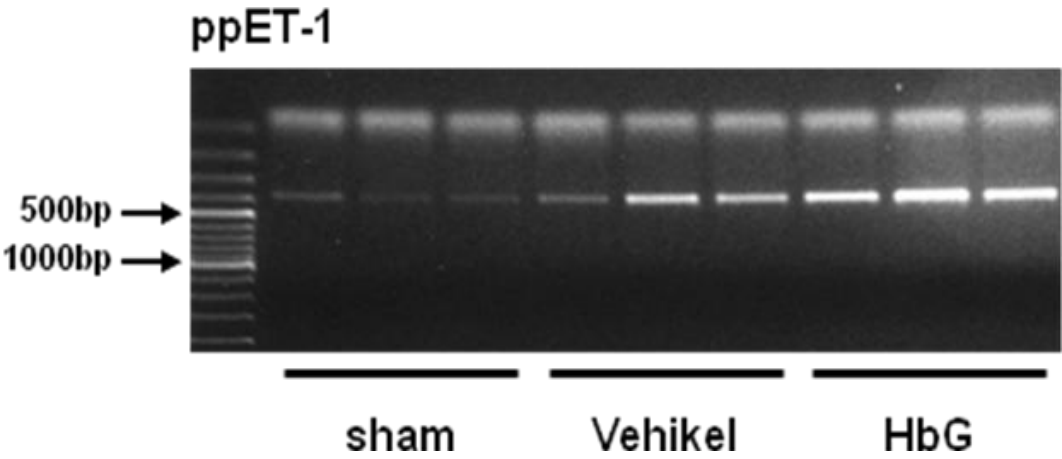
5.4 Endothelin-1 Expression nach hämorrhagischem Schock und Reperfusion

Die Analyse der Endothelin-1 Freisetzung nach hämorrhagischem Schock und darauffolgender Reperfusion im Lebergewebe mittels RT-PCR zeigte einen signifikanten Anstieg von ppET-1 mRNA in allen Schocktieren im Vergleich zur Sham-Gruppe. Eine Präkonditionierung mit HbG führte zu einer weiteren Zunahme der Expression von ET-1 im Vergleich zur Vehikel-Präkonditionierung (Abbildung 8).

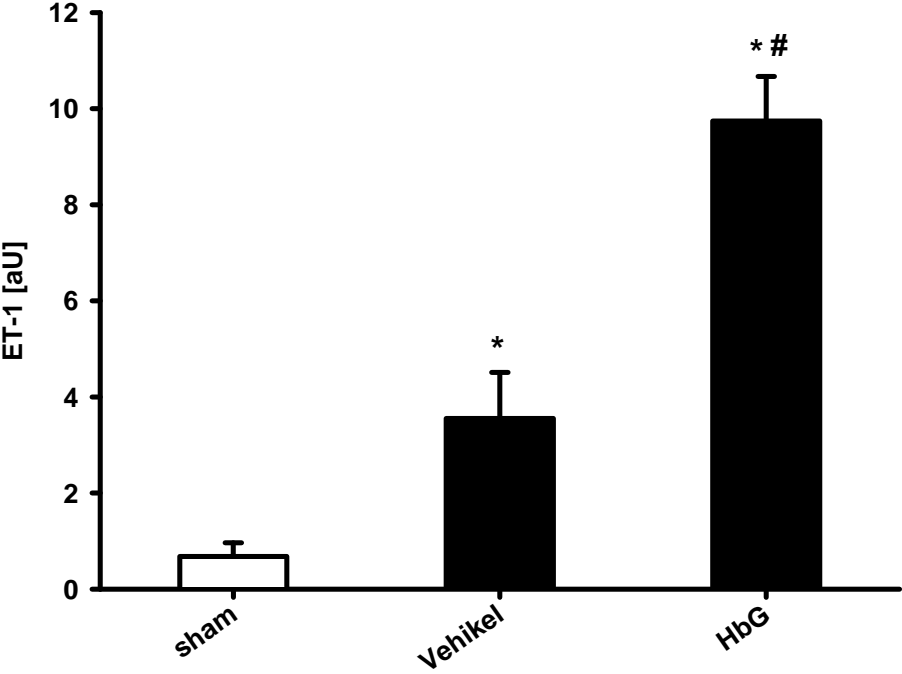
Abbildung 8 (folgende Seite): Repräsentatives Elektrophoresegel von amplifizierter cDNA für ppET-1, welche mittels RT-PCR semiquantitativ hergestellt wurde (A) und die dazugehörige densitometrische Analyse (B). Als Kontrolle dienten scheinoperierte Tiere ohne hämorrhagischen Schock und Reperfusion (Sham).

□ Kein Schock; ■ Hämorrhagischer Schock+ Reperfusion; bp: Basenpaare; Vehikel: Vollelektrolytlösung-Präkonditionierung; HbG: Hämoglobin-Glutamer 200-Präkonditionierung; Die Daten sind Mittelwerte \pm SA von n=8/Gruppe. * $p < 0.05$ vs. Sham; § $p < 0.05$ vs. Schock-Kontrolle. ANOVA und Student-Newman-Keuls.

A



B



5.5 GluS-1 Proteinexpression im Lebergewebe

Die Sauerstoffverfügbarkeit im Lebergewebe nach hämorrhagischem Schock und Reperfusion wurde anhand der GluS-1 Proteinexpression bestimmt. GluS-1 ist ein sauerstoffabhängiges, hepatozelluläres Schlüsselenzym, welches bei niedrigem O₂-Angebot vermehrt gebildet wird.

In scheinoperierten Tieren ohne Schockbehandlung konnte GluS-1 nur in einer einzelnen Schicht von Hepatozyten direkt um die Zentralvene nachgewiesen werden (Abbildung 9A, 10).

Hämorrhagischer Schock und Reperfusion führte zu einem deutlichen Anstieg der GluS-1 Expression mit entsprechender Zunahme der positiven Zellschichten um die Zentralvene (Abbildung 9B, 10).

HbG-Präkonditionierung führte zu einem weiteren signifikanten Anstieg der schockinduzierten GluS-1 Expression im Vergleich zu Vehikel, resultierend in einer deutlichen Vermehrung der GluS-1 positiven Zellschichten (Abbildung 9D, 10).

Blockade der Endothelin-Rezeptoren mit Bosentan nach der jeweiligen Präkonditionierung hatte keinen weiteren Einfluss auf die GluS-1 Proteinexpression im Vergleich zu den entsprechenden nicht geblockten Gruppen (Abbildung 9C, 9E, 10).

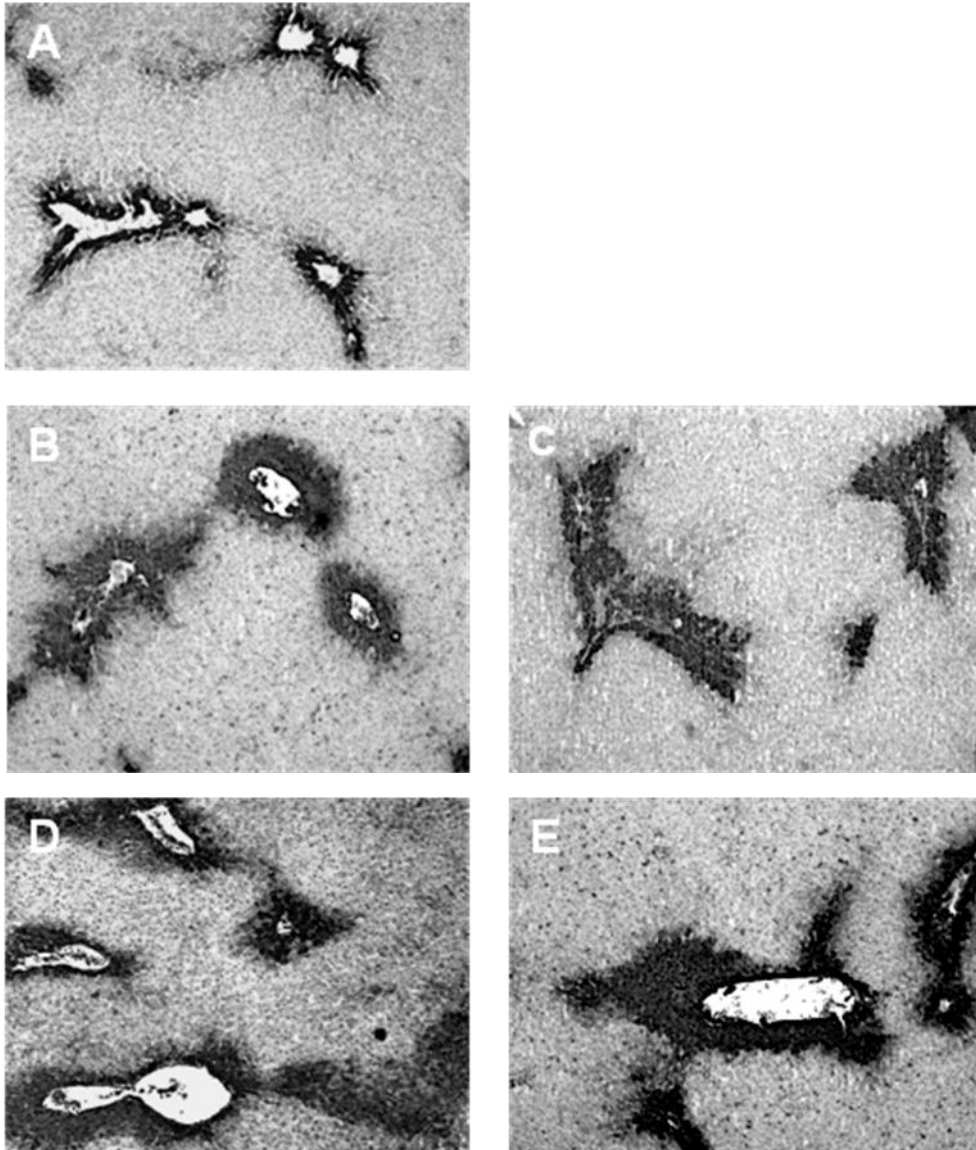


Abbildung 9: Representative Aufnahmen der immunhistochemischen Analyse der GluS-1 Proteinexpression im Lebergewebe nach hämorrhagischem Schock und Reperfusion. A: scheinoperierte Tiere (sham); B: Vehikel-Präkonditionierung; D: HbG-Präkonditionierung; C: Vehikel+Bosentan; E: HbG+Bosentan

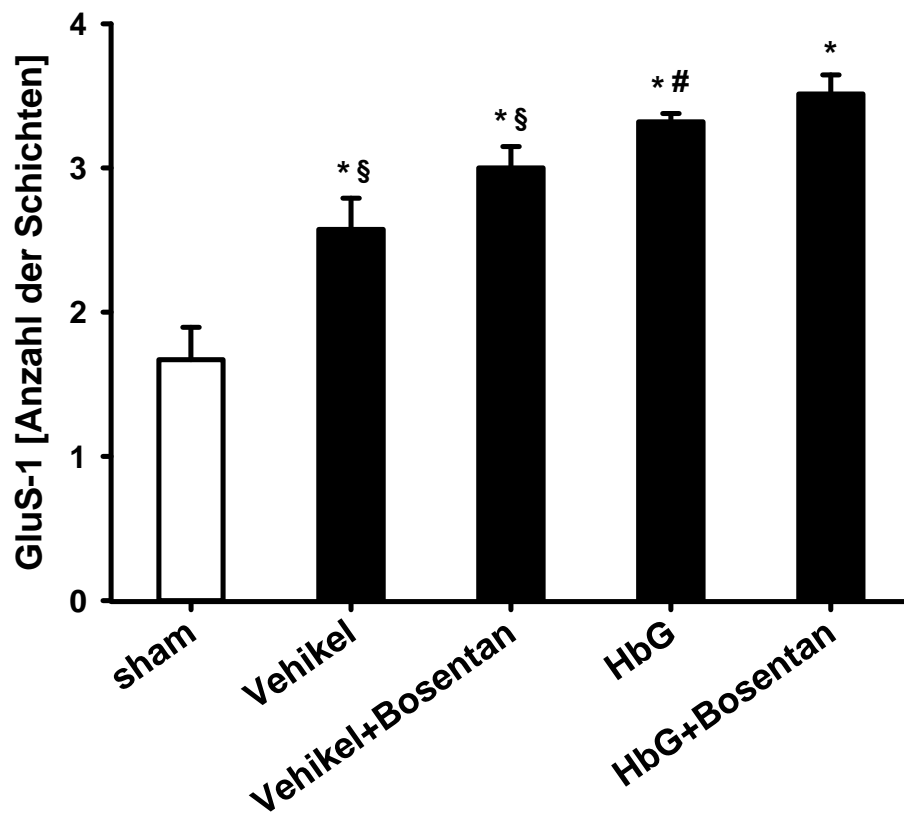


Abbildung 10: Graphische Darstellung der quantitativen Messung der GluS-1 Expression im Lebergewebe.

□ Kein Schock; ■ Häorrhagischer Schock+ Reperfusion; Vehikel: Vollelektrolytlösung-Präkonditionierung; HbG: Hämoglobin-Glutamer 200-Präkonditionierung; Bosentan: ET-1-Rezeptorblocker. Die Daten sind Mittelwerte \pm SA von $n=8$ /Gruppe. * $p < 0.05$ vs. Sham; # $p < 0.05$ vs. Schock-Kontrolle; § $p < 0.05$ vs. HbG+Bosentan. ANOVA und Student-Newman-Keuls

5.6 Intravitalmikroskopische Auswertung

5.6.1 Parameter der sinusoidalen Mikroperfusion

5.6.1.1 Sinusoidaler Durchmesser

Im Vergleich zu Sham führte der hämorrhagische Schock mit anschließender Reperfusion (H/R) zu einer signifikanten Reduktion des sinusoidalen Durchmessers in der Vehikel-Gruppe (Abbildung 11 A, 12A,B).

HbG-präkonditionierte Tiere zeigten nach H/R signifikant reduzierte sinusoidale Durchmesser im Vergleich zur Sham-Gruppe, resultierend in gleichen Werten wie in der Vehikel-Gruppe (Abbildung 11 A, 12D).

Die Blockade der ET-Rezeptoren mit Bosentan vor H/R verhinderte in der Vehikel-Gruppe teilweise eine schockinduzierte sinusoidale Konstriktion und führte gegenüber Vehikel zu einer signifikanten Dilatation der Sinusoide (Abbildung 11 A, 12C).

Die Applikation von Bosentan vor H/R nach HbG-Präkonitionierung verhinderte vollständig eine schockinduzierte sinusoidale Konstriktion und führte gegenüber allen anderen Schock-Gruppen zu einer signifikanten Dilatation der Sinusoide (Abbildung 11 A, 12E).

5.6.1.2 Anzahl der perfundierten Sinusoide

Im Vergleich zu Sham führte H/R zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl der perfundierten Sinusoide in der Vehikel-Gruppe (Abbildung 11 B, 12A,B).

HbG-präkonditionierte Tiere zeigten nach H/R eine signifikant reduzierte Anzahl der perfundierten Sinusoide im Vergleich zur Sham-Gruppe, resultierend in gleichen Werten wie in der Vehikel-Gruppe (Abbildung 11 B, 12D).

Die Blockade der ET-Rezeptoren mit Bosentan vor H/R zeigte in der Vehikel-Gruppe tendenziell eine Zunahme der perfundierten Sinusoide ohne statistische Signifikanz gegenüber der Vehikel-Gruppe ohne Blockade (Abbildung 11B, 12C).

Die Applikation von Bosentan vor H/R nach HbG-Präkonitionierung verhinderte vollständig eine schockinduzierte Reduktion der Anzahl der perfundierten Sinusoide und führte gegenüber allen anderen Schock-Gruppen zu einer signifikanten Zunahme der perfundierten Sinusoide (Abbildung 11B, 12E).

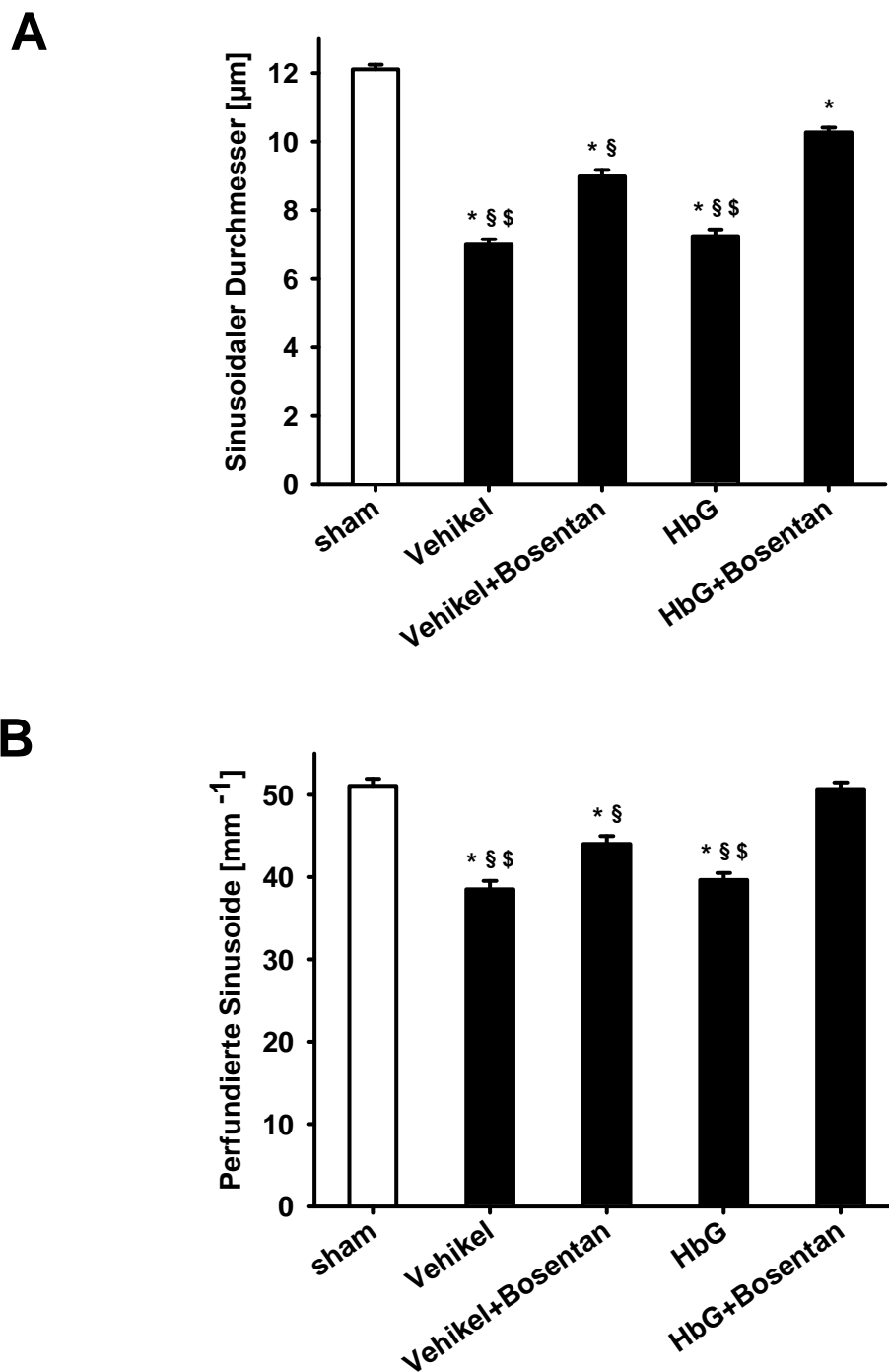


Abbildung 11: Veränderung der sinusoidalen Durchmesser (A) und der Anzahl der perfundierten Sinusoide (B) am Ende des Versuchablaufs.

□ Kein Schock; ■ Hämorrhagischer Schock+ Reperfusion; ; Vehikel: Vollelektrolytlösung-Präkonditionierung; HbG: Hämoglobin-Glutamer 200-Präkonditionierung; Bosentan: ET-1-Rezeptorblocker. Die Daten sind Mittelwerte \pm SA von $n=8$ /Gruppe. * $p<0.05$ vs. Sham; § $p<0.05$ vs. HbG+Bosentan; \$ $p<0.05$ vs. Schock-Kontrolle+Bosentan. ANOVA und Student-Newman-Keuls.

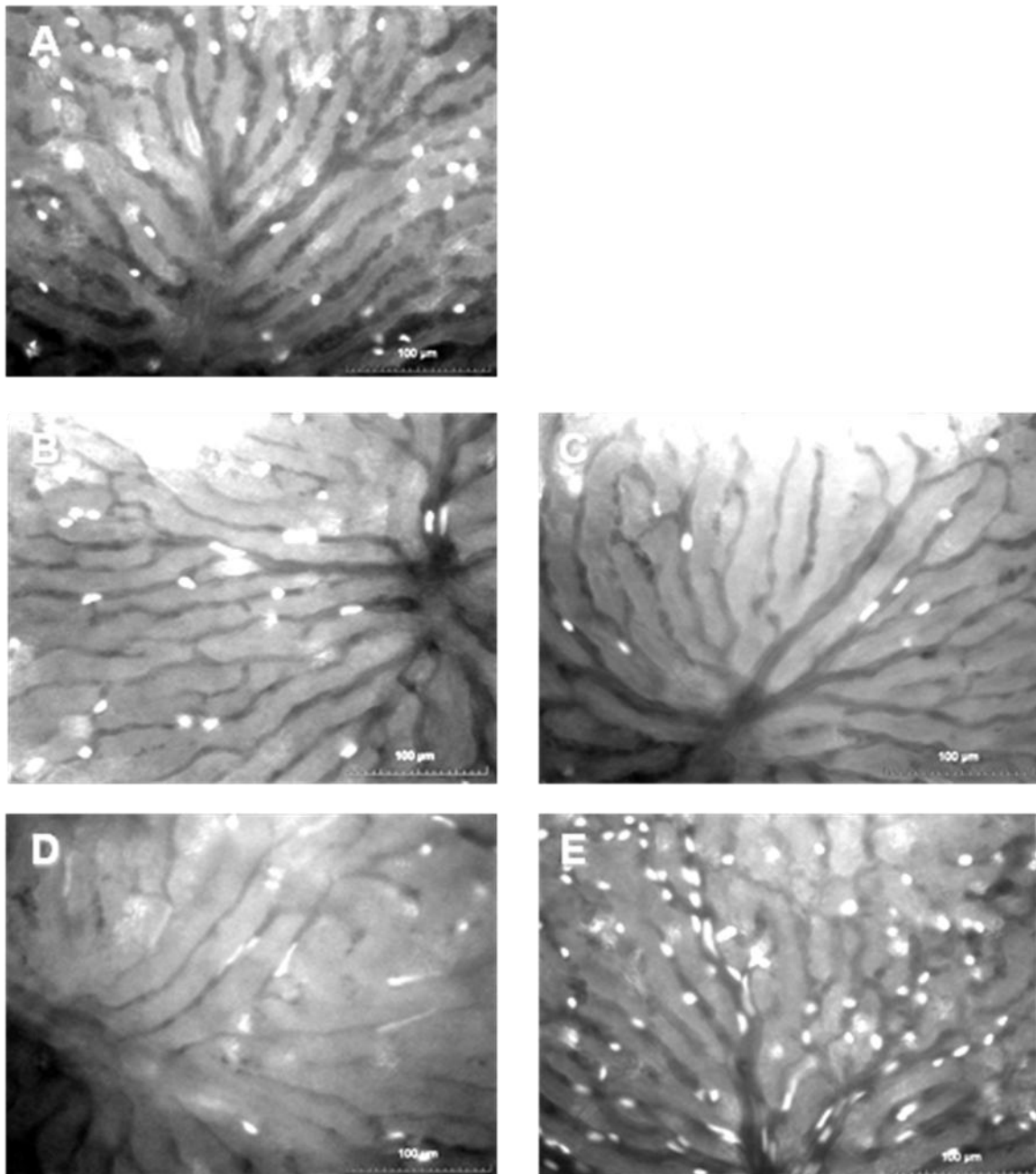


Abbildung 12: Representative intravitalmikroskopische Aufnahmen des sinusoidalen Netzwerkes. Dargestellt sind Aufnahmen von scheinoperierten Tieren (Sham; A), mit Vollelektrolytlösung vorbehandelten Tieren (Vehikel; B) und zusätzlicher ET-1-Rezeptorblockade mittels Bosentan (Vehikel+Bosentan; C), sowie von mit HbG-präkonditionierten Tieren (HbG; D) und mit zusätzlicher Bosentangebe (HbG+Bosentan; E). Kontrastverstärkung durch Fluorescein-Isothiocyanat und FITC-markierten Erythrozyten. 150x Vergrößerung.

5.6.1.3 Mittlere Erythrozytenflussgeschwindigkeit

Im Vergleich zu Sham führte H/R zu keinem signifikanten Unterschied in der mittleren Erythrozytenflussgeschwindigkeit bei Vehikel-präkonditionierten Tieren (Abbildung 13A).

HbG-präkonditionierte Tiere zeigten nach H/R signifikant erhöhte Erythrozytenflussgeschwindigkeiten sowohl im Vergleich zur Sham-Gruppe als auch im Vergleich zur Vehikel-Gruppe (Abbildung 13A).

Die Blockade der ET-Rezeptoren mit Bosentan vor H/R zeigte in der Vehikel-Gruppe keinen signifikanten Unterschied in der Erythrozytenflussgeschwindigkeit gegenüber der Vehikel-Gruppe ohne Blockade (Abbildung 13A).

Die Applikation von Bosentan vor H/R nach HbG-Präkonitionierung erhöhte die mittlere Erythrozytenflussgeschwindigkeit nochmal signifikant im Vergleich zur HbG-Gruppe ohne Bosentan (Abbildung 13A).

5.6.1.4 Volumetrischer Blutfluss

Im Vergleich zu Sham führte H/R zu einer signifikanten Reduktion des volumetrischen Blutflusses in der Vehikel-Gruppe (Abbildung 13B).

HbG-präkonditionierte Tiere zeigten nach H/R einen signifikant reduzierten volumetrischen Blutfluss im Vergleich zur Sham-Gruppe, resultierend in gleichen Werten wie in der Vehikel-Gruppe (Abbildung 13B).

Die Blockade der ET-Rezeptoren mit Bosentan vor H/R verhinderte in der Vehikel-Gruppe teilweise eine schockinduzierte Reduktion des Blutflusses und führte gegenüber Vehikel zu einem signifikanten Anstieg des volumetrischen Blutflusses, dieser blieb jedoch gegenüber scheinoperierten Tieren weiterhin signifikant reduziert (Abbildung 13B).

Die Applikation von Bosentan vor H/R nach HbG-Präkonitionierung verhinderte vollständig eine schockinduzierte Reduktion des volumetrischen Blutflusses und führte gegenüber allen anderen Schock-Gruppen und auch gegenüber scheinoperierten Tieren ohne Schock zu einer signifikanten Zunahme des volumetrischen Blutflusses (Abbildung 13B).

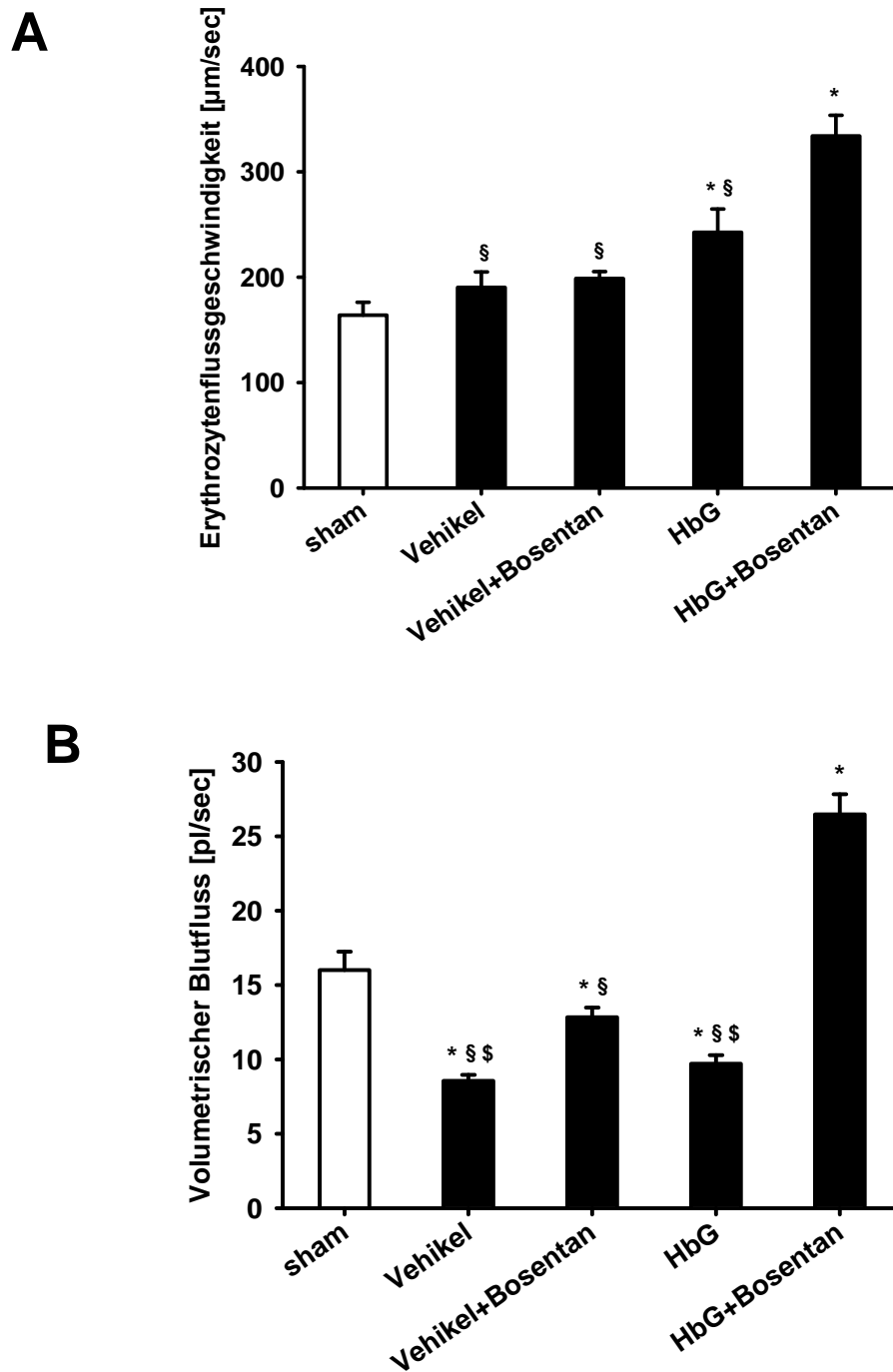


Abbildung 13 : Veränderung der mittleren Erythrozytengeschwindigkeit (A) und des volumetrischen Blutflusses (B) nach Ende des Versuchablaufs.

□ Kein Schock; ■ Hämorrhagischer Schock+Reperfusion; Vehikel: Voll-elektrolytlösung-Präkonditionierung; HbG: Hämoglobin-Glutamer 200-Präkonditionierung; Bosentan: ET-1-Rezeptorblocker; Die Daten sind Mittelwerte \pm SA von $n=8$ /Gruppe. * $p<0.05$ vs. Sham; § $p<0.05$ vs. HbG+Bosentan; § $p<0.05$ vs. Vehikel+Bosentan. ANOVA und Student-Newman-Keuls.

5.7 Mitochondrialer Redoxstatus

Im Vergleich zu Sham führte H/R zu einer signifikant erhöhten NAD(P)H Autofluoreszenz als Marker des mitochondrialen Redoxstatus in der Vehikel-Gruppe (Abbildung 14, 15 A,B).

HbG-präkonditionierte Tiere zeigten nach H/R eine signifikante Steigerung der NAD(P)H Autofluoreszenz im Vergleich zur Sham-Gruppe, resultierend in gleichen Werten wie in der Vehikel-Gruppe (Abbildung 14, 15D).

Die Blockade der ET-Rezeptoren mit Bosentan vor H/R zeigte in der Vehikel-Gruppe keinen signifikanten Unterschied in der NAD(P)H Autofluoreszenz gegenüber der Vehikel-Gruppe ohne Blockade (Abbildung 14, 15C).

Die Applikation von Bosentan vor H/R nach HbG-Präkonitionierung verhinderte teilweise eine schockinduzierte Zunahme der NAD(P)H Autofluoreszenz und führte gegenüber allen anderen Schock-Gruppen zu einer signifikanten Reduktion der NAD(P)H Autofluoreszenz (Abbildung 14, 15 E).

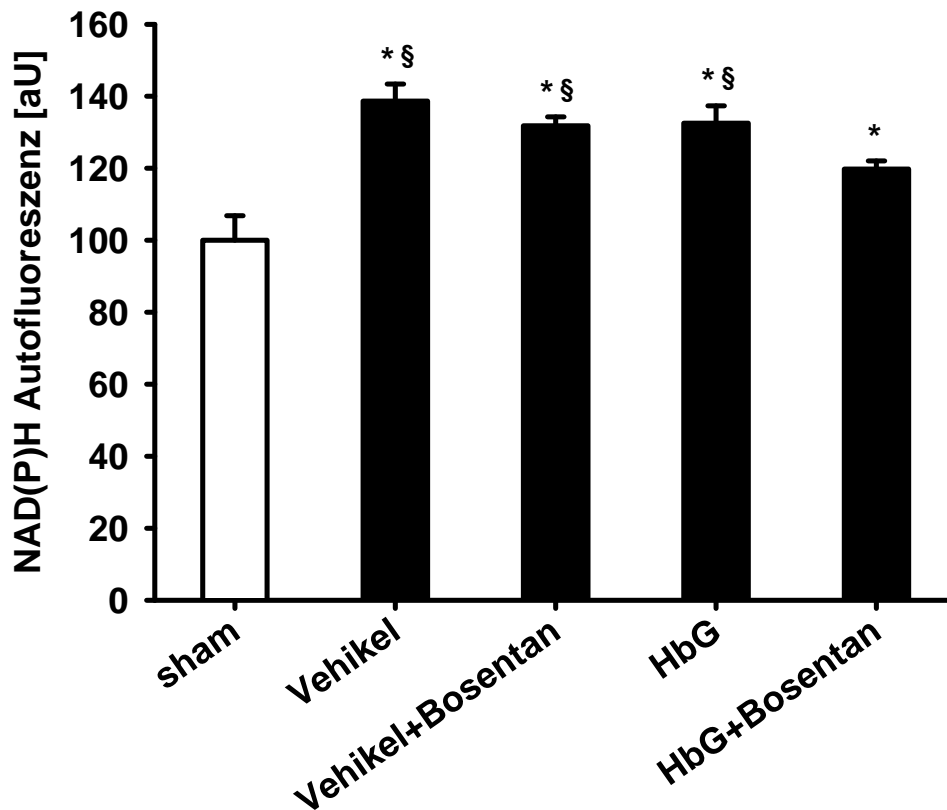


Abbildung 14: Mitochondrialer Redox-Status des Lebergewebes (NAD(P)H Autofluoreszenz) am Ende des Versuchsablaufs.

□ Kein Schock; ■ Häorrhagischer Schock+Reperfusion; Vehikel: Voll-elektrolytlösung-Präkonditionierung; HbG: Hämoglobin-Glutamer 200-Präkonditionierung; Bosentan: ET-1-Rezeptorblocker; Die Daten sind Mittelwerte \pm SA von $n=8$ /Gruppe. * $p < 0.05$ vs. Sham; § $p < 0.05$ vs. HbG+Bosentan; ANOVA und Student-Newman-Keuls.

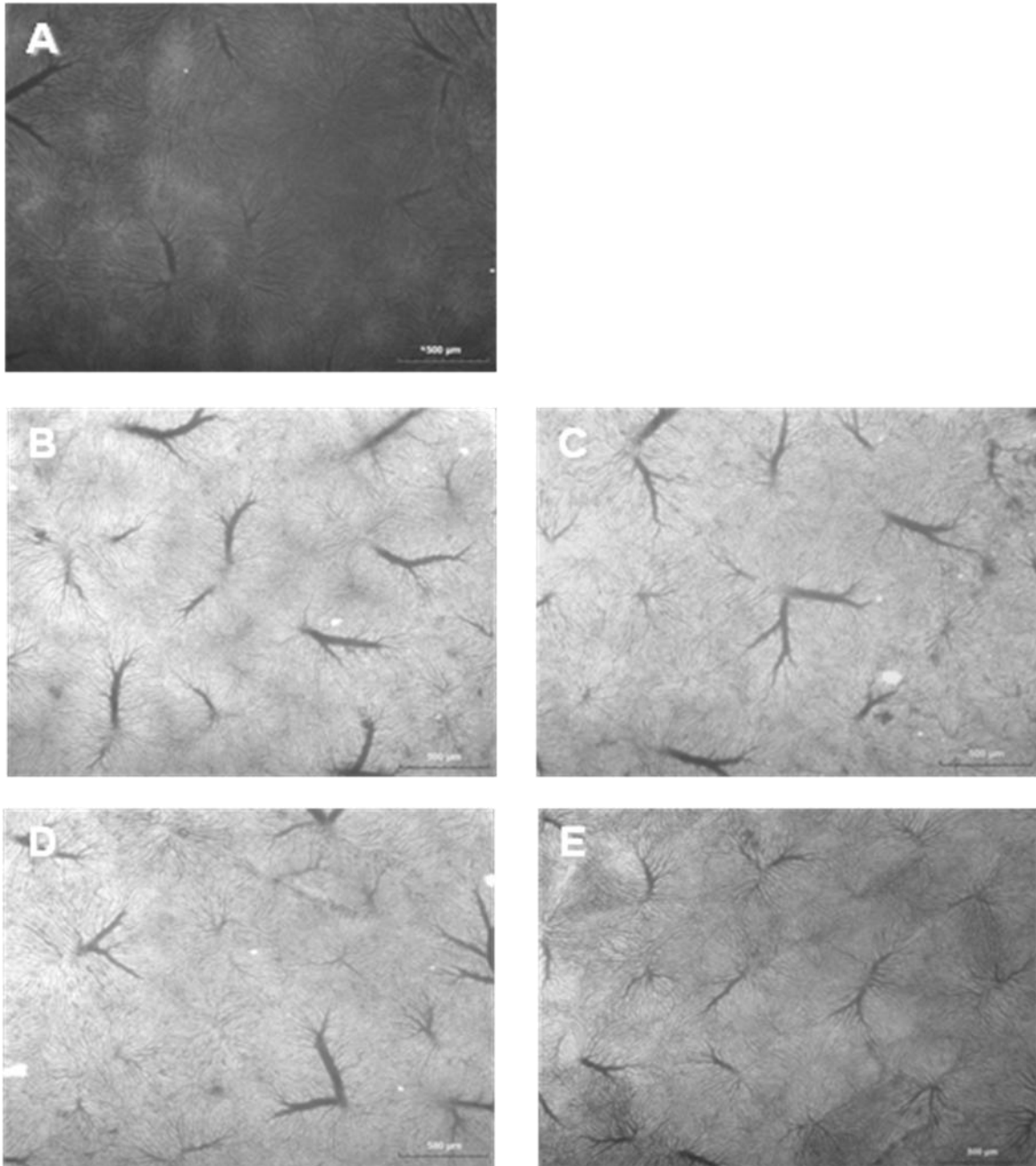


Abbildung 15: Representative intravitalmikroskopische Aufnahmen der NAD(P)H-Autofluoreszenz der Leberoberfläche. Dargestellt sind Aufnahmen von scheinoperierten Tieren, die keinem hämorrhagischen Schock unterzogen wurden (Sham; A), mit Vollelektrolytlösung vorbehandelten Tieren (Vehikel; B), und zusätzlicher Gabe von Bosentan (Vehikel+Bosentan; C) sowie von Tieren, die mit HbG präkonditioniert wurden (HbG; D) und HbG-präkonditionierten Tieren, bei denen die ET-1 Rezeptoren mit Bosentan blockiert wurden (HbG+Bosentan; E).

5.8 Indocyaningrün-Plasmaverschwinderate (PDR_{ICG})

Im Vergleich zu Sham führte H/R zu einer signifikanten Suppression der PDR_{ICG} in der Vehikel-Gruppe (Abbildung 16).

HbG-präkonditionierte Tiere zeigten nach H/R eine signifikant reduzierte PDR_{ICG} im Vergleich zur Sham-Gruppe und der Vehikel-Gruppe (Abbildung 16).

Die Blockade der ET-Rezeptoren mit Bosentan vor H/R führte in der Vehikel-Gruppe zu keiner Veränderung der PDR_{ICG} gegenüber der Vehikel-Gruppe ohne Blockade (Abbildung 16).

Die Applikation von Bosentan vor H/R nach HbG-Präkonitionierung verhinderte teilweise eine schockinduzierte Reduktion der PDR_{ICG} und führte gegenüber allen anderen Schock-Gruppen zu einer signifikanten Zunahme der PDR_{ICG} (Abbildung 16).

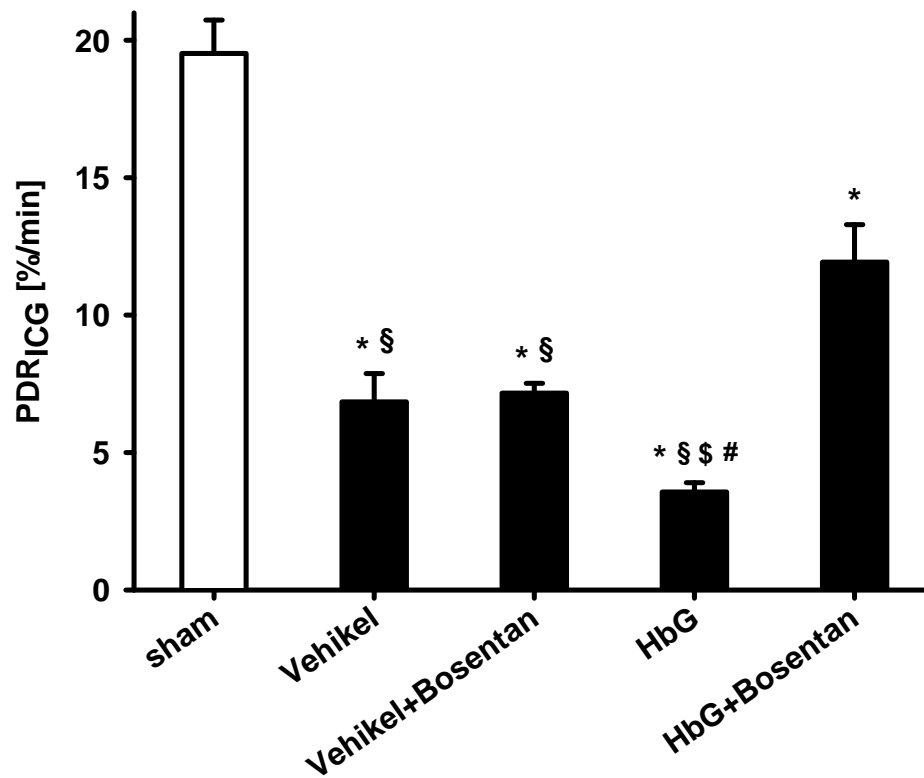


Abbildung 16: Indocyaningrün-Plasmaverschwinderate am Ende des Versuchsablaufs.

□ Kein Schock; ■ Hämorrhagischer Schock+Reperfusion; Vehikel: Voll-elektrolytlösung-Präkonditionierung; HbG: Hämoglobin-Glutamer 200-Präkonditionierung; Bosentan: ET-1-Rezeptorblocker; Die Daten sind Mittelwerte \pm SA von $n=8$ /Gruppe. * $p<0.05$ vs. Sham; # $p<0.05$ vs. Vehikel; § $p<0.05$ vs. HbG+Bosentan; § $p<0.05$ vs. Vehikel+Bosentan. ANOVA und Student-Newman-Keuls.

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

Im Vergleich zu Sham führte H/R zu einem signifikanten Anstieg des pro-inflammatorischen Zytokins TNF- α und des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 in der Vehikel-Gruppe (Abbildung 17 A,B).

HbG-präkonditionierte Tiere zeigten nach H/R einen leichten Anstieg des TNF- α und Abfall des IL-10 ohne statistische Signifikanz gegenüber der Vehikel-Gruppe (Abbildung 17 A,B).

Die Blockade der ET-Rezeptoren mit Bosentan vor H/R zeigte in der Vehikel-Gruppe keinen statistisch relevanten Unterschied in der Zytokinausschüttung gegenüber der Vehikel-Gruppe ohne Blockade (Abbildung 17 A,B).

Die Applikation von Bosentan vor H/R nach HbG-Präkonitionierung zeigte eine Verschiebung der Zytokinspiegel im Serum mit signifikanter Erhöhung des anti-inflammatorischen IL-10 und Reduktion des pro-inflammatorischen TNF- α im Vergleich zu allen anderen Schock-Gruppen (Abbildung 17 A,B).

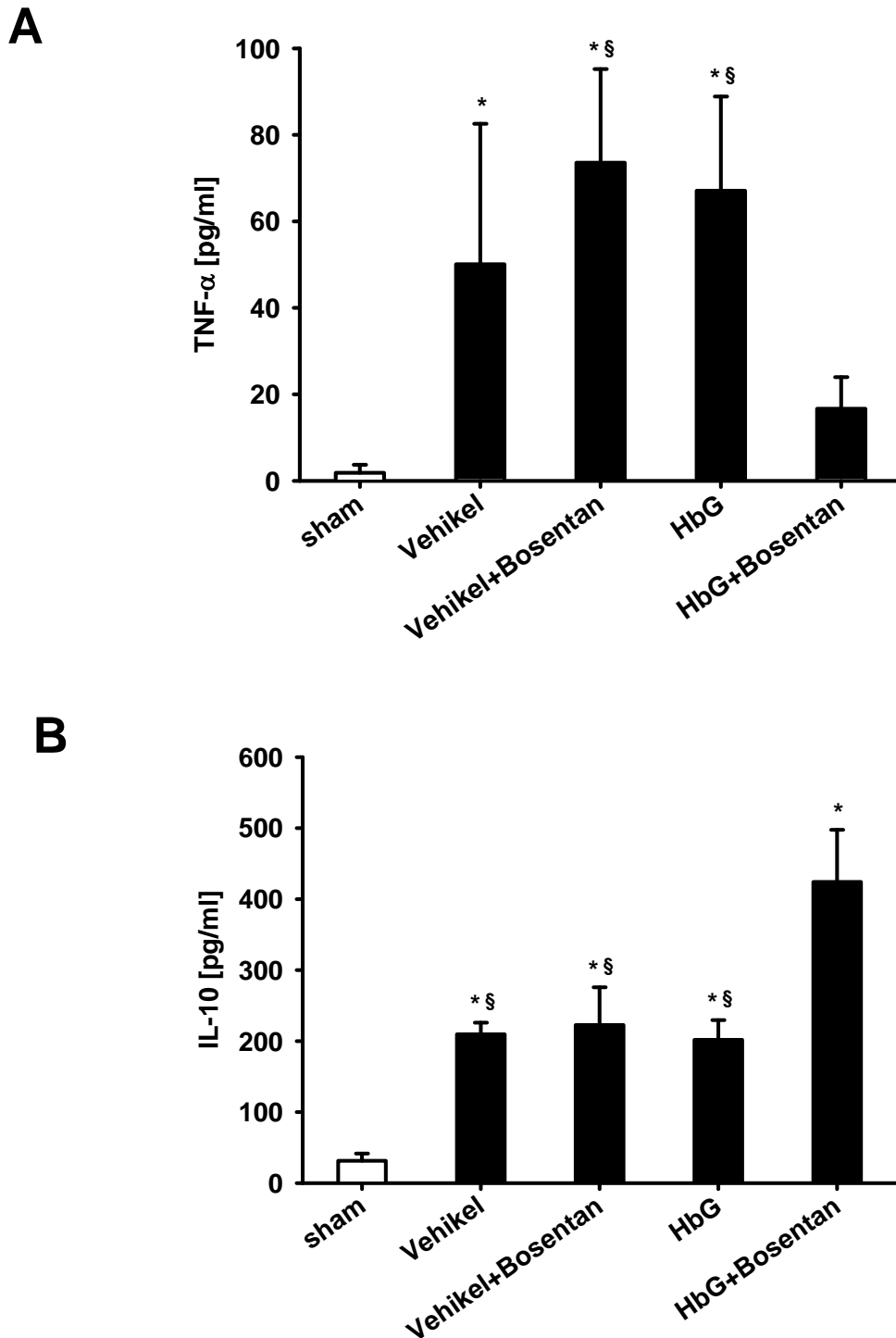


Abbildung 17 : Serumspiegel der Zytokine TNF- α (A) und IL-10 (B) am Ende des Versuchsablaufs.

□ Kein Schock; ■ Hämorrhagischer Schock+Reperfusion; Vehikel: Vollelektrolytlösung-Präkonditionierung; HbG: Hämoglobin-Glutamer 200-Präkonditionierung; Bosentan: ET-1-Rezeptorblocker; Die Daten sind Mittelwerte \pm SA von $n=8$ /Gruppe. * $p<0.05$ vs. Sham; § $p<0.05$ vs. HbG+Bosentan; ANOVA und Student-Newman-Keuls.

5.10 Zusammenfassung der Ergebnisse

Hämorrhagischer Schock und anschließende Reperfusion induzierte eine deutliche ET-1 Expression im Lebergewebe, welche durch HbG-Präkonditionierung noch mal signifikant verstärkt wurde.

Hämorrhagischer Schock und Reperfusion führten sowohl nach Vollelektrolyt-(Vehikel-), als auch nach HbG-Präkonditionierung durch eine signifikante Verringerung des sinusoidalen Durchmessers und der Anzahl der perfundierten Sinusoide zu einer signifikanten Reduktion der sinusoidalen Gesamtpfusion, die eine Zunahme der NAD(P)H Autofluoreszenz, der Leberenzyme sowie einem Anstieg der GluS-1 Expression zur Folge hatte. Darüber hinaus zeigte sich eine Zunahme des TNF- α und IL-10 Spiegels im Serum, sowie eine Reduzierung der Indocyanin-Plasmaverschwinderate.

Die Blockade der ET-Rezeptoren mit Bosentan vor H/R zeigte in der Vehikel-Gruppe keinen statistisch signifikanten Unterschied der Ergebnisse gegenüber der Vehikel-Gruppe ohne Blockade.

Die Applikation von Bosentan vor H/R nach HbG-Präkonditionierung verhinderte eine schockinduzierte Verschlechterung der Mikrozirkulation und führte sogar zu einem signifikanten Anstieg des volumetrischen Blutflusses gegenüber Sham. Dieses spiegelte sich in einer signifikanten Verringerung der Leberenzyme, der NAD(P)H Autofluoreszenz und signifikanten Verbesserung der PDR_{ICG} im Vergleich zu allen anderen Schock-Gruppen wieder. Darüber hinaus wurde die Zytokinfreisetzung zugunsten einer antiinflammatorischen Antwort moduliert mit signifikanter Erhöhung des IL-10 und Reduktion des TNF- α Serumspiegels gegenüber allen anderen Schock-Gruppen.

6. Diskussion

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass eine Vorbehandlung mit Hämoglobin-Glutamer 200 nicht zu einer Verbesserung der schock-bedingten Mikrozirkulationsstörung führt und nachhaltig eine hepatozelluläre Dysfunktion verstärkt. Eine durch Hämoglobin-Glutamer 200 verstärkte Induktion der Endothelin-1 Expression sowie eine Verschiebung der Zytokinfreisetzung in Richtung einer pro-inflammatorischen Antwort scheinen hierfür hauptsächlich verantwortlich zu sein.

6.1 Problemstellung

Akuter Blutverlust mit nachfolgendem Schock stellt trotz verbesserter Therapiemöglichkeiten eine gravierende Erkrankung mit hoher Letalität dar (Keel 2005). Die rasche Beseitigung der Blutungsquelle verbunden mit adäquatem Volumenersatz, inklusive Bluttransfusion ist für die Therapie von entscheidender Bedeutung (Carrico 2002). Die Transfusion von allogenen Erythrozytenkonzentraten ist Goldstandard in der Therapie von starken Blutverlusten. Die Verfügbarkeit von humanen Blutprodukten ist jedoch limitiert, so dass die Entwicklung artifiziell hergestellter Sauerstoffträger als Erythrozytenersatz von großem Interesse ist. DCLHb (Diaspirin-crosslinked Hemoglobin) und HbG (Hämoglobin-Glutamer 200) als Vorreiter der artifiziellen Sauerstoffträger waren aufgrund initial erfolgreicher experimenteller Studien besonders vielversprechend. In Phase-III Studien führte jedoch die Behandlung mit DCLHb zu einer Erhöhung der Mortalität, so dass die Entwicklung dieser Substanz bereits eingestellt wurde (Sloan 1999; Saxena 1999; Winslow 2000). Hämoglobin-Glutamer 200 befindet sich weiterhin in der Erprobung, eine Analyse ist jedoch aufgrund seltener klinischer Daten sehr schwierig (Levy 2003).

Sowohl in klinischen (Sloan 1999; Saxena 1999; Winslow 2000), als auch in experimentellen Studien (Kubulus 2005) führte die Behandlung mit artifiziellen Sauerstoffträgern zu einer Erhöhung der Mortalität durch Organversagen. Auffallend war, dass dieses nicht unmittelbar nach Applikation der Substanzen sondern verzögert nach mehreren Stunden oder Tagen beobachtet wurde. Die Gründe solcher negativen Langzeiteffekte sind nicht komplett verstanden, die Toxizität des

freien Hämoglobins, eine verstärkte Vasokonstriktion als auch die Induktion einer pro-inflammatorischen Zytokinfreisetzung könnten hierbei eine Rolle spielen.

Freies, azelluläres Hämoglobin hat eine starke Affinität zu Stickstoffmonoxid (NO) (Schulz 1993; Doherty 1998). NO ist ein second messenger, der über die Regulierung des zellulären zyklischen Guanosinmonophosphat (cGMP) den vaskulären Tonus beeinflussen kann, wobei eine Reduktion des NO-Gehaltes zu einer Vasokonstriktion führt (Ignarro 1987; Palmer 1987; Kubes 1992; Schmidt 1992; Suematsu 1996). Künstliche Sauerstoffträger weisen entsprechend ihres azellulären Hämoglobingehaltes ebenfalls diese Eigenschaft auf, wodurch die Applikation dieser Lösungen eine generalisierten Vasokonstriktion zur Folge hat (Olson 2004). Dieser Effekt tritt jedoch meist direkt nach Gabe von künstlichen Sauerstoffträgern auf und kann somit die negativen Langzeiteffekte nicht alleine erklären.

Langzeiteffekte könnten durch die bekannte lange Verweildauer der künstlichen Sauerstoffträger im Gewebe und die damit verbundene lange Wirkung hervorgerufen werden. Dadurch könnte auch die induzierte Vasokonstriktion verlängert wirken, wobei diese nicht nur eine Folge der NO-Affinität sondern auch einer direkten Interaktion dieser Lösungen mit der Gefäßwand sowie einer vermehrten Induktion von Endothelin-1 sein kann (Winslow 2003; Cocks 1991; Ohlstein 1992; Schultz 1993). Endothelin-1 ist ein starker Vasokonstriktor, der insbesondere nach Stressereignissen induziert wird und über die Aktivierung von ET_A - sowie ET_B -Rezeptoren zu einer Verminderung des Gefäßdurchmesseres führt. Dieser Effekt ist besonders ausgeprägt im Bereich der Mikrozirkulation, so dass durch ET-1 Induktion eine Minderversorgung der Organe und hierdurch eine Organdysfunktion verursacht werden kann. Darüber hinaus scheint ET-1 auch eine Modulation der Zytokinfreisetzung in Richtung einer Proinflammation zu bewirken (Sabaa 2008).

Entsprechend könnten die Langzeiteffekte durch die Induktion von ET-1 und damit verursachte Organdysfunktion für die verstärkte Mortalität nach Einsatz von HbG ursächlich verantwortlich sein.

6.2 Diskussion von Material und Methodik

6.2.1 Tiermodell

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

Aufgrund der notwendigen Invasivität mit möglichen lebensbedrohlichen Komplikationen ist die Untersuchung der hepatischen Mikrozirkulation nach kontrollierter Hämorrhagie am Menschen ethisch und moralisch nicht vertretbar. Aus diesem Grund wurde in dieser Studie ein Tiermodell zur Beantwortung der Fragestellung gewählt.

In Hinblick auf die zu untersuchenden Auswirkungen einer Medikamentenfgabe auf die Mikrozirkulation der Leber bot das gewählte Modell mit Simulation und darauffolgender objektiver Beobachtungsmöglichkeit der mikroskopischen Veränderungen der hepatischen Perfusion entscheidende Vorteile. Zusätzlich konnte durch die Messung der Indocyaninverschwinderate die Leberfunktion objektiviert werden. Studien, die durch indirekte Methoden zelluläre Mechanismen oder Zell-Zell-Interaktionen (Schmid-Schonbein 1980) mit einem auf isolierte Zellen, Zellverbände oder Organe Modell untersuchen haben dagegen eher eine deterministische Betrachtungsweise (Wortha 1992), d.h. sie zeigen spezifische Ursache-Wirkungsprinzipien. Der Nachteil dieser Betrachtungsweise ist die mangelnde Berücksichtigung der Interaktionen einzelner Organsystem innerhalb eines Organismus, welche durch makro- und mikrozirkulatorische Parameter, metabolische Faktoren, neuronalen Steuerungsmechanismen und humorale Kaskadensysteme beeinflusst werden (McCuskey 1986).

Diese interferierenden lokalen und systemischen Rückkopplungsmechanismen in der Regulierung komplexer pathophysiologischer Prozesse werden dagegen in In-vivo-Modellen, wie das in der vorliegenden Arbeit gewählte, berücksichtigt (Menger 1993). Es wurden ausschließlich männliche Sprague-Dawley-Ratten untersucht. Dies sollte eine Beeinflussung der Ergebnisse durch den Reproduktionszyklus weiblicher Tiere vermeiden, da Östrogene im Rahmen eines hämorrhagischen Schocks protektiv wirken sollen (Jarrar 2000; Jarrar 2000; Mizushima 2000; Kuebler 2003; Ba 2005).

Als Nachteil kann erscheinen, wie bei allen experimentellen Modellen, dass die Übertragbarkeit der gewonnenen Ergebnisse aufgrund der Unterschiede zwischen Ratte und Mensch nur limitiert ist. In der vorliegenden Arbeit wird die Auswirkung einer Hämorrhagie auf die Perfusion der Leber unter standardisierten Bedingungen untersucht. Eine Aussage auf die Interaktionen im gesamten Organismus oder auf einzelne andere Organsysteme kann nicht uneingeschränkt erfolgen. Ein akzidenteller hämorrhagischer Schock verläuft eher unter unkontrollierten Bedingungen, dies würde einen Vergleich der Ergebnisse jedoch nicht im selben Ausmaß ermöglichen wie in der vorliegenden standardisierten Studie (Lomas-Niera 2005).

6.2.2 Hämorrhagischer Schock

Alle Versuchstiere zeigten vor Beginn der Schockphase nach abgeschlossener Präparation bezüglich der Makrohämodynamik und Blutgasanalyse keine signifikant voneinander unterschiedlichen Werte. Diese entsprachen den beschriebenen Normalwerten für Laborratten.

Entsprechend des Schockmodells nach WIGGERS und INGRAM (1946), unterschied sich der mittlere arterielle Blutdruck aller Gruppen während des hämorrhagischen Schocks nicht signifikant voneinander. Um den Blutdruck auf dem gewünschten Niveau (30-40mmHg) konstant halten zu können, mussten in der Regel noch während der Schockphase kleinere Mengen Blut (0,2- 0,4 ml) entnommen werden, um den endogenen Kompensationsmechanismen entgegenzuwirken. Als irreversible Dekompensation gilt im gewählten Modell ein spontaner weiterer Abfall des Blutdruckes im Schock sowie ein auch nach vollständiger Rücktransfusion des vorher entzogenen Blutes nicht längerfristig ansteigender Blutdruck mit darauffolgendem Exitus letalis des Versuchstieres. Eine vorhergehende Studie konnte zeigen, dass Vehikel-Tiere einen mittleren Dekompensationszeitpunkt von 68 min nach Schockbeginn aufwiesen. Im Gegensatz dazu führte die Präkonditionierung mit HbG 24 h vor Schock zu einem signifikant früheren Auftreten des Dekompensationszeitpunktes (36 min nach Schockbeginn), was auf eine substanzspezifische Verschlechterung der Schocktoleranz hinweist (Kubulus 2005).

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

Durch den im hämorrhagischen Schock entstehenden Sauerstoffmangel, und daraus resultierenden anaeroben Glukosestoffwechsel entwickelt sich eine azidotische Stoffwechsellage. Dies spiegelt sich im ansteigenden Laktatwert und sinkenden pH-Wert während der Hypotension wieder. Gleichzeitig sinkt während der Schockphase der paCO_2 (im Mittel unter 25 mmHg) stark ab, als Zeichen einer reflektorischen respiratorischen Kompensation. Der Abfall des pH Wertes bei begleitendem Abfall der Pufferbasen sowie des paCO_2 , spiegelt daher eine respiratorisch teilkompensierte, metabolische Azidose wieder (LARSEN 1995). Parallel zum sinkenden Kohlendioxidpartialdruck stieg der Sauerstoffpartialdruck während des Schocks an. Eine Rolle spielten hierbei die Zunahme der Ventilation durch Erhöhung der Atemfrequenz und möglicherweise ein verbessertes Ventilations/Perfusionsverhältnis (LARSEN 1995).

Nach einstündiger Schockphase führte die Retransfusion von 60% des entnommenen Blutvolumens in der vorliegenden Studie in der Vehikel-Gruppe zu einem zügigen Ansteigen des Blutdrucks auf Ausgangswerte sowie zu einer Normalisierung des Säure Basenhaushalts, so dass man hierbei von einem kompensierten, voll reversiblen Schockmodell ausgehen kann. Dagegen zeigten Tiere mit HbG Vorbehandlung eine weiter bestehende Depression der Hämodynamik nach Reperfusion, so dass man von einem negativen Effekt der Vorbehandlung mit HbG ausgehen muss.

6.2.3 Intravitalmikroskopie

Zur Untersuchung der Mikrozirkulation der Leber wurde die Intravitalmikroskopie gewählt. Es handelt sich hierbei um eine direkte Technik zur detaillierten, quantitativen und qualitativen Analyse dynamischer Prozesse.

Im Vergleich zu indirekten Verfahren wie die Laser-Doppler-Flowmetrie (Krejci 2000; Arvidsson 1988; Almond 1992), dem Einsatz von radioaktiven Mikrosphären (Vollmar 1992), der Wasserstoff-Gas-Clearance (Oda 2003; Metzger 1992) und der Platinum-

multiwire Oberflächen-Elektroden zur Bestimmung der Gewebeoxygenierung (Spiegel 1987) bietet die Intravitalmikroskopie über eine direkte Visualisierung des mikrozirkulatorischen Gefäßbetts erhebliche Vorteile zur Analyse der hepatischen Mikrozirkulation hinsichtlich der Fragestellung dieser Arbeit (Menger 1991; Uhlmann 1999).

Die Parameter der Mikrozirkulation können aufgrund ihrer Vielzahl und Geschwindigkeit kaum in Echt-Zeit-Messungen analysiert werden. Durch Aufnahme der Sequenzen am intravitalmikroskopischen Arbeitsplatz mittels hochauflösender Digitalkamera können diese gespeichert und später off-line verblindet analysiert werden. Die digitale Speicherung der Daten erlaubt hierbei nicht nur die wiederholte Analyse von Bildsequenzen sondern auch die Verarbeitung rascher Abläufe durch Verwendung der Zeitlupe, Bild-zu-Bild Analysen und Standbildern. Zur genaueren Abgrenzung verschiedene Strukturen können nachträglich Kontrastverhältnisse verstärkt werden.

Hier erlaubt die Intravitalmikroskopie bei gleichbleibender Vergrößerung und Kalibrierung des Mikroskops und der Software eine direkte Messung von Sinusoiddurchmessern, Flussgeschwindigkeiten und NAD(P)H-Autofluoreszenz.

Zur Analyse der mikrozirkulatorischen Veränderungen im hämorrhagischen Schock nach HbG-Vorbehandlung wurde in dem gewählten Versuchsaufbau die Epifluoreszenz-Intravitalmikroskopie mit invertiertem Mikroskop eingesetzt (Takei 1991). Dabei sind das Filtersystem und die Lampe oberhalb des ausgelagerten Leberlappens lokalisiert. Durch die Epilumination der Leberoberfläche kann das Gewebe unabhängig von seiner Dicke analysiert werden, da die Durchleuchtung des Gewebes nicht notwendig ist. Jedoch kann hierbei nur das an der Leberoberfläche gelegene Gewebe analysiert werden. Es ist also nicht auszuschließen, dass die gewonnenen Daten nicht für die gesamte Leber repräsentativ sind. Die hepatischen Arteriolen und portalen Venolen können ebenfalls nicht visualisiert werden. Dies ist hier jedoch von untergeordneter Bedeutung, da es in der Fragestellung dieser Arbeit um die Veränderungen der sinusoidalen Mikrozirkulation geht, welche in dem vorgestellten Aufbau gut beurteilbar ist.

Wichtige Voraussetzung zur Intravitalmikroskopie ist eine plane und klare Oberfläche zur Auflage des Gewebes, um scharfe Bilder zu erzielen ohne das Gewebe zu

schädigen und dadurch die Perfusion zu stören und so die Ergebnisse zu beeinflussen (Uhlmann 1999).

Um dies in der vorliegenden Studie zu erreichen, wurde die abdominelle Präparation unter besonderer Vorsicht durchgeführt. Berührungen des Lebergewebes wurden vermieden und das Lebergewebe wurde regelmäßig mit NaCl-Lösung gespült, um ein Austrocknen zu verhindern. Das Lagern des mobilisierten Leberlappens erfolgte mit Hilfe NaCl-getränkter Wattestäbchen um das Gewebe zu schonen. Nach der Auslagerung wurde ein möglicher trockenheitsbedingter Gewebeschaden durch Befeuchtung und Abdeckung der Leber mit Folie weitestgehend verhindert (Vollmar 1994; Bauer 2002). Durch möglichst kurze Belichtungszeiten wurde zusätzlich eine potentielle phototoxische Schädigung des beleuchteten Gewebes minimiert. Fluoreszenzfarbstoff und markierte Erythrozyten wurden in gewichtsadaptierter Dosis appliziert. Da alle Versuchstiere den gleichen standardisierten Abläufen ausgesetzt waren, kann eine gruppenspezifischen Beeinflussung der Ergebnisse durch Präparation oder Untersuchung nicht angenommen werden.

6.2.4 Messmethoden

Die intravitalmikroskopisch gewonnenen Aufnahmen wurden off-line verblindet ausgewertet. Eine wesentliche Voraussetzung für die exakte Messung der gewünschten Parameter ist eine scharfe und kontrastreiche intravitalmikroskopische Aufnahme. Bis auf wenige Ausnahmen, die zum Teil verstärkte atemabhängige Bewegung des Leberlappens oder eine Extravasation von Erythrozyten zeigten und damit eine schlechtere Bildqualität aufwiesen, erfüllten die Aufzeichnungen die nötigen Anforderungen zur genauen Bestimmung der zu untersuchenden Parameter. Zur besseren Differenzierung zwischen dunklen Sinusoiden und hellen Hepatozyten wurde Natrium-Fluorescein als kontrastverstärkender Fluoreszenzfarbstoff eingesetzt (Uhlmann 1999).

Zur Bestimmung des mittleren sinusoidalen Durchmessers wurden die Querdurchmesser von mindestens 20 zufällig gewählten Sinusoiden pro Perizentralfeld gemessen und daraus der mittlere Durchmesser berechnet. Diese Messung erfolgte in 5 Perizentralfeldern je Versuchstier. Die Anzahl von mindestens

20 Sinusoiden je Perizentralfeld konnte in allen Versuchstieren erreicht werden und ließ somit die Berechnung eines repräsentativen Mittelwertes für den sinusoidalen Durchmesser zu.

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

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

Zur Minimierung eines interindividuellen Messfehlers erfolgte die Auswertung der Parameter immer durch den gleichen Untersucher. Durch die hohe Anzahl der Tiere und randomisierte Zuteilung dieser in die jeweilige Gruppe sollte darüber hinaus ein systematischer Fehler gering gehalten werden.

6.2.5 ICG-Plasmaeliminationsrate

Die Messung der Indocyanin-Plasmaeliminationsrate liefert objektive Informationen über den hepatischen Metabolismus sowie die Leberperfusion (Gottlieb 1983) und ist somit ein geeigneter Parameter zur Abschätzung der exkretorischen Leberfunktion. Indocyaningrün (ICG) ist ein nicht-toxischer Farbstoff, der rein hepatisch und unabhängig vom enterohepatischen Kreislauf ausgeschieden wird (Caesar 1961). Die ICG-Plasmaeliminationsrate wird zwar direkt durch den hepatischen Blutfluss und den Leberstoffwechsel beeinflusst. Jedoch rückt bei einer starken Reduzierung des hepatischen Blutflusses, z.B. unter Low-Flow-Bedingungen, die flussabhängige Komponente der ICG-Elimination in den Hintergrund, sodass diese rein von der hepatischen Stoffwechselleistung abhängig wird. Somit kann die exkretorische Leberfunktion unter Schockbedingungen objektiviert werden.

Die Messung der ICG-Plasmaeleminationsrate erfolgte immer unter zweimaliger spektrophotoskopischer Kontrollmessung gegen eine reine Plasmalösung des selben Tieres. Die jeweiligen Proben wurden ebenfalls zweimalig gemessen um einen technischen Messfehler möglichst gering zu halten und daraus der Mittelwert berechnet.

6.3 Diskussion der Ergebnisse

Um die negativen Spätfolgen einer Therapie mit HbG zu demaskieren, erfolgte in der vorliegenden Arbeit die Vorbehandlung 24 Stunden vor Schockbeginn. Hierbei war einerseits ausschlaggebend, dass die Gewebekonzentration der künstlichen Sauerstoffträger 24 Stunden nach Applikation am höchsten ist (Keipert 1994). Andererseits wurde das Studiendesign an eine vorrangigen Arbeit angepasst, um die dort festgestellte Erhöhung der Mortalität durch HbG zu analysieren (Kubulus 2005).

In der vorliegenden Arbeit konnte mittels PCR gezeigt werden, dass die ET-1 Expression im Lebergewebe nach HbG Vorbehandlung im Vergleich zur Vollelektrolytlösung signifikant ansteigt. Es ist anzunehmen, dass die Induktion der ET-1 Expression entweder direkt rezeptorvermittelt (Cocks 1991; Ohlstein 1992) oder indirekt über eine NO-Reduktion im Gewebe stattfindet (Lin 2001). ET-1 wird von der sinusoidalen Endothelzelle sezerniert. Die Wirkung auf unterschiedliche Zellen erfolgt entweder über ET_A- oder ET_B-Rezeptoren. Die Freisetzung von ET-1 resultiert in einer Vasokonstriktion mit Erhöhung des intrazellulären Ca²⁺ und Zunahme des sinusoidalen Widerstandes (Oda 2003). Künstliche Sauerstoffträger sind gut gewebebegänglich, insbesondere auf Kapillarebene (Smani 2005). Der Grund für den verzögerten negativen Effekt nach HbG-Vorbehandlung könnte entsprechend durch die maximale Gewebekonzentration der künstlichen Sauerstoffträgers 24 Stunden nach Applikation und die damit erhöhte ET-1 Konzentration im Gewebe erklärbar sein.

Die Analyse der Mikrozirkulation zeigte eine deutliche Reduktion der sinusoidalen Perfusion bei allen Tieren nach hämorrhagischen Schock und Reperfusion. Die zusätzliche ET-1 Induktion nach HbG Vorbehandlung führte nicht zu einer weiteren

Verschlechterung der sinusoidalen Mikroperfusion. Jedoch konnte die schockinduzierte Mikozirkulationsstörung nur in den Tieren nach HbG Vorbehandlung durch Blockade der ET Rezeptoren verhindert werden. Dies lässt den Schluss zu, dass eine Therapie mit HbG zu einer negativen Auswirkung auf die Organdurchblutung durch eine ET-1 vermittelte Verschlechterung der Mikrozirkulation führt.

Parallel zur schockinduzierten Verschlechterung der Mikrozirkulation erhöhte sich die NADP(H)-Autofluoreszenz als Marker des sauerstoffabhängigen mitochondrialen Redoxstatus in beiden Gruppen, was die gestörte mitochondriale Sauerstoffversorgung nach hämorrhagischem Schock widerspiegelt. Begleitet wurde diese mitochondriale Dysfunktion durch eine Erhöhung der GluS-1 Expression. Dabei zeigte sich jedoch, dass Versuchstiere, die mit HbG vorbehandelt wurden, eine signifikante Zunahme der GluS-1-Genexpression im Lebergewebe im Vergleich zu Tieren, die mit Vollelektrolytlösung vorbehandelt wurden aufwiesen. GluS-1 ist ein sauerstoffabhängiges, hepatozelluläres Schlüsselenzym, das als Marker für die Sauerstoffverfügbarkeit im Lebergewebe nach hämorrhagischen Schock und Reperfusion genutzt wurde, da es bei niedrigem Sauerstoffangebot vermehrt gebildet wird. Der Anstieg der GluS-1 Genexpression ist somit negativ proportional zum Sauerstoffangebot im Gewebe und ein zuverlässiger Marker für einen hypoxischen Leberschaden (Paxian 2003). Die Gene für die Glukoseaufnahme und Glutaminbildung werden unter physiologischen Bedingungen v.a. in der perivenösen Zone exprimiert. Ein anhaltender Sauerstoffmangel in dieser Zone als Ergebnis einer Hypoxämie führt somit zu einer Erhöhung der Expression der metabolischen sauerstoffabhängigen Schlüsselenzyme. Passend zu dieser Theorie zeigten alle Tiere nach hämorrhagischem Schock einen Anstieg der GluS-1 Genexpression im Vergleich zu Tieren, die keinem hämorrhagischem Schock unterzogen wurden. Die Vorbehandlung mit HbG führte jedoch zu einem zusätzlichen Anstieg der GluS-1 Genexpression, was auf einen weiteren hypoxischen Schaden durch HbG nach hämorrhagischen Schock hinweist. Diese Beobachtung könnte durch eine zusätzlich hepatozelluläre Schädigung durch die hohe Hämexposition nach Applikation von HbG verursacht sein, da die Aufnahme und Metabolisierung von freiem oder Haptoglobin-gebundenem Häm primär in den parenchymatösen Leberzellen stattfindet. Die dadurch entstehende Einschränkung der mitochondrialen Atmung

wird auch als „zytopathische Hypoxie“ bezeichnet (Fink 2001). Zusätzlich wurde bereits eine Zelltoxizität durch freies Eisen, das beim Abbau von künstlichen Sauerstoffträgern wie HbG anfällt, beschrieben (Goldmann 1998). Eisen wirkt als Pro-Oxidanz und katalysiert dadurch die Bildung freier Sauerstoffradikale (OH^-) über die Fenton oder Haber-Weiss Reaktion (Everse 1997). Diese Sauerstoffradikale sind verantwortlich für das Aktivieren von Zellapoptose, was zu einer weiteren Zellschädigung führt (Bauer 2002). Ein vermehrtes Anhäufen von Eisen kann so für eine zelluläre Dysfunktion durch mitochondriale Schädigung verantwortlich sein (Duvigneau 2008).

Der Anstieg von freiem Häm und Eisen nach HbG-Therapie kann demnach verantwortlich sein für die langanhaltende hepatozelluläre Schädigung durch die Bildung von Sauerstoffradikalen und vermehrte Induktion der ET-1. In diesem Zusammenhang konnte bereits gezeigt werden, dass freies, azelluläres Hämoglobin zu einer Erhöhung der ET-1 Konzentration in zerebralen Endothelzellen führt (Lin 2000).

Der hepatozelluläre Schaden nach hämorrhagischem Schock und Reperfusion wurde in der vorliegenden Arbeit sowohl über Messung der Serumkonzentration der Leberenzyme als auch über die Indocyaningrün-Plasmaverschwinderate beurteilt.

Die Leberenzyme ASAT, ALAT und GLDH waren bei allen Tieren, die einem hämorrhagischen Schock mit anschließender Reperfusion unterzogen wurden, signifikant erhöht. Die HbG-Vorbehandlung führte zu einem weiteren, nicht signifikantem Anstieg der Leberenzyme im Vergleich zur Vorbehandlung mit Vollelektrolytlösung. Die Leberenzyme zeigen jedoch ihre Maxima in der Serumkonzentration zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Reperfusion, während GLDH eine maximale Aktivität 6h nach Reperfusion aufweist, ist diese für ASAT und ALAT erst nach 18 Stunden am höchsten. Da in der vorliegenden Studie die Werte bereits 2 h nach Reperfusion gemessen wurden, sind diese nur eingeschränkt beurteilbar.

In Low-flow Situationen, wie einem hämorrhagischen Schock, zeigt die Messung der Indocyaningrün-Plasmaverschwinderate eine Einschränkung der Leberfunktion deutlich verlässlicher an als die Serumkonzentration der Leberenzyme (Plevris 1999). Indocyanin wird rein hepatisch metabolisiert und spiegelt somit die exkretorische Leberfunktion direkt wieder. HbG-vorbehandelte Tiere zeigten eine

signifikant reduzierte PDR_{ICG} im Vergleich zu Vollelektrolytlösung-Vorbehandlung, was auf eine zusätzliche Störung der Leberfunktion durch HbG hinweist. Die Blockade der ET Rezeptoren konnte jedoch diesen Effekt aufheben und führte nur in den HbG-vorbehandelten Tieren sogar zu einer signifikanten Zunahme der PDR_{ICG} . Hierdurch wird die Annahme, dass eine Vorbehandlung mit HbG den hepatozellulären Schaden aggraviert unterstützt.

Hämorrhagischer Schock und Reperfusion führten nach Vollelektrolytlösung-Vorbehandlung zu einem signifikanten Anstieg der Zytokine TNF- α und IL-10. HbG-vorbehandelte Tiere zeigten im Vergleich dazu einen leichten zusätzlichen Anstieg des TNF- α und einen Abfall des IL-10, also eine Verschiebung der Zytokine in Richtung einer pro-inflammatorischen Antwort. In klinischen Studien wurde bereits gezeigt, dass ein erhöhter TNF- α Spiegel nach Trauma bei Patienten mit einer erhöhten Sterblichkeit korreliert (Roumen 1993) sowie eine fehlende Hochregulation des IL-10 Spiegels mit einer vermehrten Organdysfunktion verbunden sein kann (Khadaroo 2004). Wie bereits gezeigt werden konnte, ruft eine vermehrte Bildung von ET-1 eine inflammatorische Reaktion hervor, was eine Steigerung der Organfehlfunktion und Mortalität bedeutet (Sabaa 2008). Die Blockade der ET Rezeptoren führte nach HbG-Vorbehandlung zu einer deutlichen Verschiebung der Zytokine in Richtung einer anti-inflammatorischen Antwort mit signifikanter Erhöhung des anti-inflammatorischen IL-10 und Reduktion des pro-inflammatorischen TNF- α und konnte dadurch die pro-inflammatorische Antwort verhindern. Es ist demnach anzunehmen, dass HbG über eine vermehrte ET-1 Induktion zu einer ungünstigen Zytokinantwort führt, die mitverantwortlich für die vermehrte Organdysfunktion und Mortalität ist.

6.4 Schlussfolgerung

Die vorliegende Studie verdeutlicht, dass Hämoglobinglutamer-200 eine Langzeitwirkung aufweist, die insbesondere über die vermehrte Induktion der ET-1 Expression zu einer langanhaltenden Störung der Leberfunktion führt.

Dabei verursacht die ET-1 Freisetzung nicht nur eine Einschränkung der hepatischen Mikrozirkulation sondern auch eine Verschlechterung der exkretorischen Leberfunktion. Außerdem kommt es über eine Modulation der Zytokinfreisetzung zu einer Pro-Inflammation. Diese ET-1 abhängigen negativen Effekte könnten die bekannte erhöhte Mortalität nach Behandlung mit HbG erklären. Unterstützt wird diese Feststellung durch die Beobachtung, dass die Blockade der ET Rezeptoren alle negativen Auswirkungen der HbG Vorbehandlung aufhebt.

Die Reduktion der ET-1 abhängigen Nebenwirkungen von künstlichen Sauerstoffträgern ist deshalb von entscheidender Bedeutung in der Entwicklung zukünftiger Blutersatzprodukte, um ein sichere Alternative zur homologen Erythrozytentransfusion verfügbar machen zu können.

Zu beachten ist jedoch, dass die in dieser tierexperimentellen Studie gewonnenen Ergebnisse nicht direkt auf den Menschen übertragbar sind, da die Physiologie des Tieres nicht uneingeschränkt auf den Menschen anwendbar ist. Deshalb sind weitere Untersuchungen notwendig, um die gewonnenen Erkenntnisse der Grundlagenforschung in der Zukunft klinisch nutzbar machen zu können.

7. Literaturverzeichnis

1. Adams, H.A., Baumann G, Gansslen A, Janssens U, Knoefel W, Koch T, Marx G, Muller-Werdan U, Pape HC, Prange W, Roesner D, Standl T, Teske W, Werner G, Zander R. "Definition of shock types."
Anaesthesiol.Intensivmed.Notfallmed.Schmerzther. (2001) S140-S143
2. Almond N.E., Wheatley AM. "Measurement of hepatic perfusion in rats by laser doppler flowmetry." Am.J.Physiol. 1 (1992): G203-209
3. Amberson, W. R., J. J. Jennings, and C. R. Rhode. "Clinical experience with hemoglobin-saline solutions." Applied Physiology 1.7 (1949): 469-89.
4. Arvidsson D, Svensson H, Haglund U. "Laser-Doppler flowmetry for estimating liver blood flow." Am.J.Physiol. 4Pt 1 (1988): G471-476
5. Ba ZF, Shimizu T, Szalay L, Bland KI, Chaudry IH. "Gender differences in small intestinal perfusion following trauma hemorrhage: the role of endothelin-1." Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol 5 (2005): G860-G865
6. Bahrami, S., et al. "Significance of TNF in hemorrhage-related hemodynamic alterations, organ injury, and mortality in rats." Am.J.Physiol 272.5 Pt 2 (1997): H2219-H2226.
7. Baue, A. E., R. Durham, and E. Faist. "Systemic inflammatory response syndrome (SIRS), multiple organ dysfunction syndrome (MODS), multiple organ failure (MOF): are we winning the battle?" Shock 10.2 (1998): 79-89.
8. Bauer, I., et al. "Chronic ethanol consumption exacerbates liver injury following hemorrhagic shock: role of sinusoidal perfusion failure." Shock 4.5 (1995): 324-31.
9. Bauer, M. and I. Bauer. "Heme oxygenase-1: redox regulation and role in the hepatic response to oxidative stress." Antioxid.Redox.Signal. 4.5 (2002): 749-58.
10. Bickell, W. H., et al. "Immediate versus delayed fluid resuscitation for hypotensive patients with penetrating torso injuries [see comments]." N.Engl.J.Med. 331.17 (1994): 1105-09.
11. Bone, R. C., W. J. Sibbald, and C. L. Sprung. "The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure." Chest 101.6 (1992): 1481-83.
12. Bouwens, L., et al. "Liver cell heterogeneity: functions of non-parenchymal cells." Enzyme 46.1-3 (1992): 155-68.

13. Braet, F. and E. Wisse. "Structural and functional aspects of liver sinusoidal endothelial cell fenestrae: a review." Comp Hepatol. 1.1 (2002): 1.
14. Caesar J, Shaldon S, Chiandussi L, Guevara L, Sherlock S. "The use of indocyanine green in the measurement of hepatic blood flow and as test of hepatic function." Clin.Sci. 21 (1961): 43-57
15. Carrico, C. J., John B. Holcomb, and Irshad H. Chaudry. "Scientific Priorities and Strategic Planning for Resuscitation Research and Life Saving Therapy Following Traumatic Injury: Report of the PULSE Trauma Work Group." Shock 17.3 (2002): 165-68.
16. Chun, K., et al. "Microcirculatory failure determines lethal hepatocyte injury in ischemic/reperfused rat livers." Shock 1.1 (1994): 3-9.
17. Clemens, M. G., et al. "Remodeling of hepatic microvascular responsiveness after ischemia/reperfusion." Shock 8.2 (1997): 80-85.
18. Cocks, T. M., et al. "Oxyhaemoglobin increases the production of endothelin-1 by endothelial cells in culture." Eur.J.Pharmacol. 196.2 (1991): 177-82.
19. Deitch, E. A. "Multiple organ failure. Pathophysiology and potential future therapy." Ann.Surg. 216.2 (1992): 117-34.
20. Doherty, D. H., et al. "Rate of reaction with nitric oxide determines the hypertensive effect of cell-free hemoglobin." Nat.Biotechnol. 16.7 (1998): 672-76.
21. Driessen, B., et al. "Arterial oxygenation and oxygen delivery after hemoglobin-based oxygen carrier infusion in canine hypovolemic shock: a dose-response study." Crit Care Med. 31.6 (2003): 1771-79.
22. Driessen B, Zarucco L, Gunther RA, Burns PM, Lamb SV, Vincent SE, Boston RA, Jahr JS, Cheung AT. "Effects of low-volume hemoglobin glutamer-200 versus normal saline and arginine vasopressin resuscitation on systemic and skeletal muscle blood flow and oxygenation in a canine hemorrhagic shock model." Crit Care Med. 35 (2007): 2101-2109
23. Durham, R. M., et al. "Multiple organ failure in trauma patients." J.Trauma 55.4 (2003): 608-16.
24. Duvigneau JC, Psikernik C, Haindl S, Kloesch B, Hartl RT, Huttemann M, Lee I, Ebel T, Moldzio R, Gemeiner M, Redl H, Kozlov AV. "A novel endotoxin-induced pathway: upregulation of heme oxygenase 1, accumulation of free

- iron, and free iron-mediated mitochondrial dysfunction." Lab Invest 88 (2008): 70-77
25. Enomoto, K., et al. "Cell biology and pathology of liver sinusoidal endothelial cells." Med.Electron Microsc. 37.4 (2004): 208-15.
 26. Ertel, W., H. P. Friedl, and O. Trentz. "Multiple organ dysfunction syndrome (MODS) following multiple trauma: rationale and concept of therapeutic approach." Eur.J.Pediatr.Surg. 4.4 (1994): 243-48.
 27. Everse, J. and N. Hsia. "The toxicities of native and modified hemoglobins." Free Radic.Biol.Med. 22.6 (1997): 1075-99.
 28. Fink, M. P. "Cytopathic hypoxia. Mitochondrial dysfunction as mechanism contributing to organ dysfunction in sepsis." Crit.Care Clin. 17.1 (2001): 219-37.
 29. Garrison, R. N., et al. "Microvascular changes explain the "two-hit" theory of multiple organ failure." Ann.Surg. 227.6 (1998): 851-60.
 30. Goldmann DW, Breyer RJ, III, Yeh D, Brockner-Ryan BA, Alayash AI. "Acellular hemoglobin-mediated oxidative stress toward endothelium: a role for ferryl iron." Am.J.Physiol 275 (1998): H1046-H1053
 31. Gottlieb ME, Sarfeh IJ, Stratton H, Goldman ML, Newell JC, Shah DM. "Hepatic perfusion and splanchnic oxygen consumption in patients postinjury." J.Trauma 23 (1983): 836-843
 32. Heckbert, S. R., et al. "Outcome after hemorrhagic shock in trauma patients." J.Trauma 45.3 (1998): 545-49.
 33. Hildebrand, F., H. C. Pape, and C. Krettek. "[The importance of cytokines in the posttraumatic inflammatory reaction]." Unfallchirurg 108.10 (2005): 793-803.
 34. Hirano, K., et al. "Role of heme oxygenase-1 and Kupffer cells in the production of bilirubin in the rat liver." Arch.Histol.Cytol. 64.2 (2001): 169-78.
 35. Ignarro, L. J., et al. "Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical." Circ.Res. 61.6 (1987): 866-79.
 36. Jarrar, D., I. H. Chaudry, and P. Wang. "Organ dysfunction following hemorrhage and sepsis: mechanisms and therapeutic approaches (Review)." Int.J.Mol.Med. 4.6 (1999): 575-83.

37. Jarrar, D., et al. "Critical role of oxygen radicals in the initiation of hepatic depression after trauma hemorrhage." J.Trauma 49.5 (2000): 879-85.
38. Jarrar, D., et al. "Does early infusion of red blood cells after trauma and hemorrhage improve organ functions?" Crit Care Med. 28.10 (2000): 3498-504.
39. Kawada, N., et al. "The contraction of hepatic stellate (Ito) cells stimulated with vasoactive substances. Possible involvement of endothelin 1 and nitric oxide in the regulation of the sinusoidal tonus." Eur.J.Biochem. 213.2 (1993): 815-23.
40. Keel, M. and O. Trentz. "Pathophysiology of polytrauma." Injury 36.6 (2005): 691-709.
41. Keipert, P. E., et al. "Acute changes in systemic blood pressure and urine output of conscious rats following exchange transfusion with diaspirin-crosslinked hemoglobin solution." Transfusion 33.9 (1993): 701-08.
42. Keipert, P.E., Gomez CL, Gonzalez A, Mcdonald VW, Hess JR, Winslow RM. "Diaspirin cross-linked hemoglobin: tissue distribution and long-term excretion after exchange transfusion." J.Lab Clin.Med. 123 (1994): 701-711
43. Khadaroo, R. G., et al. "Impaired induction of IL-10 expression in the lung following hemorrhagic shock." Shock 22.4 (2004): 333-39.
44. King DR, Crohn SM, Proctor KG. "Resuscitation with a hemoglobin-based oxygen carrier after traumatic brain injury." J.Trauma 59 (2005): 553-560
45. Kmiec, Z. "Cooperation of liver cells in health and disease." Adv.Anat.Embryol.Cell Biol. 161 (2001): III-151.
46. Kobayashi, T., et al. "The protective role of Kupffer cells in the ischemia-reperfused rat liver." Arch.Histol.Cytol. 65.3 (2002): 251-61.
47. Kobelt, F., U. Schreck, and H. A. Henrich. "Involvement of liver in the decompensation of hemorrhagic shock." Shock 2.4 (1994): 281-88.
48. Koo, A. and I. Y. Liang. "Blood flow in hepatic sinusoids in experimental hemorrhagic shock in the rat." Microvasc.Res. 13.3 (1977): 315-25.
49. Krejci, V., et al. "Continuous measurements of microcirculatory blood flow in gastrointestinal organs during acute haemorrhage." Br.J.Anaesth. 84.4 (2000): 468-75.
50. Kubes, P. and D. N. Granger. "Nitric oxide modulates microvascular permeability." Am.J.Physiol 262.2 Pt 2 (1992): H611-H615.

51. Kuebler JF, Toth B, Rue LW, III, Wang P, Bland KI, Chauldry IH. "Differential fluid regulation during and after soft tissue trauma and hemorrhagic shock in males and proestrus females." Shock 2 (2003): 144-148
52. Kubulus, D., et al. "Influence of heme-based solutions on stress protein expression and organ failure after hemorrhagic shock." Crit Care Med. 33.3 (2005): 629-37.
53. Kubulus,D. et al. "Hemin arginate-induced heme oxygenase 1 expression improves liver microcirculation and mediates an anti-inflammatory cytokine response after hemorrhagic shock." Shock. 29 (2008): 583-590
54. Larsen R (1995) Anästhesie, Verlag U&S: 5.Auflage
55. Levine, J. H., et al. "Multiple organ failure: is it disappearing?" World J.Surg. 20.4 (1996): 471-73.
56. Levy, J. H. "The use of haemoglobin glutamer-250 (HBOC-201) as an oxygen bridge in patients with acute anaemia associated with surgical blood loss." Expert.Opin.Biol.Ther. 3.3 (2003): 509-17.
57. Lin CL, Kwan AL "Effects of endothelin-converting enzyme inhibitors on hemolysate-induced morphological changes and production of endothelin-1 in bovine cerebrovascular endothelial cells." J Cardiovasc Pharmacol. 36 (2000) Suppl 1:S160-2
58. Lin, G., et al. "Hemoglobin increases endothelin-1 in endothelial cells by decreasing nitric oxide." Biochem.Biophys.Res.Commun. 280.3 (2001): 824-30.
59. Lomas-Niera JL, Perl M, Chung CS, Ayala A. "Shock and hemorrhage: an overview of animal models." Shock 24 (2005) Suppl 1:33-9
60. Malarkey, D. E., et al. "New insights into functional aspects of liver morphology." Toxicol.Pathol. 33.1 (2005): 27-34.
61. Marzi, I. "Bedeutung der Leber für den Verlauf des SIRS nach Schock, Trauma und bei Sepsis. [The significance of the liver for the course of SIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrome) following shock, trauma and during sepsis]." Anesthesiol.Intensivmed.Notfallmed.Schmerzther. 29.1 (1994): 41-46.
62. McCuskey RS. "Microscopic studies for studying the microvasculature of internal organs, in *Physical Techniques in Biology and Medicine*

- Microvascular Technology." (Eds. Baker CH, Nastuk WL). Academic Press, New York, (1986): pp 247-64
63. Menger, M. D., I. Marzi, and K. Messmer. "In vivo fluorescence microscopy for quantitative analysis of the hepatic microcirculation in hamsters and rats." Eur.Surg.Res. 23.3-4 (1991): 158-69.
64. Menger, M. D. and H. A. Lehr. "Scope and perspectives of intravital microscopy--bridge over from in vitro to in vivo." Immunol.Today 14.11 (1993): 519-22.
65. Metzger HP, Schywalsky M. "Intraorgan differences of blood flow, oxygen supply glycogen content in the multilobular liver of normal and hemorrhagic rats." Int.J.Microcirc.Clin.Exp. 1 (1992): 67-83
66. Mizushima Y, Wang P, Jarrar D, Cioffi WG, Bland KI, Chaudry IH. "Cardiovascular and hepatocellular functions in male animals." Ann.Surg. 5 (2000): 673-679
67. Mondoro, T. H., et al. "Hemoglobin A0 and alpha-crosslinked hemoglobin (alpha-DBBF) potentiate agonist-induced platelet aggregation through the platelet thromboxane receptor." Artif.Cells Blood Substit.Immobil.Biotechnol. 26 (1998): 1-16.
68. Naito, M., et al. "Differentiation and function of Kupffer cells." Med.Electron Microsc. 37.1 (2004): 16-28.
69. Nunes, G., F. W. Blaisdell, and W. Margaretten. "Mechanism of hepatic dysfunction following shock and trauma." Arch.Surg. 100.5 (1970): 546-56.
70. Nuytinck, H. K., et al. "Whole-body inflammation in trauma patients. An autopsy study." Arch.Surg. 123.12 (1988): 1519-24.
71. Oda, M., H. Yokomori, and J. Y. Han. "Regulatory mechanisms of hepatic microcirculation." Clin.Hemorheol.Microcirc. 29.3-4 (2003): 167-82.
72. Ohlstein, E. H. and B. L. Storer. "Oxyhemoglobin stimulation of endothelin production in cultured endothelial cells." J.Neurosurg. 77.2 (1992): 274-78.
73. Olson, J. S., et al. "NO scavenging and the hypertensive effect of hemoglobin-based blood substitutes." Free Radic.Biol.Med. 36.6 (2004): 685-97.
74. Palmer, R. M., A. G. Ferrige, and S. Moncada. "Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor." Nature 327.6122 (1987): 524-26.

75. Paxian, M., et al. "Perflubron emulsion in prolonged hemorrhagic shock: influence on hepatocellular energy metabolism and oxygen-dependent gene expression." Anesthesiology 98.6 (2003): 1391-99.
76. Plevris JN, JAlan R, Bzeizi KI, Dollinger MM, Lee A, Garden OJ, Hayes PC. "Indocyanine green clearance reflects reperfusion injury following liver transplantation and is an early predictor of graft function." J.Hepatol. 30 (1999): 142-148
77. Rensing, H., et al. "Differential activation pattern of redox-sensitive transcription factors and stress-inducible dilator systems heme oxygenase-1 and inducible nitric oxide synthase in hemorrhagic and endotoxic shock." Crit Care Med. 29.10 (2001): 1962-71.
78. Rensing, H., et al. "Endothelin-1 and heme oxygenase-1 as modulators of sinusoidal tone in the stress-exposed rat liver." Hepatology 36.6 (2002): 1453-65.
79. Roumen, R. M., et al. "Cytokine patterns in patients after major vascular surgery, hemorrhagic shock, and severe blunt trauma. Relation with subsequent adult respiratory distress syndrome and multiple organ failure." Ann.Surg. 218.6 (1993): 769-76.
80. Sabaa N. et al., "Endothelin receptor-antagonism prevents hypoxia-induced mortality and morbidity in a mouse model of sickle-cell disease." J.Clin.Invest. 118 (2008): 1924-1933
81. Sato, M., S. Suzuki, and H. Senoo. "Hepatic stellate cells: unique characteristics in cell biology and phenotype." Cell Struct.Funct. 28.2 (2003): 105-12.
82. Saxena, R., et al. "Controlled safety study of a hemoglobin-based oxygen carrier, DCLHb, in acute ischemic stroke." Stroke 30.5 (1999): 993-96.
83. Schmid-Schonbein, G. W., et al. "The interaction of leukocytes and erythrocytes in capillary and postcapillary vessels." Microvasc.Res. 19.1 (1980): 45-70.
84. Schmidt, H. H. "NO., CO and .OH. Endogenous soluble guanylyl cyclase-activating factors." FEBS Lett. 307.1 (1992): 102-07.
85. Schneider, C. P., M. G. Schwacha, and I. H. Chaudry. "The role of interleukin-10 in the regulation of the systemic inflammatory response following trauma-hemorrhage." Biochim.Biophys.Acta 1689.1 (2004): 22-32.

86. Schultz, S. C., et al. "A role for endothelin and nitric oxide in the pressor response to diaspirin cross-linked hemoglobin." J.Lab.Clin.Med. 122.3 (1993): 301-08.
87. Seekamp, A., et al. "Cytokines and adhesion molecules in elective and accidental trauma-related ischemia/reperfusion." J.Trauma 44.5 (1998): 874-82.
88. Skalli, O., et al. "Alpha-smooth muscle actin, a differentiation marker of smooth muscle cells, is present in microfilamentous bundles of pericytes." J.Histochem.Cytochem. 37.3 (1989): 315-21.
89. Sloan, E. P., et al. "Diaspirin cross-linked hemoglobin (DCLHb) in the treatment of severe traumatic hemorrhagic shock: a randomized controlled efficacy trial." JAMA 282.19 (1999): 1857-64.
90. Smani Y, Faivre B, udonnet-Blaise S, Labrude P, Vingeron C. "Hemoglobin-based oxygen carrier distribution inside vascular wall and arterial pressure evolution: is there a relationship?" Eur.Surg.Res. 37 (2005): 1-8
91. Smedsrod, B. "Clearance function of scavenger endothelial cells." Comp Hepatol. 3 Suppl 1 (2004): S22.
92. Spiegel HU, Hauss J, Schonleben K, Bunte H. "Theory and methods of local tissue-pO₂ monitoring in experimental angiology." Angiology 1 Pt 1(1987): 1-12
93. Sprung, J., et al. "The use of bovine hemoglobin glutamer-250 (Hemopure) in surgical patients: results of a multicenter, randomized, single-blinded trial." Anesth.Analg. 94.4 (2002): 799-808, table.
94. Suematsu, M., Y. Wakabayashi, and Y. Ishimura. "Gaseous monoxides: a new class of microvascular regulator in the liver." Cardiovasc.Res 32.4 (1996): 679-86.
95. Suematsu, M., et al. "Intravital and electron microscopic observation of Ito cells in rat hepatic microcirculation." Microvasc.Res. 46.1 (1993): 28-42.
96. Takei, Y., et al. "Leukocyte adhesion and cell death following orthotopic liver transplantation in the rat." Transplantation 51.5 (1991): 959-65.
97. Tilney, N. L., G. L. Bailey, and A. P. Morgan. "Sequential system failure after rupture of abdominal aortic aneurysms: an unsolved problem in postoperative care." Ann.Surg. 178.2 (1973): 117-22.

98. Uhlmann S, Uhlmann D, Spiegel HU. "Evaluation of hepatic microcirculation by in vivo microscopy." J.Invest Surg. 4 (1999): 179-193
99. Ulvik, A., et al. "Multiple organ failure after trauma affects even long-term survival and functional status." Crit Care 11.5 (2007): R95.
100. Vollmar B, Corleta O, Habazettl H, Kreimeier U, Menger MD. "Delay phenomenon of the jejunum. Studies of nutritional blood supply and oxygen supply of the jejunum of the rabbit." Zentralbl.Chir 9 (1992): 495-501
101. Vollmar, B., et al. "Microcirculation of the liver in hemorrhagic shock in the rat and its significance for energy metabolism and function." Zentralbl.Chir 118.4 (1993): 218-25.
102. Vollmar, B., et al. "Hepatic microcirculatory perfusion failure is a determinant of liver dysfunction in warm ischemia-reperfusion." Am.J.Pathol. 145.6 (1994): 1421-31.
103. Vollmar, B., et al. "Impact of leukocyte-endothelial cell interaction in hepatic ischemia-reperfusion injury." Am.J.Physiol 267.5 Pt 1 (1994): G786-G793.
104. Vollmar, B. "[Microcirculation and oxygen supply to the liver in hemorrhagic shock and sepsis]." Anesthesiol.Intensivmed.Notfallmed.Schmerzther. 30 Suppl 1 (1995): S52-S54.
105. Wake, K. "Karl Wilhelm Kupffer And His Contributions To Modern Hepatology." Comp Hepatol. 3 Suppl 1 (2004): S2.
106. Wang, P., J. G. Hauptman, and I. H. Chaudry. "Hemorrhage produces depression in microvascular blood flow which persists despite fluid resuscitation." Circ.Shock 32.4 (1990): 307-18.
107. Wang, P., J. G. Hauptman, and I. H. Chaudry. "Hepatocellular dysfunction occurs early after hemorrhage and persists despite fluid resuscitation." J.Surg.Res. 48.5 (1990): 464-70.
108. Wang, P., et al. "Adequate crystalloid resuscitation restores but fails to maintain the active hepatocellular function following hemorrhagic shock." J.Trauma 31.5 (1991): 601-07.
109. WIGGERS, H. C. and R. C. INGRAHAM. "HEMORRHAGIC SHOCK: DEFINITION AND CRITERIA FOR ITS DIAGNOSIS." J.Clin.Invest 25.1 (1946): 30-36.
110. Winslow, R. M. "alphaalpha-crosslinked hemoglobin: was failure predicted by preclinical testing?" Vox Sang. 79.1 (2000): 1-20.

111. Winslow, R. M. "Current status of blood substitute research: towards a new paradigm." J.Intern.Med. 253.5 (2003): 508-17.
112. Wisse, E., et al. "Structure and function of sinusoidal lining cells in the liver." Toxicol.Pathol. 24.1 (1996): 100-11.
113. Wortha HP, Adams J. "Die Rolle von Modellen in der Wissenschaft. " Einführung in die medizinische Biometrie (Ed. Adams J.), Gustav Fischer, Jena (1992) pp. 18-19
114. Zhang, J. X., W. Pegoli, and M. G. Clemens. "Endothelin-1 induces direct constriction of hepatic sinusoids." Am.J.Physiol. 266.4 Pt 1 (1994): G624-G632.

8. Publikationen

1. HEMIN ARGINATE-INDUCED HEME OXYGENASE 1 EXPRESSION IMPROVES LIVER MICROCIRCULATION AND MEDIATES AN ANTI-INFLAMMATORY CYTOKINE RESPONSE AFTER HEMORRHAGIC SHOCK
Darius Kubulus, Alexander Mathes, Sascha Pradarutti, Alexander Raddatz, Jochen Heiser, Daphne Pavlidis, Beate Wolf, Inge Bauer, Hauke Rensing
SHOCK 29(5) pp. 583-590, 2008
2. ENDOTHELIN-1 CONTRIBUTES TO HEMOGLOBIN GLUTAMER-200-MEDIATED HEPATOCELLULAR DYSFUNKTION AFTER HEMORRHAGIC SHOCK
Darius Kubulus, Alexander Mathes, Erik Reus, Sascha Pradarutti, Daphne Pavlidis, Jan-Tobias Thierbach, Jochen Heiser, Beate Wolf, Inge Bauer, Hauke Rensing
SHOCK 32(2) pp. 179-89, 2009

9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen ganz herzlich bedanken, ohne deren Unterstützung die Durchführung dieser Forschungsarbeit nicht möglich gewesen wäre.

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

Außerdem bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Hauke Rensing, für das Heranführen ans Thema dieser Dissertationsarbeit und dafür, dass ich im von Ihm geleiteten Labor diese Arbeit durchführen konnte.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn PD Dr. med. Darius Kubulus bedanken, dessen Betreuung während der gesamten Arbeit hervorragend war und der mir immer helfend zur Seite stand. Vielen Dank auch an Frau PD Dr. rer.-nat. Inge Bauer sowie Frau Beate Wolf für die tägliche Hilfe und Zusammenarbeit bei der Laborarbeit. Nicht zu vergessen Herrn Dr. med. Jochen Heiser und Frau Lena Jellestad sowie Herrn Dr. med. Sascha Pradarutti, ohne die die langen Stunden im Labor deutlich länger gewesen wären.

Zuletzt danke ich noch meiner Familie und meinen Freunden, die mich stets in meinem Leben unterstützen und bekräftigen.

10. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Daphne Elisabeth Pavlidis
Anschrift: Eifelstraße 25, 50677 Köln
Geburtsdatum: 15.11.1983
Geburtsort: Frankfurt/Main
Nationalität: deutsch, griechisch
Familienstand: ledig

Schulbildung, Studium:

1989-2002 Grundschule und Gymnasium Deutsche Schule Athen,
Griechenland, Abitur 2002
2002-2008 Universität des Saarlandes, medizinische Fakultät Homburg,
Studium der Humanmedizin,
Approbation als Ärztin 11/2008

Klinische Erfahrung, Berufstätigkeit als Ärztin:

08/2007-12/2007 Kantonsspital Bruderholz, Schweiz, chirurgisches PJ-Tertial
12/2007-03/2008 Univerisätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar, Klinik für
Kinderheilkunde, Wahltertial PJ
04/2008-07/2008 Univerisätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar, Klinik für
Innere Medizin II und III, internistisches PJ Tertial
Seit 12/2008 Uniklinik Köln, Klinik und Poliklinik für Gefäßchirurgie,
Assistenzärztin in Weiterbildung zum Facharzt für
Gefäßchirurgie