

5. Ergebnisse

5.1. Quantifizierung der Stressgenexpression

5.1.1. Western Blot

Mit Hilfe der Westernblotanalyse (Abb. 8) wurde die organspezifische Genexpression der HO-1 und HSP 70 24 Stunden nach Vorbehandlung mit DCLHb, Hämarginat oder Ringerlaktat (Vehikel) analysiert.

Die Vorbehandlung mit DCLHb und HAR, nicht aber mit Ringerlaktat (Vehikel) induzierte dosisabhängig die HO-1 Proteinexpression in der Leber, Niere, Herz, Lunge und Aorta (Abb. 8).

Die Vorbehandlung mit DCLHb, sowie die Vorbehandlung mit HAR in niedrigen (5mg/kg KG) und mittleren Dosierungen (25mg/kg KG) induzierte keine HSP 70 Proteinexpression in der Leber. Eine Hochdosisvorbehandlung mit HAR (75mg/kg KG) führte zu einer HSP 70 Proteinexpression im Lebergewebe, wobei nur ein Versuchstier diese Vorbehandlung überlebte (Abb. 9).

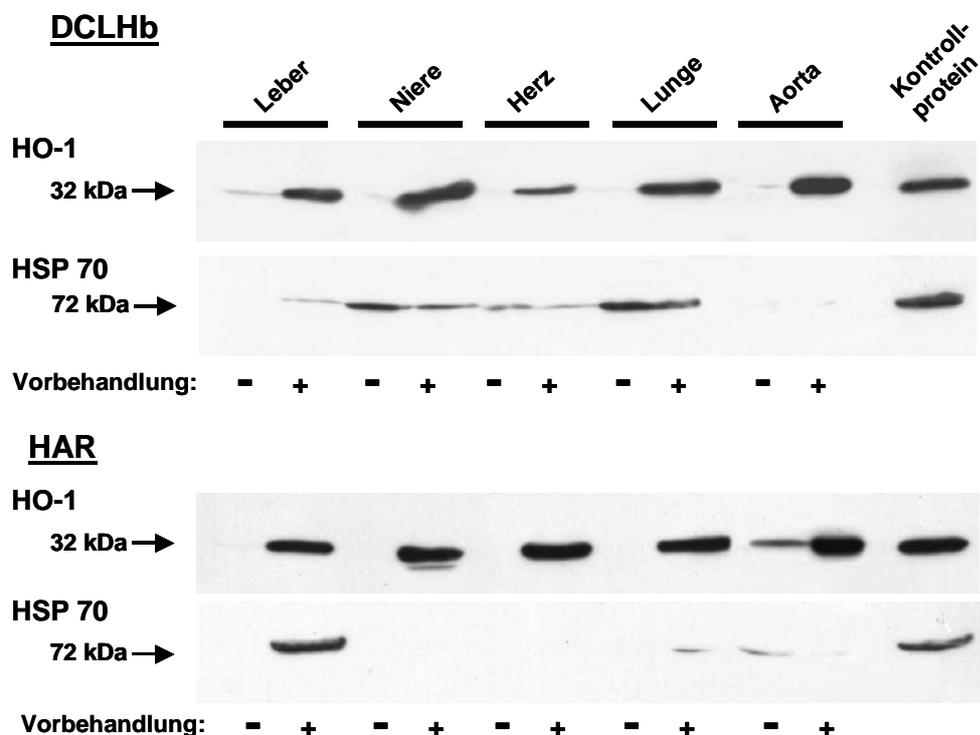


Abb.8: Exemplarische Darstellung der HO-1 und HSP 70 Stressproteinexpression in Leber, Niere, Herz, Lunge und Aorta 24 Stunden nach Vorbehandlung mit DCLHb (3g/kg KG) und HAR (75mg/kg KG)

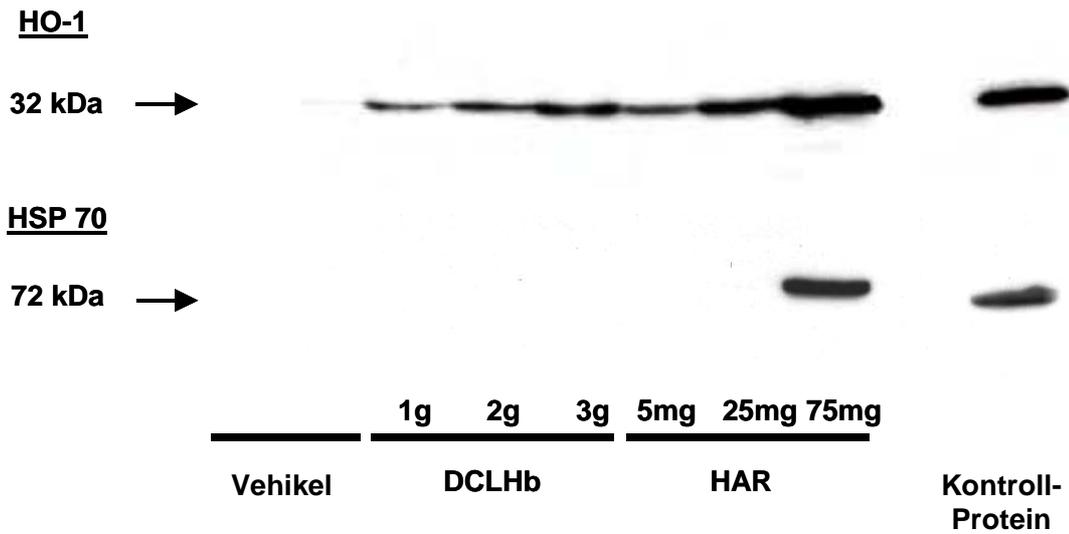


Abb.9: Exemplarische Darstellung der dosisabhängigen HO-1 und HSP 70 Stressproteinexpression im Lebergewebe 24 Stunden nach Vorbehandlung mit Vehikel, DCLHb und HAR

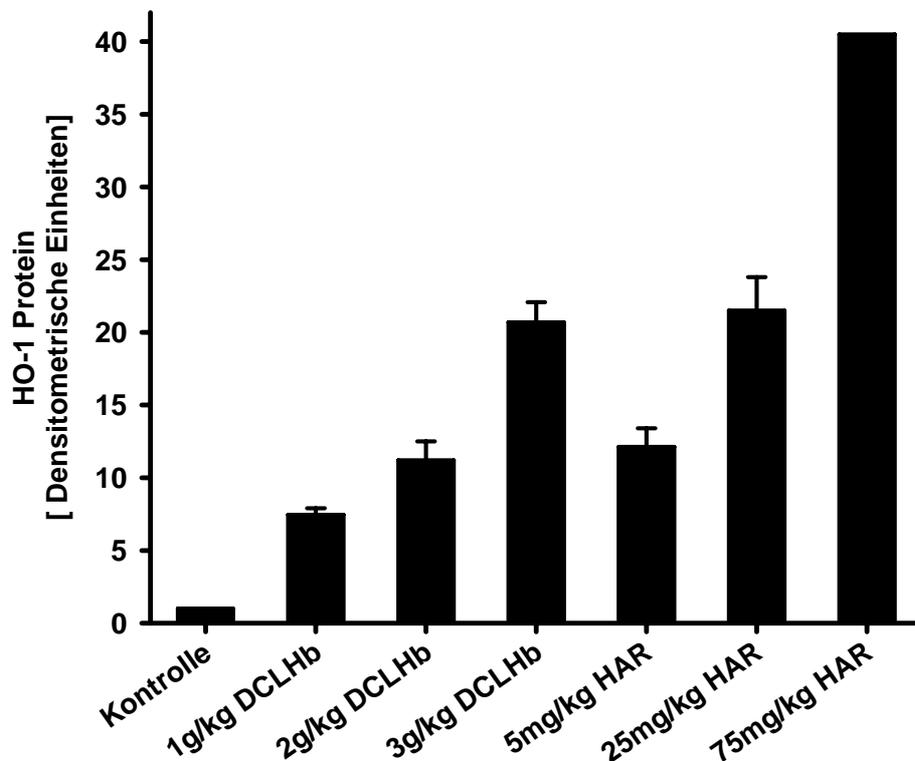


Abb.10: Densitometrische Analyse der HO-1 Stressproteinexpression im Lebergewebe 24 Stunden nach Vorbehandlung mit DCLHb und HAR im Vergleich zu unbehandelten Tieren (Kontrolle)

5.1.2. Gesamtbilirubin

Im Vergleich zu unbehandelten Tieren (Kontrolle) führte die Vorbehandlung mit DCLHb und HAR zu einer dosisabhängigen Zunahme der Gesamtbilirubinkonzentration im Serum nach 24 Stunden (Abb. 11).

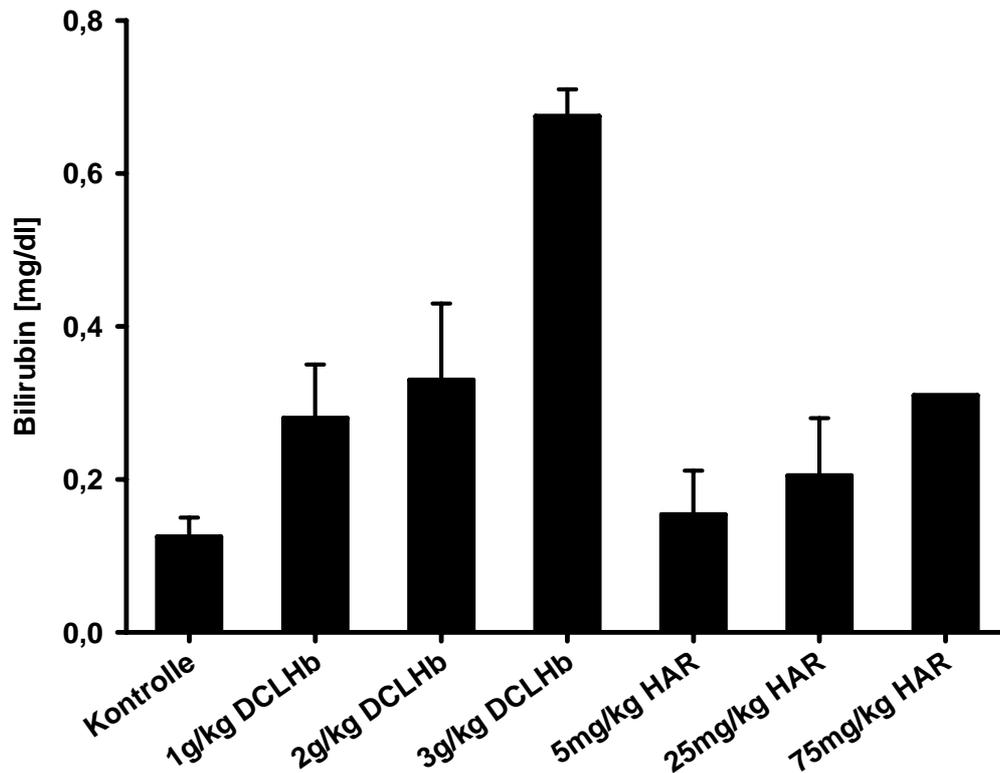


Abb.11: Dosisabhängige Zunahme der Gesamtbilirubinkonzentration im Serum 24 Stunden nach Vorbehandlung mit DCLHb bzw. Häminarginat im Vergleich zu unbehandelten Tieren (Kontrolle)

5.2. Schockversuche

5.2.1. Makrohämodynamik

5.2.1.1. Schockblutvolumen und Dekompensationszeitpunkt

Unter dem Schockblutvolumen bezeichnet man das Blutvolumen, welches zur Schockinduktion und Aufrechterhaltung eines mittleren arteriellen Blutdrucks (MAP) von 35 ± 5 mmHg entnommen wurde.

Die Niedrig- und die Hochdosisvorbehandlung mit DCLHb (1g/kg bzw. 3g/kg KG) bewirkte keine Veränderung des mittleren Schockvolumens im Vergleich zur Kontrollgruppe (Vehikel).

Die HAR-Vorbehandlung resultierte in einer signifikanten Zunahme des mittleren Schockvolumens im Vergleich zur Vehikel- als auch zu DCLHb-Gruppen (Abb. 12). Die Blockade der HO-1 Aktivität durch SnMP-IX nach HAR-Vorbehandlung reduzierte signifikant das Schockvolumen im Vergleich zur unblockierten HAR-Vorbehandlung.

Die Blockade der HO-1 Aktivität durch SnMP-IX nach Ringerlaktat-Vorbehandlung führte zu keiner signifikanten Veränderung des Schockblutvolumens im Vergleich zu ungeblockten Gruppen (Abb.12).

Der Zeitpunkt, ab dem eine beginnende Kreislaufinstabilität eine Volumengabe notwendig machte um den mittleren arteriellen Blutdruck bei 35 ± 5 mmHg zu stabilisieren, wurde als Dekompensationszeitpunkt definiert.

Die Niedrig –und die Hochdosisvorbehandlung mit DCLHb (1g/kg bzw. 3g/kg KG) bewirkte ein signifikant früheres Auftreten des Dekompensationszeitpunktes verglichen zur Kontrollgruppe (Vehikel), wobei ein dosisabhängiger Effekt verzeichnet wurde.

Die HAR-Vorbehandlung führte tendenziell zu einem verspäteten Auftreten des Dekompensationszeitpunktes im Vergleich zu den Vehikeln. Die Blockade der HO-1 Aktivität durch SnMP-IX nach HAR-Vorbehandlung führte zu einer Angleichung des Dekompensationszeitpunktes zu den Vehikeln.

Die Blockade der HO-1 Aktivität durch SnMP-IX nach Ringerlaktat-Vorbehandlung (Vehikel) führte zu keiner Veränderung des Dekompensationszeitpunktes im Vergleich zu ungeblockten Gruppen (Abb. 13).

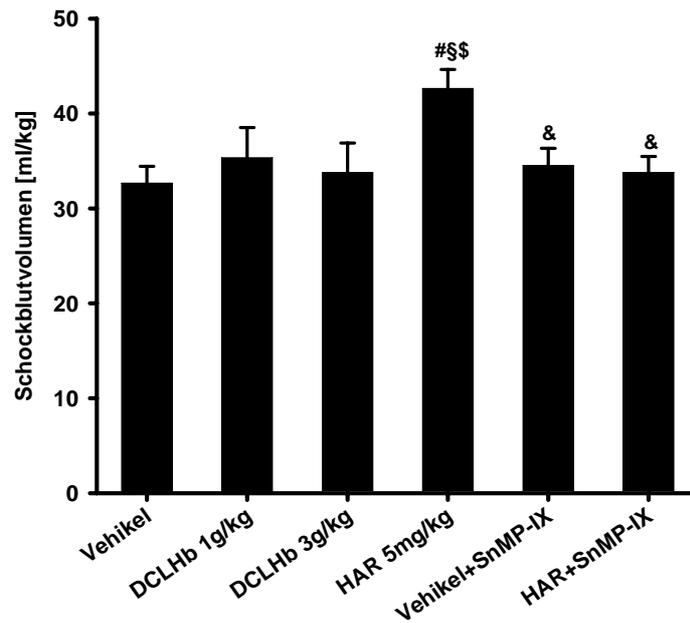


Abb.12: Entnommenes Blutvolumen zur Schockinduktion und Aufrechterhaltung eines mittleren arteriellen Blutdrucks von 35 ± 5 mmHg (Schockblutvolumen)

(# $p < 0,05$ vs. Vehikel, § $p < 0,05$ vs. DCLHb 1g/kgKG, \$ $p < 0,05$ vs. DCLHb 3g/kgKG, & $p < 0,05$ vs. HAR)

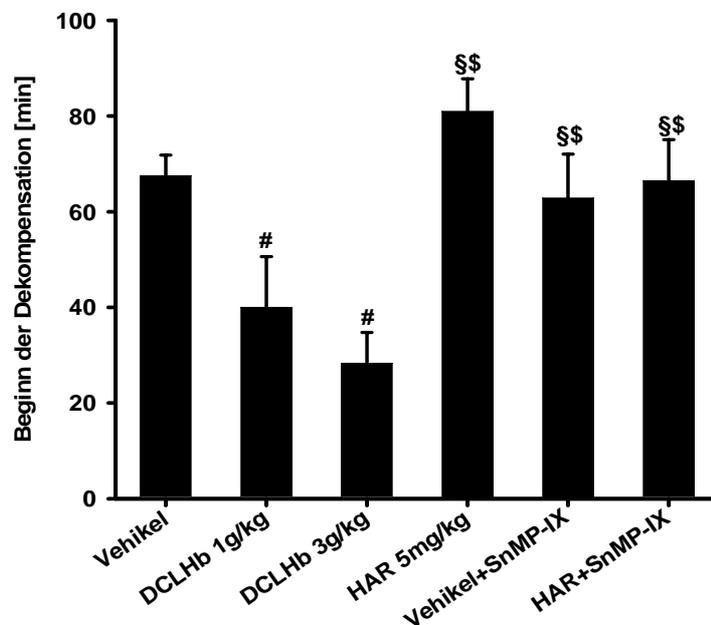


Abb.13: Zeitpunkt der beginnenden Kreislaufinstabilität während der Schockphase (Dekompensationszeitpunkt) (# $p < 0,05$ vs. Vehikel, § $p < 0,05$ vs. DCLHb 1g/kg KG,

\$ $p < 0,05$ vs. DCLHb 3g/kg KG)

5.2.1.2. Mittlerer arterieller Druck

1 Stunde Schock / 5 Stunden Reperfusion:

Der Ausgangsblutdruck und der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) während der Schockphase unterschieden sich nicht signifikant zwischen den untersuchten Gruppen.

Die mit DCLHb niedrig- und hochdosisvorbehandelten Gruppen (1g/kg bzw. 3g/kg KG) erreichten nach Retransfusion von 60% des Schockblutvolumens nicht den Ausgangsblutdruck und wiesen einen niedrigeren MAP als die Vehikel- und HAR-Gruppe auf. Dieser erholte sich während der Reperfusion, wobei die Ausgangswerte während der gesamten Untersuchungszeit – insbesondere nach Hochdosisvorbehandlung – nicht erreicht wurden.

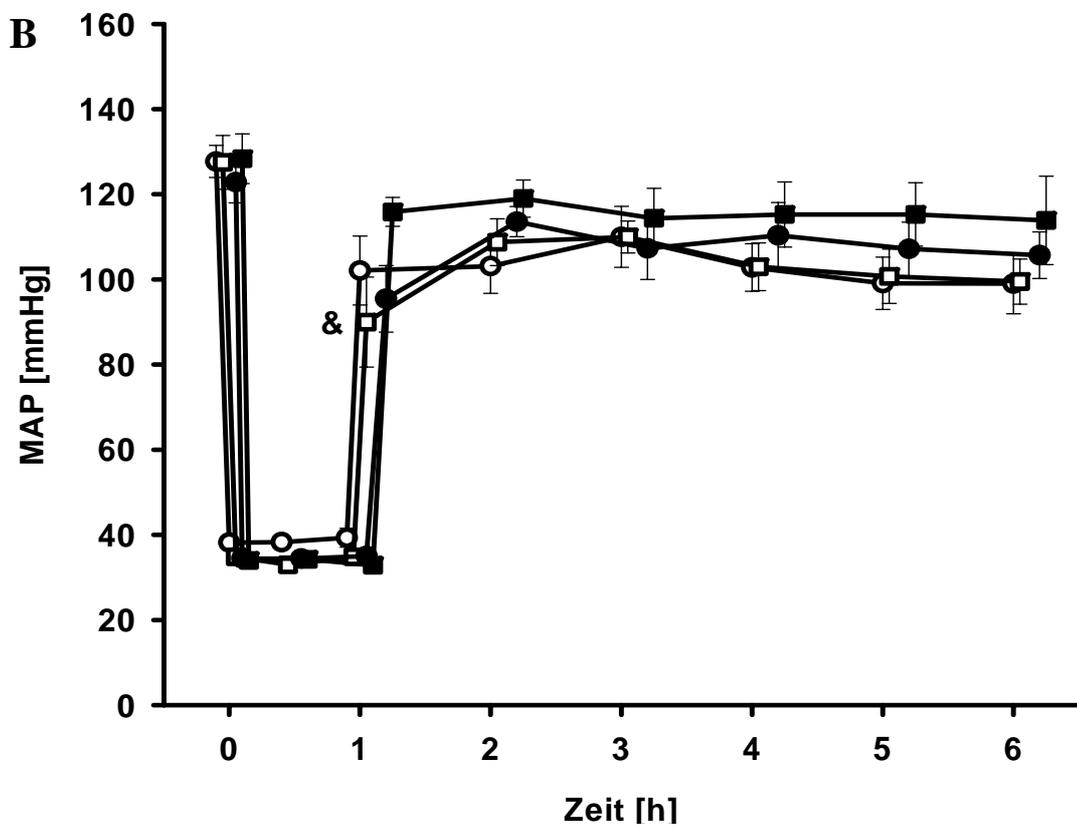
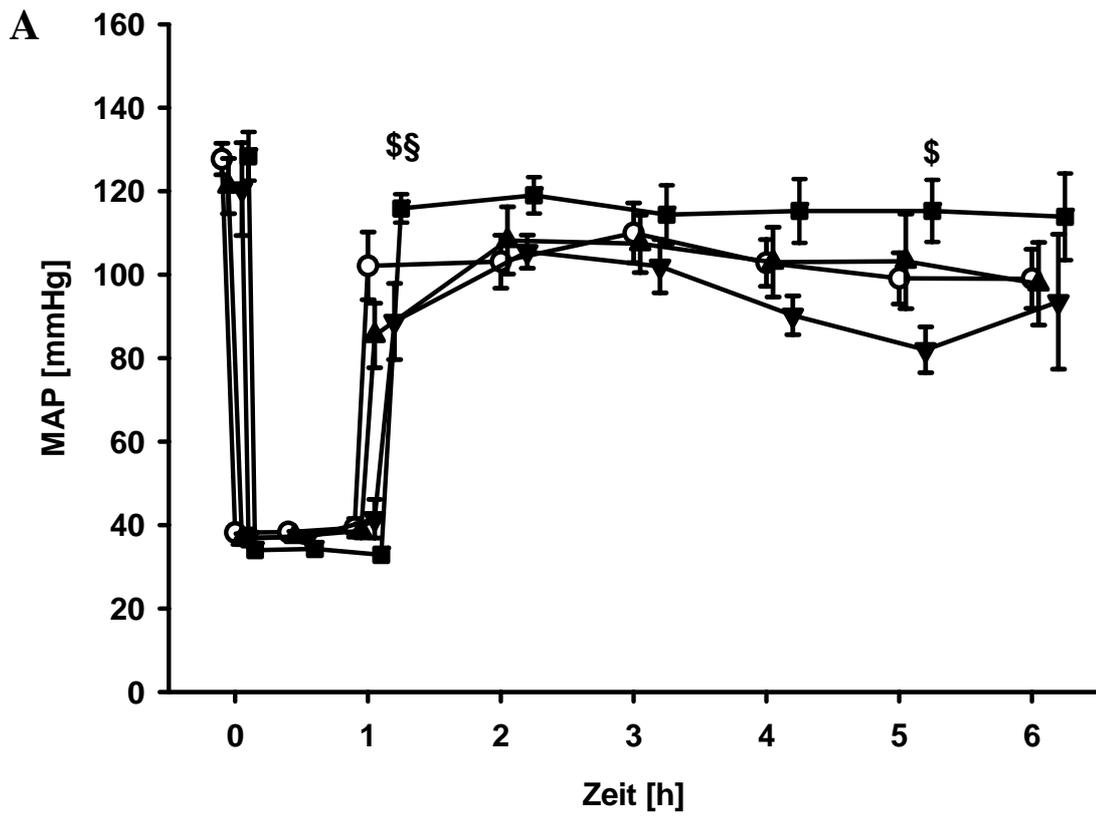
Die mit HAR vorbehandelten Tiere zeigten einen raschen Wiederanstieg des MAP bis auf Ausgangswerte mit nachfolgendem stabilen Druckverlauf während der gesamten Untersuchungszeit, wobei höhere MAP-Werte erreicht wurden im Vergleich zu Vehikel- und DCLHb-Gruppen. Die Blockade der HO-1 Aktivität durch SnMP-IX nach HAR-Vorbehandlung führte zu einer Angleichung des MAP zu den Vehikeln, wobei außer direkt nach Retransfusion von 60% des Schockblutvolumens keine signifikanten Unterschiede festgestellt wurden.

Die Blockade der HO-1 Aktivität durch SnMP-IX nach Ringerlaktat-Vorbehandlung (Vehikel) führte zu keiner signifikanten Veränderung des MAP im Vergleich zu unblockierten Gruppen.

Abb. 14:

A: Verlauf des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAP) während der Untersuchung mit 1 Stunde Schock und 5 Stunden Reperfusion. Vehikel (—○—), DCLHb 1g/kg KG (—▲—), DCLHb 3g/kg KG (—▼—) und HAR (—■—) (§ $p < 0,05$ vs. DCLHb 1g/kgKG, § $p < 0,05$ vs. DCLHb 3g/kgKG).

B: Blockade der HO-Aktivität mit SnMP-IX vor Schockbeginn (Vehikel+SnMP-IX—●—, HAR+SnMP-IX—□—) im Vergleich zu den entsprechenden unblockierten Gruppen (Vehikel —○—, HAR —■—) (& $p < 0,05$ vs. HAR).



2 Stunden Schock / 4 Stunden Reperfusion:

Der Ausgangsblutdruck und der MAP während der Schockphase unterschieden sich nicht signifikant zwischen den untersuchten Gruppen. Die Schockdauer von 2 Stunden führte in allen Gruppen, vor allem jedoch nach DCLHb-Vorbehandlung zu einer deutlichen Dämpfung des MAP-Anstieges nach Retransfusion von 60% des Schockblutvolumens.

Während der weiteren Reperfusionsphase wiesen die mit DCLHb Niedrig- und Hochdosis vorbehandelten Gruppen (1g/kg bzw. 3g/kg KG) trotz Volumentherapie persistierend niedrige MAP-Werte im Vergleich zur Vehikel-, insbesondere jedoch zur HAR-Gruppe auf.

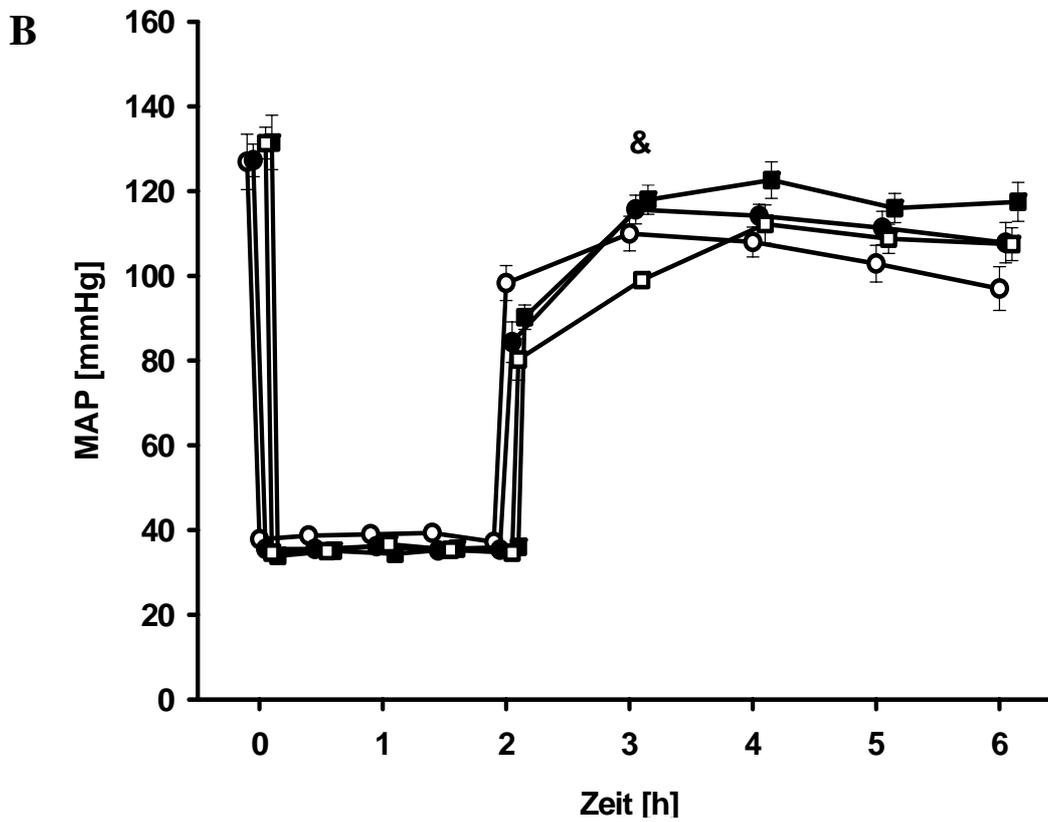
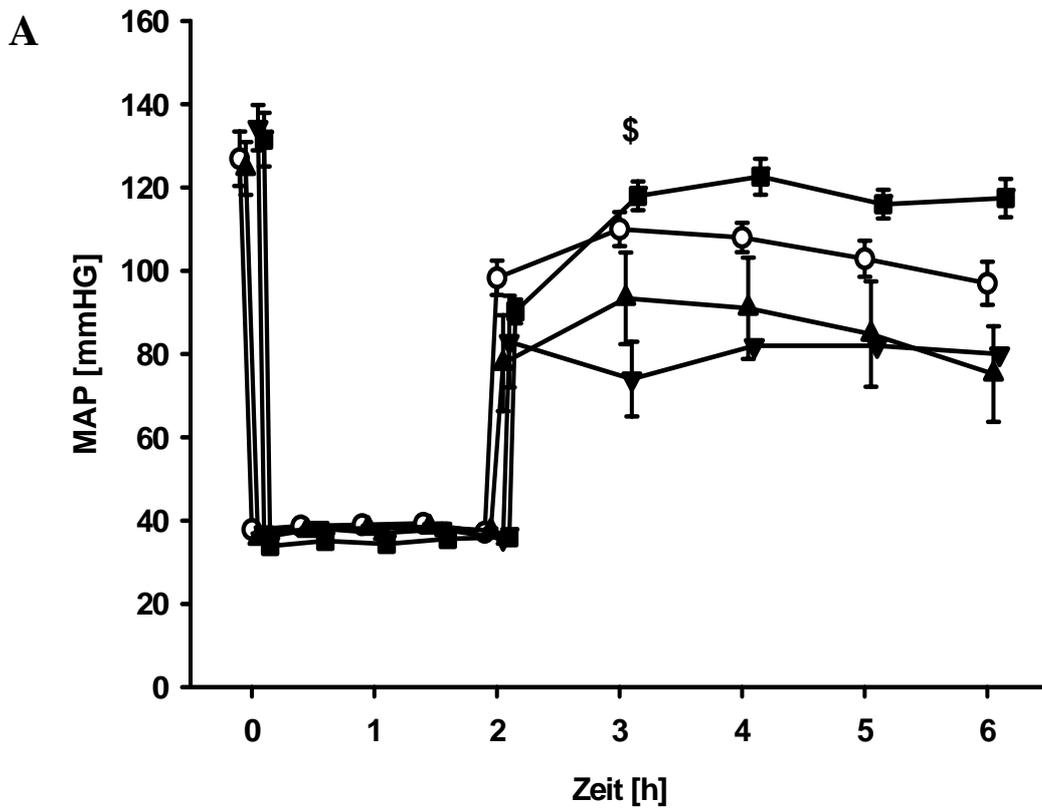
Die mit HAR vorbehandelten Tiere zeigten ab der 2. Stunde nach Reperfusionsbeginn einen Wiederanstieg des MAP bis auf Ausgangswerte mit nachfolgendem stabilen Druckverlauf während der gesamten Untersuchungszeit, wobei höhere MAP-Werte erreicht wurden im Vergleich zu Vehikel- und insbesondere DCLHb-Gruppen. Die Blockade der HO-1 Aktivität durch SnMP-IX nach HAR-Vorbehandlung führte zu einer Angleichung des MAP zu den Vehikeln, wobei keine signifikanten Unterschiede festgestellt wurden.

Die Blockade der HO-1 Aktivität durch SnMP-IX nach Ringerlaktat-Vorbehandlung (Vehikel) führte zu keiner signifikanten Veränderung des MAP im Vergleich zu ungeblockten Gruppen.

Abb. 15:

A: Verlauf des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAP) während der Untersuchung mit 2 Stunde Schock und 4 Stunden Reperfusion. Vehikel (—○—), DCLHb 1g/kg KG (—▲—), DCLHb 3g/kg KG (—▼—) und HAR (—■—) (§ $p < 0,05$ vs. DCLHb 1g/kgKG, § $p < 0,05$ vs. DCLHb 3g/kgKG).

B: Blockade der HO-Aktivität mit SnMP-IX vor Schockbeginn (Vehikel+SnMP-IX —●—, HAR+SnMP-IX —□—) im Vergleich zu den entsprechenden unblockierten Gruppen (Vehikel —○—, HAR —■—) (& $p < 0,05$ vs. HAR).



5.2.1.3 Hämatokrit, Säure-Base-Haushalt und Blutgase

Die DCLHb-vorbehandelten Tiere (1g/kg und 3 g/kg KG) wiesen signifikant höhere Ausgangs-Hämatokritwerte im Vergleich zu Vehikel- und HAR-Gruppen auf. Im Verlauf der Untersuchung führte die Blutentnahme während der Schockphasen (1 und 2 Stunden) zu einer deutlichen Abnahme des Hämatokritwertes in allen Gruppen sowie am Ende der Reperfusionphase zu einem Wiederanstieg der Werte, wobei die Ausgangswerte nicht erreicht wurden (Abb.16).

Die Ausgangswerte der darüber hinaus untersuchten Parameter Laktat, pH, Basenabweichung (BE), arterieller Sauerstoffpartialdruck ($p\text{aO}_2$) und arterieller Kohlendioxidpartialdruck ($p\text{aCO}_2$) unterschieden sich nicht signifikant zwischen den Gruppen.

Der hämorrhagische Schock (1 bzw. 2 Stunden) führte zu einer Zunahme des Laktats als Indikator der anaeroben Stoffwechsellage in allen Gruppen mit nachfolgender Normalisierung der Werte am Ende der Reperfusionphase. Hierbei zeigten die HAR-vorbehandelten Gruppen am Ende der jeweiligen Schockdauer signifikant niedrigere Laktatwerte im Vergleich zu DCLHb-vorbehandelten Gruppen (1 bzw. 3 g/kg KG) und nach 2 Stunden Schock auch signifikant niedrigere Werte im Vergleich zu Vehikel-Gruppe (Abb.16).

Als Folge der Schock-induzierten Azidose führte der hämorrhagische Schock (1 bzw. 2 Stunden) zur kompensatorischen Hyperventilation mit Abfall des $p\text{aCO}_2$ in allen Gruppen mit nachfolgender Normalisierung der Werte am Ende der Reperfusionphase, wobei keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt wurden (Daten nicht präsentiert).

Entsprechend der Hyperventilation führte der hämorrhagische Schock (1 bzw. 2 Stunden) zu einem Anstieg des $p\text{aO}_2$ in allen Gruppen mit nachfolgender Normalisierung der Werte am Ende der Reperfusionphase. Hierbei zeigten die HAR-vorbehandelten Gruppen am Ende der jeweiligen Schockdauer signifikant

5. Ergebnisse

höhere paO_2 -Werte im Vergleich zu DCLHb-vorbehandelten Gruppen (1 bzw. 3 g/kg KG) (Abb.16).

Die Blockade der HO-1 Aktivität durch SnMP-IX nach Ringerlaktat- (Vehikel) bzw. HAR-Vorbehandlung führte zu keiner signifikanten Veränderung der untersuchten Parameter im Vergleich zu ungeblockten Gruppen (Daten nicht präsentiert).

4. Ergebnisse

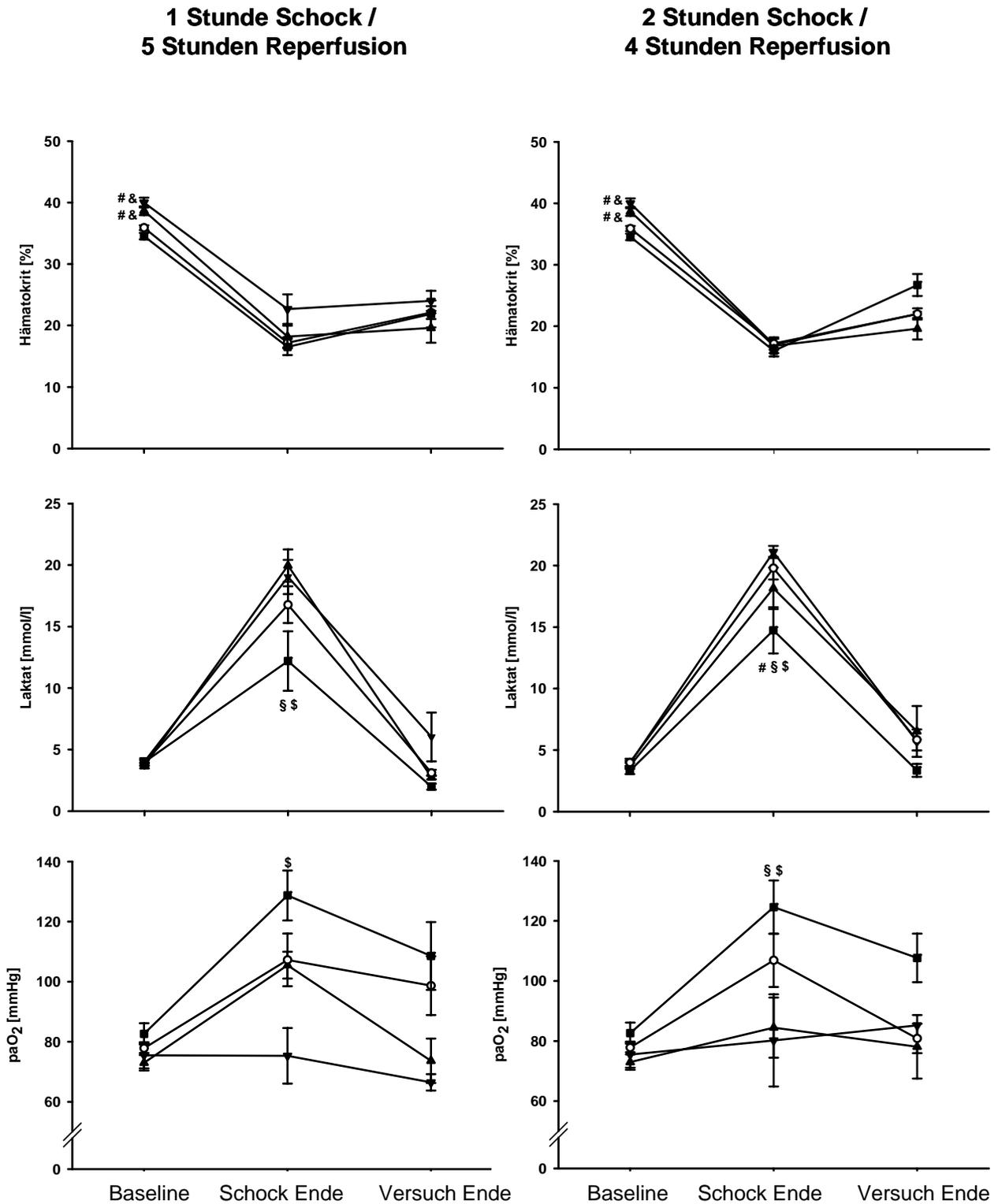


Abb.16: Blutgasanalyse im Verlauf der Untersuchung mit Darstellung von Hämatokrit, Laktat und paO₂. Vehikel (—○—), DCLHb 1g/kg KG (—▲—), DCLHb 3g/kg KG (—▼—), HAR (—■—) (# p<0,05 vs. Vehikel, § p<0,05 vs. DCLHb 1g/kgKG, \$ p<0,05 vs DCLHb 3g/kgKG, & p<0,05 vs. HAR)

5.2.2. Organdysfunktion

5.2.2.1. Serum-Leberenzyme

Der hämorrhagische Schock (1 bzw. 2 Stunden) mit anschließender Reperfusion (5 bzw. 4 Stunden) führte zu einem signifikanten Anstieg der Serumenzyme Alanin-Aminotransferase (ALT), Aspartat-Aminotransferase (AST) und Glutamat-Dehydrogenase (GLDH) als Marker des hepatozellulären Schadens in allen Gruppen im Vergleich zu unbehandelten Tieren (Kontrolle), wobei nach 2 Stunden Schock und 4 Stunden Reperfusion deutlich höhere Werte erreicht wurden. Obwohl tendenziell vereinzelt niedrigere Enzymanstiege nach HAR-Vorbehandlung festgestellt wurden ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Schock-behandelten Gruppen (Abb.17).

Die Blockade der HO-1 Aktivität durch SnMP-IX nach Ringerlaktat- (Vehikel) bzw. HAR-Vorbehandlung führte zu keiner weiteren signifikanten Veränderung der Serum-Leberenzyme.

5. Ergebnisse

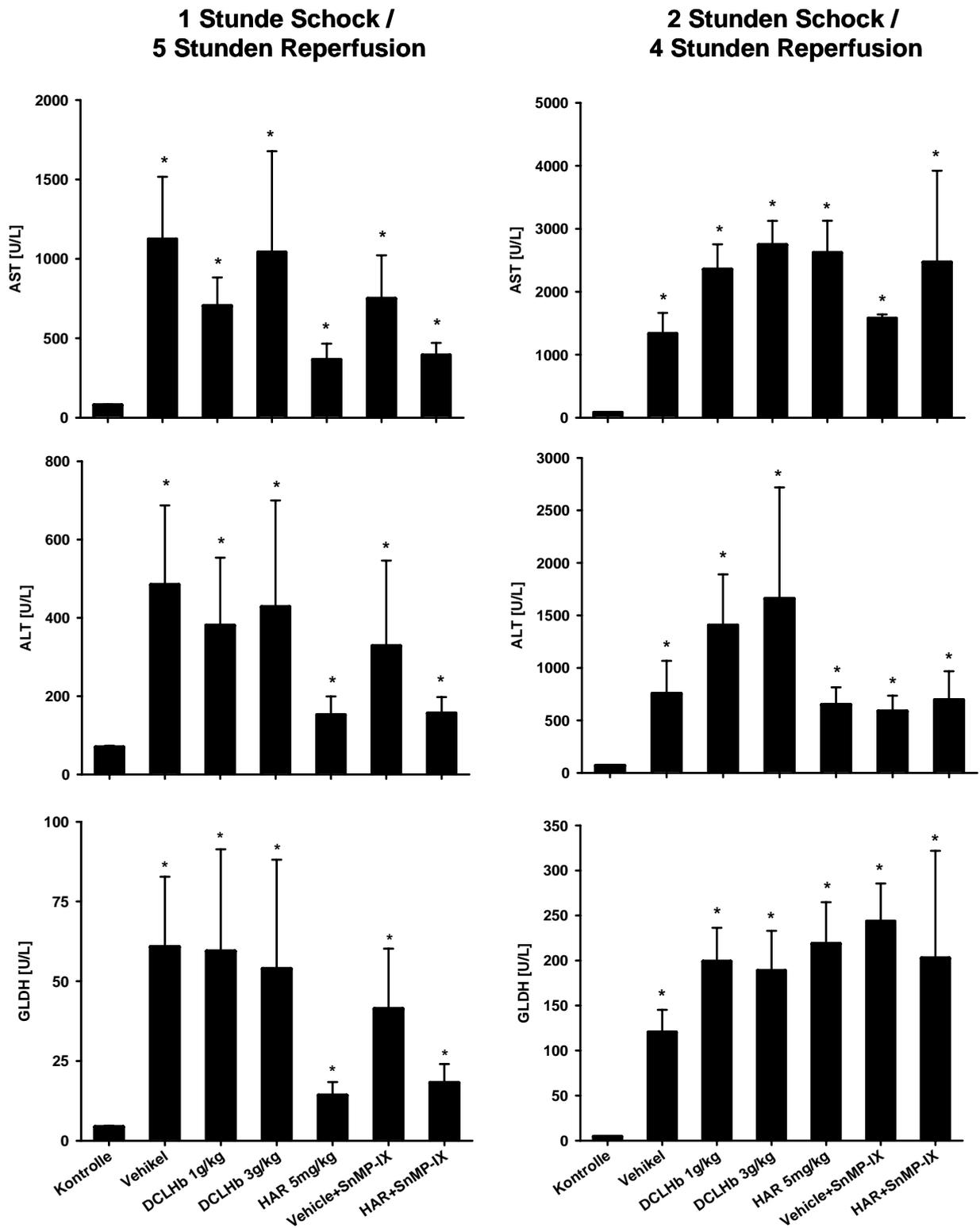


Abb.17: Serum-Aktivität der Leberenzyme AST, ALT und GLDH nach der entsprechenden Schock- und Reperfusionsdauer im Vergleich zu unbehandelten Tieren (Kontrolle) (* $p < 0,05$ vs. Kontrolle)

5.2.2.2. ATP-Gehalt im Lebergewebe

Der hämorrhagische Schock (1 bzw. 2 Stunden) mit anschließender Reperfusion (5 bzw. 4 Stunden) führte zu einem signifikanten Abfall des Adenosin-Triphosphat (ATP)-Gehaltes im Lebergewebe in allen Gruppen im Vergleich zu unbehandelten Tieren (Kontrolle).

Die DCLHb-vorbehandelten Gruppen wiesen darüber hinaus einen noch niedrigeren ATP-Gehalt als Vehikel-Gruppen, insbesondere nach 2 Stunden Schock und 4 Stunden Reperfusion auf.

Die HAR-vorbehandelten Gruppen zeigten einen tendenziell höheren ATP-Gehalt im Vergleich zu Vehikel-, insbesondere zu DCLHb-Gruppe nach 2 Stunden Schock und 4 Stunden Reperfusion.

Die Blockade der HO-1 Aktivität durch SnMP-IX nach HAR-Vorbehandlung führte zu einem nicht signifikanten Abfall des ATP-Gehaltes im Vergleich zu den jeweiligen ungeblockten Gruppen.

Die Blockade der HO-1 Aktivität durch SnMP-IX nach Ringerlaktat-Vorbehandlung (Vehikel) führte zu keiner signifikanten Veränderung des ATP-Gehaltes im Vergleich zu den jeweiligen ungeblockten Gruppen.

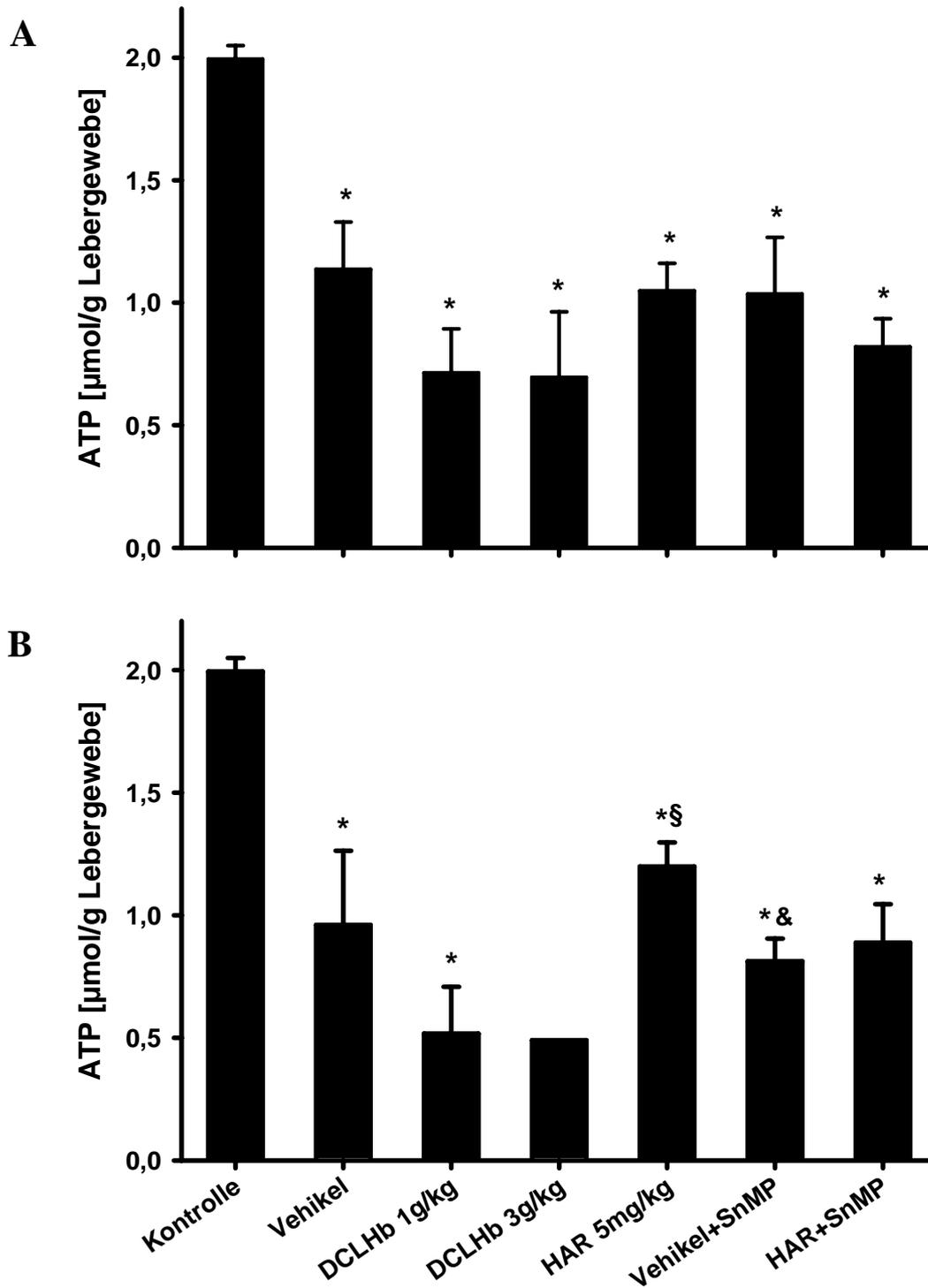


Abb.18: ATP-Gehalt im Lebergewebe nach 1 Stunde Schock und 5 Stunden Reperfusion (A) bzw. 2 Stunden Schock und 4 Stunden Reperfusion (B). (* $p < 0,05$ vs. Kontrolle, § $p < 0,05$ vs. DCLHb 1g/kgKG, & $p < 0,05$ vs. HAR)

5.2.2.3. Letalität

Der hämorrhagische Schock (1 bzw. 2 Stunden) mit anschließender Reperfusion (5 bzw. 4 Stunden) führte zu einem Schockdauer-abhängigen Anstieg der Letalität in den Vehikel-Gruppen.

Die DCLHb-vorbehandelten Gruppen wiesen eine Zunahme der Letalität, nach Hochdosisvorbehandlung und 2 Stunden Schock und 4 Stunden Reperfusion auf. Im Gegensatz dazu überlebten alle HAR-vorbehandelten Tiere in beiden Schockdauer-Abschnitten die Untersuchungszeit.

Die Blockade der HO-1 Aktivität durch SnMP-IX nach HAR-Vorbehandlung führte zu einem Anstieg der Letalität (Abb.19).

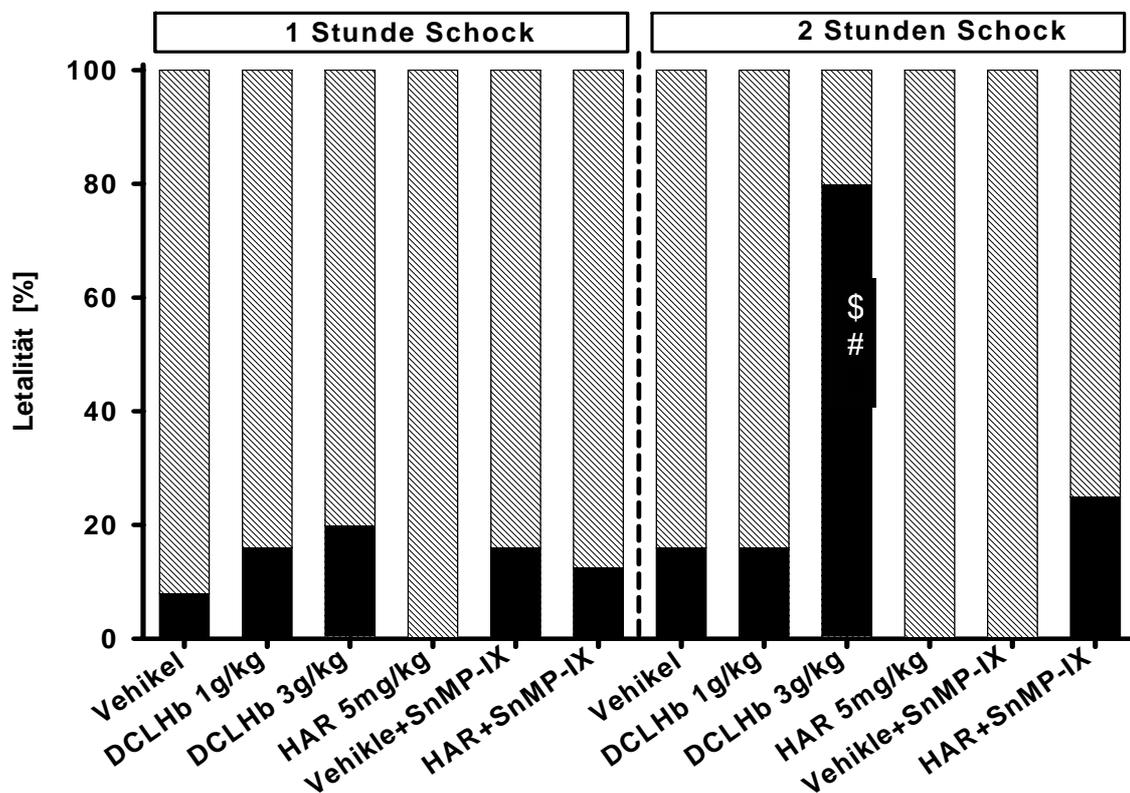


Abb.19: Auswirkung der unterschiedlichen Vorbehandlungen auf das Überleben (▨) und die Letalität (■) nach 1 Stunde Schock und 5 Stunden Reperfusion bzw. 2 Stunde Schock und 4 Stunden Reperfusion (# $p < 0,05$ vs. Vehikel, & $p < 0,05$ vs. HAR)

5.3. Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Vorbehandlung mit DCLHb und HAR nicht aber mit Ringerlaktat induzierte eine spezifische, dosisabhängige HO-1 Proteinexpression in Leber, Niere, Herz, Lunge und Aorta. Die Zunahme der HO-1 Aktivität führte gleichzeitig zu einer dosisabhängigen Zunahme der Gesamtbilirubinkonzentration im Serum.

Die DCLHb-Vorbehandlung führte dosis-unabhängig zu einem signifikant höheren Ausgangshämatokrit, zu einem signifikant früheren Auftreten des Dekompensationszeitpunktes und insbesondere nach 2 Stunden Schockdauer zu einer persistierenden Kreislaufdepression in der Reperfusionphase.

Darüber hinaus wiesen die DCLHb-vorbehandelten Tiere eine im Vergleich zu Vehikel- und HAR-Gruppe zusätzliche Erniedrigung des ATP-Gehalts im Lebergewebe auf.

Die DCLHb-Vorbehandlung bewirkte insbesondere nach 2 Stunden Schockdauer eine signifikante Zunahme der Letalität.

Die HAR-Vorbehandlung führte zu einer signifikanten Zunahme des mittleren Schockblutvolumens, zu einem signifikant verzögerten Auftreten des Dekompensationszeitpunktes und zu einer rascheren Stabilisierung des MAP in der Reperfusionphase.

Darüber hinaus wiesen die HAR-vorbehandelten Tiere am Ende des hämorrhagischen Schocks einen niedrigeren Laktatgehalt im Serum und einen höheren Sauerstoffpartialdruck im Blut insbesondere im Vergleich zu DCLHb-Tieren auf.

Alle HAR-vorbehandelten Tiere überlebten unabhängig von der Schockdauer die Schockversuche bis zum Versuchsende.

Die beobachteten positiven Effekte der HAR-Vorbehandlung wurden durch die Blockade der HO-Aktivität aufgehoben.