

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

**Kupffer Zellen und neutrophile Granulozyten  
als parakrine Modulatoren der hepatozellulären Hämoxygenase-1  
Expression nach hämorrhagischem Schock**

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

von Sandra Schönhofen

2009

## Inhaltsverzeichnis

<b>I.</b>		<b>Zusammenfassung</b>	<b>4</b>
I.1.		Zusammenfassung	4
I.2.		Summary	5
<b>II.</b>		<b>Einleitung</b>	<b>6</b>
<b>III.</b>		<b>Material und Methoden</b>	<b>15</b>
III.1.		Chemikalien	15
III.2.		Operative Vorbereitung	15
III.3.		Versuchsablauf	16
III.4.		Versuchsgruppen	17
	III.4.1.	Zeitlicher Verlauf der HO-1 Genexpression	17
	III.4.2.	Funktionelle Blockade der Kupfferzellen und Depletion von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN)	17
	III.4.3.	Applikation von Antioxidantien	18
III.5.		Isolierung und Separation von Leberzellen	19
	III.5.1.	Zellisolierung	19
	III.5.2.	Separation von Hepatozyten	20
III.6.		Ribonucleinsäure (RNA)-Isolierung und Northern Blot Analyse	21
III.7.		Western Blot Analyse	22
III.8.		Immunhistochemie	24
III.9.		Chlorazetatesterase (CAE)-Färbung	24
III.10.		$\alpha$ -Glutathion-S-Transferase-Konzentrationen im Serum	25
III.11.		Statistische Auswertung	25
<b>IV.</b>		<b>Ergebnisse</b>	<b>26</b>
IV.1.		Makrohämodynamische Effekte von Scheinoperation oder hämorrhagischem Schock und Volumentherapie	26
	IV.1.1.	Makrohämodynamische Effekte der Scheinoperation	26
	IV.1.2.	Makrohämodynamische Effekte von Schock und Volumentherapie	28
IV.2.		Einfluss der Vorbehandlung mit Gadoliniumchlorid und Vinblastin auf die Infiltration mit Leukozyten nach Schock und	33

		Volumentherapie	
IV.3.		Zeitlicher Verlauf der HO-1 Genexpression nach hämorrhagischem Schock und Reperfusion	35
IV.4.		Einfluss von Neutrophilen Granulozyten und Kupfferzellen auf die HO-1 Genexpression nach hämorrhagischem Schock und Reperfusion	36
IV.5.		Einfluss von freien Sauerstoffradikalen auf die HO-1 Genexpression nach hämorrhagischem Schock und Reperfusion	39
IV.6.		Immunhistochemische Untersuchung der HO-1 Genexpression	40
IV.7.		Einfluss von Gadoliniumchlorid und Vinblastin auf die HO-1 mRNA Induktion in isolierten Hepatozyten	43
IV.8.		Hepatozellulärer Schaden nach Hämorrhagie und Reperfusion	44
<b>V.</b>		<b>Diskussion</b>	<b>46</b>
V.1.		Modell des hämorrhagischen Schocks und makrohämodynamische Parameter	46
V.2.		Hepatozellulärer Schaden nach hämorrhagischem Schock und Volumentherapie	48
V.3.		Die Bedeutung der HO-1	48
V.4.		Die Bedeutung reaktiver Sauerstoffradikale	52
V.5.		Bedeutung der Kupfferzellen und PMNL auf die HO-1 Genexpression	54
<b>VI.</b>		<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>60</b>
<b>VII.</b>		<b>Danksagung</b>	<b>70</b>
<b>VIII.</b>		<b>Lebenslauf</b>	<b>71</b>

## **I. Zusammenfassung**

### **I.1. Zusammenfassung**

Dem Enzym Hämoxigenase I kommt eine herausragende Bedeutung bei der Aufrechterhaltung des hepatischen Blutflusses und der hepatozellulären Integrität nach hämorrhagischem Schock zu. In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle von Kupfferzellen und neutrophilen Granulozyten als parakrine Modulatoren der Hämoxigenase – 1 Gen – Expression hämorrhagischen Schockmodell untersucht. Männliche Sprague-Dawley Ratten (n = 6 – 10 pro Untersuchungsgruppe) wurden mit Pentobarbital narkotisiert (intraperitoneale Injektion von 50 mg/kg Körpergewicht) und anschließend entweder einem hämorrhagischen Schock oder einer Scheinoperation unterzogen. Während der 60 minütigen Schockphase betrug der mittlere arterielle Druck 35 mmHg. Unter Berücksichtigung des zeitlichen Verlaufs der HO-1 Genexpression wurde der Einfluss verschiedener Antioxidantien, einer Kupfferzellblockade (mittels Applikation von 10 mg/kg Körpergewicht Gadoliniumchlorid 24 Stunden vor Hämorrhagie oder 1 mg/kg Körpergewicht Dichlormethylendiphosphonat zwei Tage vor Hämorrhagie) oder einer Leukozyten – Depletion (mittels Applikation von 0,5 mg/kg Körpergewicht Vinblastin 5 Tage vor Hämorrhagie) auf die HO-1 Genexpression zum Zeitpunkt der maximalen Induktion, d.h. nach fünf Stunden Reperfusion, untersucht. Hierbei zeigte sich, dass durch Kupfferzellblockade und Gabe von Antioxidantien die nach Hämorrhagie und Reperfusion vermehrte Induktion des HO-1 – Gens auf mRNA und Proteinebene verhindert wurde, wohingegen die HO-1 – Genexpression nach Leukozytendepletion unbeeinflusst blieb. Darüber hinaus kam es nach Kupfferzellblockade zu einer vermehrten hepatozellulären Schädigung. Die Gabe von N-Formyl-methionin-leucyl-phenylalanin (fMLP) führte zu einem beträchtlichen Zufluss von neutrophilen Granulozyten, hatte jedoch hingegen keinen Einfluss auf die HO-1 Genexpression. Diese Daten legen nahe, dass Kupfferzellen, nicht jedoch neutrophile Granulozyten, eine adaptive hepatozelluläre Stressantwort nach Hämorrhagie und Reperfusion induzieren. Durch Kupfferzellen freigesetzte reaktive Sauerstoffradikale (ROS) könnten als parakrine Regulatoren einer hepatozellulären Stressantwort dienen, welche zur Aufrechterhaltung des intrahepatischen Blutflusses und der Integrität der Leber unter Stressbedingungen notwendig sind.

## **I.2. Summary**

### **Kupffer cells and neutrophils as paracrine regulators of the heme oxygenase-1 gene in hepatocytes after hemorrhagic shock**

Heme oxygenase (HO) plays a pivotal role for the maintenance of liver blood flow and hepatocellular integrity after hemorrhagic shock. We investigated the role of Kupffer cells and neutrophils as paracrine modulators of hepatocellular HO-1 gene expression in a rat model of hemorrhage and resuscitation. Male Sprague-Dawley rats (n = 6 – 10 / group) were anesthetized (pentobarbital, 50 mg/kg intraperitoneal) and subjected to hemorrhagic shock (mean arterial blood pressure: 35 mmHg for 60 minutes) or a sham protocol. Based on the time course of HO-1 gene expression, the effect of various antioxidants, Kupffer cell blockade (gadolinium chloride, 10 mg/kg 24 hours prior to hemorrhage or dichloromethylene diphosphonate, 1 mg/kg two days prior to hemorrhage) or neutrophil depletion (vinblastine, 0,5 mg/kg five days prior to hemorrhage) on induction of the HO-1 gene was assessed at 5 h of resuscitation, i.e. the time point of maximal induction. Kupffer cell blockade and antioxidants abolished HO-1 mRNA and protein induction after hemorrhage, while neutrophil depletion failed to affect hepatocellular HO-1 gene expression. In addition, Kupffer cell blockade aggravated hepatocellular injury. N-formyl-methionine-leucyl-phenylalanin (fMLP) induced a substantial influx of neutrophils into the liver but failed to induce hepatocellular HO-1 mRNA expression. These data suggest that Kupffer cells, but not neutrophils induce an adaptive hepatocellular stress response after hemorrhage and resuscitation. Oxygen-free radicals released by Kupffer cells may serve as paracrine regulators of a hepatocellular stress gene which is necessary to maintain liver blood flow and integrity under stress conditions.

## I. Einleitung

Wichtige Determinanten der anästhesiebezogenen perioperativen Morbidität und Mortalität sind Einschränkungen des Sauerstoffangebotes an periphere Organe in Form einer Abnahme des arteriellen Sauerstoffgehaltes (Hypoxämie) oder in Form globaler und regionaler Durchblutungsstörungen (Ischämie) (Utting, 1987, Larsen 1995). Trotz des verbesserten perioperativen Monitorings und der damit verbundenen raschen Diagnose und Therapierbarkeit von Anämie und Hypoxämie sind insbesondere die diagnostischen und therapeutischen Möglichkeiten bei Störungen der Organperfusion limitiert. In Abhängigkeit der Dauer der Hypoxie, der Ischämietoleranz sowie der Aktivität der jeweils betroffenen Zellpopulationen manifestiert sich die akute Ischämie an den jeweiligen Organsystemen unterschiedlich rasch. Während sich eine akute Ischämie am Myokard oder Neuronen rasch und akut entwickelt konnte in neueren experimentellen Untersuchungen gezeigt werden, dass auch die Minderperfusion weniger empfindlicher Gefäßprovinzen wie der Leber oder des Darmes eine zentrale Rolle bei der Entstehung des sogenannten Multiorganversagens (Multiorgan dysfunktionssyndrom, MODS) darstellen (Carrico 1986, Meakins 1986, Marzi 1993, Beal 1994, Livingston 1995, Bauer 1996a). Trotz der Beherrschbarkeit des Versagens von Einzelorganen, wie beispielsweise ein akutes Nierenversagen oder ein Lungenversagen („Adult respiratory distress syndrome“, ARDS), liegt die Letalität eines MODS bei über 90% (Beal 1994). Insbesondere das Leberversagen, bedingt durch die zentrale Bedeutung der Leber im Postaggressionssyndrom und der eingeschränkten therapeutischen Möglichkeiten zum Leberersatz, ist dabei mit einer schlechten Prognose verbunden (Hawker 1991, Siegel 1993, Marzi 1994).

Als prädisponierender Faktor für die Entstehung eines MODS gilt der Schock, welcher definiert ist als akutes (Mikro-)Zirkulationsversagen mit resultierendem Missverhältnis zwischen Sauerstoffangebot und (mitochondrialem) Sauerstoffbedarf (MacLean 1977, Larsen 1987, Gutierrez 1993). Der funktionell wichtigste und vulnerabelste Kreislaufabschnitt ist die kapilläre Mikrostrombahn. Unter Mikrozirkulation versteht man über den morphologischen Begriff der terminalen Strombahn hinausgehend die funktionelle Einheit aller am Stoffaustausch beteiligten Strukturen einschließlich des Blutstromes und des Interstitiums (Gaethgens, 1982). Nach einem initialen ischämischen Ereignis kommt es zu einem komplexen pathophysiologischen Geschehen, welches über die Aktivierung von

Mediatorsystemen bis zu einem (Multi-)Organversagen führen kann (Neugebauer und Lorenz 1998). Dabei kann die Störung der Mikrozirkulation nach hypodynamischen Schockzuständen auch nach Herstellung der systemischen Zirkulation persistieren (Wang 1990, Bauer 1995, Clemens 1995 a, b).

Frühe Arbeiten zu Störungen der Mikrozirkulation (Harman 1947, Sheehan und Davis 1959, Ames 1968) wiesen auf das sogenannte „no – reflow“- Phänomen hin. An Skelettmuskelzellen und Kaninchenhirn konnte gezeigt werden, dass das Versagen individueller Kapillaren zu einer Zunahme der Perfusionsheterogenität führte, d.h. neben minderperfundierten Kapillaren fanden sich auch solche mit erhaltenem oder gesteigertem Durchfluß. Daher führt die Wiederherstellung des Gesamtorganflusses mitunter dennoch zu fokalen Ischämien (Clemens 1997). Pathogenetisch bedeutsam für das Versagen der Kapillarperfusion sind dabei physikalische Faktoren wie Permeabilitätsstörungen infolge eines interstitiellen Ödems mit konsekutiv verlängerter Diffusionsstrecke oder eines Kompartmentsyndroms bei Skelettmuskeln. Desweiteren bedeutsam sind hämorrheologische Faktoren wie die Verlegung der Mikrostrombahn durch Leukozyten („plugging“) oder Erythrozytenaggregate (sogenanntes „sludge“ - Phänomen) als Folge der Hämokonzentration oder einer intravaskulären Koagulation (Knisely, 1963, Hardaway, 1966, Bagge, 1980).

Neuere Untersuchungen weisen auf das sogenannte Ischämie/Reperfusionssyndrom hin. Die Wiederherstellung des Blutflusses durch Reperfusion nach einem hämorrhagischen Schockereignis führt initial durch das sogenannte Ischämie/Reperfusionssyndrom (I/R – Syndrom) zu einer (paradoxen) Zunahme des Gewebeschadens (Bulkley 1987, Menger 1991b, Redl 1993, 1994a). Dabei spielt die Interaktion zwischen dem mikrovaskulären Endothel und polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten (PMNL) eine entscheidende Rolle. Untersuchungen am Katzendarm durch Granger und McCord zeigten eine mehrstufige Stressantwort. Als Folge des stufenweisen Abbaus von Adenosintriphosphat (ATP) zu Hypoxanthin und der Umwandlung der endothelialen Xanthindehydrogenase zur Xanthinoxidase kommt es nach Reoxygenierung zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Superoxidanionen und Wasserstoffperoxid können anschließend in der sogenannten Fenton – oder Haber- Weiss – Reaktion, einer eisenkatalysierten Reaktion, das zytotoxische Hydroxylradikal bilden. Frühzeitig konnte bereits gezeigt werden, dass es im Rahmen einer Ischämie und Reperfusion zu einer biphasischen Bildung von ROS kommt. Dabei kommt der Rekrutierung von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMNL) in der Vermittlung des sogenannten späten „oxidativen Stresses“ eine besondere pathogenetische Rolle zu (Granger 1988, Jaeschke 1990, 1991 a, Menger 1992, Redl 1994 a). Pathophysiologisch

bedeutsam ist dabei nicht alleine die primäre direkt-zytotoxische Gewebsschädigung durch ROS, beispielsweise durch Lipidperoxidation (Redl 1993, Jaeschke 1995). Vielmehr können ROS in einem weiteren Schritt über die Aktivierung redoxsensitiver Transkriptionsfaktoren wie NF kB (nukleärer Faktor kB) mit folgender Aktivierung ihrer Genprodukte eine sich nach I/R entwickelnde Entzündungsreaktion unterhalten bzw. induzieren. (Essani 1996, Sun 1996, Flohe 1997). In vergangenen Untersuchungen konnten weitere wichtige Mediatoren wie Endothelin 1 (ET - 1) und die Hämoxigenase 1 identifiziert werden, deren Genexpression durch I/R induziert wird. Aufgrund ihrer vasoaktiven Wirkungen haben diese unabhängig von den oben genannten Mechanismen einen entscheidenden Einfluß auf die Organperfusion (Kourembanas 1991, Bauer 1996b, Bauer 1998).

Eine zentrale Rolle für den Verlauf und die Prognose von Patienten mit einem MODS spielt die Leber als ein zentrales Organ im Intermediärstoffwechsel sowie als Immunorgan. Die Leber gehört mit 25% Anteil am Herzzeitvolumen zu den am besten durchbluteten Organen des Körpers (Lautt 1987, Campra 1988). An der dualen Blutversorgung der Leber sind die A. hepatica und die V. portae beteiligt. Den größten Anteil am Gesamtblutfluß stellt dabei mit etwa 70% die V.portae. Jedoch ist sie aufgrund der partiellen Desoxygenierung des Blutes bei der Passage der Kapillaren des Magen – Darmtraktes an der Sauerstoffversorgung der Leber nur mit etwa 50% beteiligt. In Abhängigkeit der Nahrungsaufnahme variieren die relativen Anteile der hepatischen Blutversorgung durch die A. hepatica und die V. portae (Shoemaker 1963, Lautt 1987, Campra 1988).

In der Leber werden morphologisch und funktionell sogenannte parenchymatöse Zellen (Hepatozyten) von Nichtparenchymzelltypen unterschieden. Die Hepatozyten sind dabei mit 94% des Zellvolumens beziehungsweise 65% der Zellzahl die bedeutsamste Zellpopulation. Zu den Aufgaben der Hepatozyten gehören Synthese – und Exkretionsleistungen, z..B. im Rahmen der Bilirubinkonjugation und Exkretion von Steroiden. Weiter erfüllen die Hepatozyten Stoffwechselleistungen im Aminosäuren – und Proteinstoffwechsel, der Harnstoffsynthese, der Gluconeogenese sowie bei der Verstoffwechslung von Xenobiotica durch das Zytochrom P<sub>450</sub> – Enzymsystem (Jungermann 1989). Die an diesen Stoffwechselwegen beteiligten Schlüsselenzyme werden transkriptional reguliert und so bei Schockereignissen oder im Rahmen einer Sepsis in ihrer Expression moduliert. Im Sinne einer „adaptive response to stress“ (Wang 1995) kommt es bei Stressereignissen beispielweise zu einer reduzierten Expression sogenannter negativer Akutphasenproteine zugunsten anderer Stressgene („Akutphasereaktion“ oder „Hitzeschockreaktion“, Schoeninger 1992, Pannen

1995, Bauer 1996a). Unter physiologischen Bedingungen findet sich aufgrund des unidirektionalen Blutflusses mit folgender Abnahme des Sauerstoffpartialdruckes vom Periportalfeld zur Zentralvene hin eine zonale Verteilung einzelner Stoffwechselwege. Ebenso verteilen sich in Abhängigkeit des jeweiligen Sauerstoffpartialdruckes die mRNA – Mengen einzelner Enzyme bzw. Proteine. Als ein wichtiges Stressprotein ist dabei das sogenannte Hitzeschockprotein 32 oder Hämoxxygenase 1 zu nennen, auf welches im Folgenden näher eingegangen wird.

Den Hauptanteil der nicht-parenchymatösen Zellen der Leber stellen die sogenannten sinusoidalen Endothelzellen dar (Van Bossuyt, 1988). Diese unterscheiden sich in morphologischer und funktioneller Hinsicht von Endothelzellen anderer Gefäßabschnitte. Durch schaumlöffelartig angeordnete Fenestrae, den sogenannten „sieve plates“ erfolgt die Filtration von Makromolekülen in den Disse'schen Raum. Spezifische Oberflächenrezeptoren dienen der Clearance von Zellmatrixproteinen.

Die sogenannten Kupfferzellen sind der größte ortsständige Makrophagenpool des Organismus (Wake 1989). Makrophagen sind antigenpräsentierende Zellen, welche nach Phagozytose und anschließender Antigenpräsentation eine wichtige Filterfunktion für aus dem Magen-Darmtrakt eingeschwemmte Bakterienprodukte darstellen. Dabei setzen sie zudem wichtige kostimulatorische Moleküle wie Zytokine und vasoaktive Substanzen frei (Wake 1989, Decker 1990, McCuskey 1993). Daher können sie zur Entwicklung einer systemischen Entzündungsreaktion auch nach primär abakteriellen Ereignissen wie beispielweise dem hämorrhagischen Schock beitragen.

Etwa 10% der nicht-parenchymatösen Zellen stellen die sogenannten Perizyten dar, welche auch als Sternzellen, Fettspeicher – oder Itozellen bezeichnet werden. Sie gehören einer mesenchymalen Zelllinie an und zeigen als morphologisches Charakteristikum eine hohe Dichte perinukleärer Fetttröpfchen („droplets“). Die Sternzellen weisen bis zu 40 µm lange dendritische Zellausläufer auf und liegen den sinusoidalen Endothelzellen an deren abluminaler Oberfläche netzförmig auf (Wake 1980, 1995). Eine wichtige Funktion der Sternzellen ist die Speicherung von Vitamin A in ihren Fetttröpfchen, wobei sie etwa 90% des Körperbestandes an Vitamin A enthalten. Unter experimentellen Bedingungen konnte man eine Umwandlung kultivierter Sternzellen in Myofibroblasten nachweisen (Rockey 1992a, b, Bachem 1993). Dies könnte eine pathophysiologische Rolle bei chronischen Lebererkrankungen wie der Leberzirrhose, der Regulation des hepatischen Blutflusses und der portalen Hypertension spielen.

Die sogenannten Pit – Zellen repräsentieren eine weitere nicht-parenchymatöse Zellpopulation, welche im Sinusoid lokalisiert sind und wahrscheinlich als große granulierte Lymphozyten oder „natural killer cells“ fungieren (Wisse 1976). Cholangiozyten und Fibroblasten als Bindegewebszellen sind weitere nicht-parenchymatöse Zellen.

Der Abbau von Häm, einem Komplex aus  $\text{Fe}^{2+}$  und Protoporphyrin – IX, und Erythrozyten findet vorwiegend in der Milz, der Leber und im Knochenmark statt. Die Milz und die Kupfferzellen der Leber entfernen überalterte Erythrozyten aus der Blutbahn und bauen das in ihnen enthaltene Häm ab (Jandl 1960, Kaplan 1961, Jandl 1965). Im Plasma gelöstes Hämoglobin wird dagegen vorwiegend in Hepatozyten abgebaut, wohingegen dabei die Milz und die phagozytierenden Zellen des Knochenmarkes nur eine untergeordnete Rolle spielen (Jandl 1957, Keene 1965, Garby 1960, Wintrobe 1967). Das maßgeblich am Hämabbau beteiligte Enzym, die Hämoxigenase, ist eine mikrosomale mischfunktionelle Oxygenase und katalysiert den initialen und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt beim Abbau des Häm moleküls. Dabei wird in einer Sauerstoff und NADPH (Nicotinamidadeninucleotid) – abhängigen Reaktion der Porphyrinring in äquimolare Mengen Biliverdin – IXa, Kohlenmonoxid (CO) und freies  $\text{Fe}^{2+}$  gespalten (Tenhunen 1968). Biliverdin wird durch die cytosolische Biliverdinreduktase zu Bilirubin reduziert (Kutty 1981). Bilirubin wird in unlöslicher Form an Albumin gebunden im Blut zur Leber transportiert, wo es größtenteils mit Uridin 5'- diphosphat – Glucuronsäure zum Diglucuronid konjugiert und mit der Galle ausgeschieden wird. CO wird über die Lungen unverändert abgeatmet (Marks 1991). Den Gallepigmenten kommt eine wichtige Funktion zur Verteidigung gegen reaktive Sauerstoffspezies zu, wobei Bilirubin oxidiert wird und so als „scavenger“ reaktiver Radikale dient. Oxidiertes Bilirubin wird als Biopyrrin im Urin ausgeschieden (Llesuy 1994, Yamaguchi 1996). CO dient ähnlich dem NO (Stickstoffmonoxid) als Aktivator der löslichen Guanylatcyclase und führt dadurch zu einem Anstieg des cGMP (zyklisches Guanosinmonophosphat) (Brüne 1987, Furchgott 1991, Schmidt 1992). Über eine Vasodilatation hat es einen protektiven Effekt nach Ischämie/Reperfusion (Bauer 1996a, Rensing 1998).

Von der Hämoxigenase sind drei verschiedene Isoenzyme bekannt (Hämoxigenase 1, 2 und 3; HO-1, 2 und 3), welche von verschiedenen Genen kodiert werden (Cruse 1988, McCoubry 1997). Wichtig für den Hämstoffwechsel sind dabei die Isoenzyme 1 und 2, während die HO-3 vor allem als  $\text{O}_2$  – Sensor der Zelle dient. Die Hämoxigenase 1 ist das Produkt einer mRNA von einer Größe von 1,8 Kilobasen (Shibahara 1989), während die Hämoxigenase 2 zwei

mRNA – Transkripten einer Größe von 1,3 und 1,9 Kilobasen entstammt (Trakshel 1991). Die beiden Isoenzyme unterscheiden sich nicht in ihrer Spezifität gegenüber ihren Substraten (Hämatin, Hämoglobin, Cyt P450<sub>b</sub>, -420<sub>b</sub>, -420<sub>c</sub>). Beiden gemeinsam ist zudem das Produkt des Hämabbaus, Biliverdin IX. Unter physiologischen Bedingungen wird die HO-1 überwiegend in der Milz exprimiert, während die HO-2 in der Leber, den Testes, im zentralen Nervensystem und im kardiovaskulären System überwiegt (Maines 1988). HO-2 ist ein konstitutiv und unter Stressbedingungen unverändert exprimiertes Genprodukt (Maines 1986). Bislang wurden durch den Nachweis eines „glucocorticoid responsive element“ in der Promotorregion nur Glucocorticoide als Induktoren der HO-2 beschrieben (McCoubry 1994, Raju 1997).

HO-1 wurde als identisch mit dem Hitzeschockprotein 32 (hsp 32) charakterisiert und ist ein stressinduzierbares Protein (Shibahara 1987). Ihr wichtigster Induktor ist das Substrat Häm selbst (Tenhunen 1970, Pimstone 1971a, b, Yoshida 1988). Es gibt jedoch eine Reihe anderer endogener und exogener Faktoren, die die HO-1 Aktivität induzieren. Dazu gehören Hitzeschock (Shibahara 1987, Ewing 1994, Raju 1994), Endotoxin (Rizzardini 1994), Zytokine (Cantoni 1991, Rizzardini 1993, Kutty 1994, Terry 1998), Schwermetalle, Anoxie (Eyssen-Hemandez 1996), Hypoxie (Murphy 1991, Morita 1995, Lee 1996b, 1997, Borger 1998), Hyperoxie (Visner 1996, Lee 1996a), Ischämie/Reperfusion (Maines 1993, Tacchini 1993, Bauer M 1996a), Wasserstoffperoxid, Natriumarsenat und UV-Strahlen (Keyse 1989). Dabei führen alle genannten Faktoren zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und Modifikation der Glutathionkonzentration, also einer Verschiebung des intrazellulären Redoxgleichgewichtes („oxidativer Stress“, Sies 1985). In der Promotorregion des HO-1 Gens finden sich Bindungsstellen für eine Reihe von redoxsensitiven Transkriptionsfaktoren, beispielsweise Aktivator Protein-1 (AP-1) und Nukleärer Faktor –kB (NF-kB). Die Induktion der HO-1 nach Ischämie/Reperfusion führt über 4 Mechanismen zum Schutz vor oxidativem Stress:

1. über den Abbau des prooxidativen Substrates Häm (Balla 1991, Vercellotti 1994),
2. über die Bildung des antioxidativ wirksamen Biliverdin,
3. über die Coinduktion der Ferritin mRNA (das beim Hämabbau anfallende Eisen katalysiert die Bildung des hochreaktiven Hydroxylradikals und wird durch das parallel induzierte Ferritin sequestriert und inaktiviert, Balla 1992) und
4. über das beim Hämabbau anfallende CO, welches eine vasodilatatorische Wirkung hat und hierdurch die Organperfusion aufrecht erhält (Bauer M 1996a, Rensing 1998).

Die normale Leber produziert beide Isoenzyme der Hämoxxygenase (Maines 1986). Sowohl parenchymatöse als auch nicht-parenchymatöse Zellen sind am Hämabbau beteiligt. Hepatozyten übernehmen die Aufnahme und den Abbau von im Plasma gelöstem Hämoglobin, während nicht-parenchymatöse Zellen gealterte Erythrozyten des Sinusoids abbauen. Die Aktivierung von Kupfferzellen durch oxidativen Stress führt zu Störungen des nutritiven Blutflusses und zur Interaktion polymorphkerniger Leukozyten (PMN) mit dem sinusoidalen Endothel, was zu einer protrahierten Schädigung führt (Jaeschke 1990b). Eine Schädigung bzw. überschießende Aktivierung nicht-parenchymatöser Leberzellen führt durch ein lokales Ungleichgewicht an Vasodilatoren (CO, NO) und Vasokonstriktoren (Endothelin 1) durch eine Zunahme der Perfusionsheterogenität zu einer sinusoidalen Durchblutungsstörung bis hin zum Perfusionsversagen (McCuskey 1982, Bauer M 1994a, Bauer I 1995, Rensing et al, Hepatology). Beide Vasodilatoren (NO und CO) entfalten ihre gefäßerweiternde Wirkung dabei über eine gemeinsame Endstrecke, der Bildung des zyklischen Guanosinmonophosphates (cGMP) (Arnold 1977, Brüne 1987, Suematsu 1995). In vorhergehenden Untersuchungen konnte die funktionelle Bedeutung einer gesteigerten Hämoxxygenase-Genexpression und damit verbundener CO-Bildung zur Aufrechterhaltung des Gesamtblutflusses der Leber nach hämorrhagischem Schock belegt werden (Bauer M 1996a, Rensing 1998).

Auch in der Leber kommt es nach Ischämie/Reperfusion, Endotoxinämie, Bakteriämie und hämorrhagischem Schock nach einer initialen ischämischen Schädigung zu einer zeitlich versetzten sekundären Schädigung („no-reflow“ oder „reflow-paradox“ – Phänomene) sowie zur Akkumulation von polymorphkernigen Leukozyten (McCuskey 1982, 1996, Koo 1977, Clemens 1985, Yahanda 1990, Unger 1989, Marzi 1990, Menger 1993, Bauer 1994, 1995, Vollmar 1995, C.Bauer 1997a,b). Jaeschke und Mitarbeiter konnten belegen, dass es auch in der Leber zu einer biphasischen oxidativen Stressantwort kommt. Wesentlicher pathophysiologischer Parameter hierfür sind die in der Leber zahlreich vorhandenen in und um das Sinusoid lokalisierten Makrophagen, wodurch sich die Mikrostrombahn der Leber wesentlich von der anderer Organe wie Gehirn, Niere oder Skelettmuskulatur unterscheidet. In der Leber kommt es zu einer biphasischen oxidativen Stressantwort (Jaeschke 1990, 1991a, b, 1994). Dabei unterscheidet man zwischen einer primären, makrophagenabhängigen oxidativen Stressantwort und einer sekundären, durch Leukozyten vermittelten Stressantwort. Die Bildung reaktiver Sauerstoffradikale (ROS) in der Frühphase nach Ischämie/Reperfusion oder Endotoxinämie ist nicht ausreichend, um eine direkte toxische Schädigung der

Hepatozyten, z..B. durch Lipidperoxidation, zu erzeugen. Vielmehr ist der entscheidende Mechanismus der Leberzellschädigung durch „oxidativen Stress“ eine protrahierte Entzündungsreaktion durch die Aktivierung redoxsensitiver Transkriptionsfaktoren wie nukleärer Faktor kB (NF kB) mit nachfolgender Aktivierung der abhängigen Genprodukte (Essani 1996). Ebenso erfolgt nach I/R eine Aktivierung der Hämoxxygenase – 1. Es besteht also ein funktioneller Zusammenhang zwischen einer Stressgenexpression und dem hepatischen Hämstoffwechsel. Die Aktivierung von Kupfferzellen durch oxidativen Stress führt zu Störungen des nutritiven Blutflusses und zur Interaktion polymorphkerniger Leukozyten (PMN) mit dem sinusoidalen Endothel, was zu einer protrahierten Schädigung führt (Jaeschke 1990b). NO (Stickstoffmonoxid) dient als Gegenspieler der zur Leukozytenakkumulation führenden proinflammatorischen Faktoren unter Stressbedingungen. NO reagiert dabei auf verschiedenen Stufen der Leukozytenaktivierung, wie der CD18-abhängigen Leukozytenadhärenz, des P-Selektin abhängigen „rolling“ und der Induktion von „intercellular adhesion molecule-1“ (ICAM-1) und „vascular cell adhesion molecule-1“ (VCAM-1) (Kanwar 1995).

Eine Schädigung bzw. überschießende Aktivierung nicht-parenchymatöser Leberzellen kann durch ein lokales Ungleichgewicht an Vasodilatoren (CO, NO) und Konstriktoren (Endothelin 1) durch eine Zunahme der Perfusionsheterogenität zu einer sinusoidalen Durchblutungsstörung bis hin zum Perfusionsversagen führen (McCuskey 1982, Bauer M 1994a, Bauer I 1995). Beide Vasodilatoren (NO und CO) entfalten ihre gefäßerweiternde Wirkung dabei über eine gemeinsame Endstrecke, der Bildung des zyklischen Guanosinmonophosphates (cGMP) (Arnold 1977, Brüne 1987, Suematsu 1995). In vorhergehenden Untersuchungen konnte die funktionelle Bedeutung einer gesteigerten Hämoxxygenase-Genexpression und damit verbundener CO-Bildung zur Aufrechterhaltung des Gesamtblutflusses der Leber nach hämorrhagischem Schock belegt werden (Bauer M. 1996a, Rensing 1998).

### **Fragestellung**

In früheren Untersuchungen wurde die zweizeitige Produktion von freien Sauerstoffradikalen durch Kupfferzellen und polymorphkernige Granulozyten nach Ischämie und Reperfusion untersucht und dokumentiert (Jaeschke 1990, 1991, Liu P., 1995). Unter sogenannten „low-flow“ – Bedingungen eines hämorrhagischen Schocks sind diese Mechanismen im Wesentlichen noch unbekannt. Obwohl die Leberschädigung im Rahmen eines

hämorrhagischen Schocks mit anschließender Reperfusion im Vergleich zu den Bedingungen einer „kalten“ oder „warmen“ Ischämie mit nachfolgender Reperfusion moderat erscheint, ist der Einfluß auf die Schädigung der Leberzellen und der daraus möglichen Entwicklung eines Multiorganversagens von großer klinischer Bedeutung. In vorhergehenden Studien konnte nach hämorrhagischem Schock und Reperfusion eine Anreicherung von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten sowohl in Lebervenen als auch in den Sinusoiden und postsinusoidalen Venolen nachgewiesen werden (Bauer M., 1995, Marzi I., 1995). Ihre Bedeutung bei der Entwicklung der oxidativen Stressantwort bleibt dennoch unklar.

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es daher, die unterschiedliche Funktion von Kupfferzellen und polymorphkernigen Leukozyten als parakrine Regulatoren und Quelle reaktiver Sauerstoffspezies und deren Bedeutung für die hepatozelluläre Hämogxygenase-1 Expression nach hämorrhagischem Schock und Volumentherapie zu untersuchen.

## **II. Material und Methoden**

### **II.1. Chemikalien**

Sofern nicht anders angegeben, wurden die verwendeten Chemikalien von Sigma (Deisenhofen, Deutschland) oder Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen und waren von der jeweils höchsten erhältlichen Reinheit.

### **II.2. Operative Vorbereitung**

Nach Genehmigung durch das zuständige Landratsamt wurden die Versuche an männlichen Sprague Dawley Ratten (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) mit einem Körpergewicht von 240 – 300g durchgeführt.

12 Stunden vor Versuchsbeginn wurde den Tieren das Futter entzogen, während sie weiterhin freien Zugang zu Wasser hatten. Alle Versuche wurden am Morgen durchgeführt, um tageszeitlich bedingte Schwankungen des Stoffwechsels und des Hormonhaushaltes auszuschließen. Es wurden nur Tiere in die Versuchsserien aufgenommen, die keine Anzeichen von Erkrankungen sowie ein normales Fress- und Putzverhalten zeigten. Die Tiere wurden durch eine intraperitoneale Injektion von Pentobarbital (50 mg/kg KG) narkotisiert.

Am enthaarten Hals der Tiere wurde zwischen Mandibula und Manubrium sterni ein medianer Hautschnitt angelegt. In Höhe der infrahyalen Muskulatur wurde die Trachea freigelegt, zwischen zwei Knorpelspannen quer inzidiert und ein Plastiktubus über eine Länge von ungefähr 0,5 cm eingeführt und fixiert. Zwischen infrahyaler Muskulatur und Musculus sternocleidomastoideus wurde anschließend die linke Arteria Carotis unter Schonung des Nervus Vagus freipräpariert und sorgfältig aufgespannt. Die Arterie wurde distal ligiert und proximal mit einer mikrochirurgischen Gefäßklemme versehen. Sie wurde mit einer Mikroschere inzidiert, um eine Thermistorsonde (9490 E, Columbus Instruments, OH) bis zum Aortenbogen vorzuschieben und zu fixieren. Mittels transpulmonaler Thermodilution

(Cardiotherm 500, Columbus Instruments, Ohio) erfolgte die Messung des Herzzeitvolumens. Nach ähnlicher Vorgehensweise wurde in die rechte Vena Jugularis ein zentraler Venenkatheter gelegt. Zur Deckung des Basisbedarfs während des Eingriffes wurde eine Ringerazetatlösung (10 ml/kg/h) infundiert. Die linke Arteria femoralis wurde zum Zwecke der kontinuierlichen Blutdruckmessung (Medex Medical, Ratingen, Germany) sowie zur Blutentnahme kanüliert.

### **II.3. Versuchsablauf**

Die operative Vorbereitungsphase nahm eine Zeit zwischen 35 und 45 Minuten in Anspruch, worauf eine Ruhephase von 15 Minuten folgte. In dieser Zeit sollten konstante Kreislaufverhältnisse und eine ausreichende Spontanatmung beobachtet werden. Innerhalb der ersten 5 Minuten wurde nach Messung des mittleren arteriellen Druckes (MAD), des Herzzeitvolumens (HZV), der Herzfrequenz (HR) sowie der Blutgase (BGA) der mittlere arterielle Druck durch raschen arteriellen Blutentzug auf Werte zwischen 35 und 40 mmHg gesenkt und während der nächsten 60 Minuten durch weitere adaptierte Blutentnahmen konstant auf diesem Wert gehalten. Das entnommene Blut wurde in Spritzen gesammelt und mittels einer Zitrat-Phosphat-Dextroselösung (0,14 ml/ml Blut) antikoaguliert. Es wurden in dieser Phase viertelstündlich der Blutdruck und die Herzfrequenz dokumentiert.

Nach Ablauf der 60-minütigen Schockphase wurde die Volumentherapie eingeleitet. Nach erneuter Messung von HZV und BGA erfolgte innerhalb der ersten 15 Minuten der Volumentherapie die Retransfusion von 60% des zuvor entnommenen Blutes. Während der Volumentherapie erfolgte die Infusion von Ringerazetatlösung, und zwar innerhalb der ersten Stunde entsprechend dem doppelten entzogenen Blutvolumen und innerhalb der zweiten Stunde entsprechend dem entzogenen Blutvolumen. Anschließend erhielten die Tiere der Schockgruppen bis zum Ende des Versuches eine konstante Infusion von Ringerazetatlösung entsprechend ihres Basisbedarfs, während den scheinoperierten Tieren, die keinem hämorrhagischen Schock unterzogen wurden, während des gesamten Experimentes konstant 10 ml/kg KG Ringerazetatlösung zur Deckung ihres Basisbedarfs infundiert wurde. Die Dokumentation von Blutdruck und Herzfrequenz erfolgte in der ersten Stunde in 15-minütigem Abstand, in der zweiten Stunde in 10-minütigem Abstand und später im Abstand von 30 Minuten. Die Messung des Herzzeitvolumens erfolgte stündlich. Eine Blutgasanalyse

erfolgte zu Beginn des Versuches sowie nach der 1., 2. und 6. Stunde. Die Körpertemperatur der Tiere wurde während des Versuches mittels einer Heizplatte konstant bei 37,5 °C gehalten.

Am Ende des Versuchsprotokolls wurden die Tiere laparotomiert, die Leber entnommen und unverzüglich in flüssigen Stickstoff überführt. Bis zur weiteren Aufarbeitung wurden die Leberproben bei – 70 °C gelagert.

## **II.4.. Versuchsgruppen**

### **II.4.1. Zeitlicher Verlauf der HO-1 Genexpression**

Zur Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der HO-1 Genexpression wurde

- a) zur Bestimmung des Ausgangswertes narkotisierten, unmanipulierten Tieren die Leber entnommen (Kontrolle, n=3)
- b) scheinoperierten Tieren wurde die Leber 6 Stunden nach Versuchsbeginn (scheinoperierte Kontrolle 6 Stunden, n=3) oder 24 Stunden nach Versuchsbeginn (scheinoperierte Kontrolle 24 Stunden, n=3) entnommen
- c) Tieren, die das Schockprotokoll durchliefen wurde die Leber 6 Stunden nach Versuchsbeginn (Schock 6 Stunden, n=3) oder 24 Stunden nach Versuchsbeginn (Schock 24 Stunden, n=3) entnommen.

### **II.4.2. Funktionelle Blockade der Kupfferzellen und Depletion von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN)**

Unter Berücksichtigung des Zeitverlaufs der HO-1 Genexpression wurde die Bedeutung der Kupfferzellblockade sowie der Depletion polymorphkerniger Granulozyten untersucht.

Dabei erhielten scheinoperierte Tiere

- a) 24 Stunden vor Versuchsbeginn dem jeweiligen Versuchsansatz entsprechende Volumina 0,9% Natriumchloridlösung (Vehikel Sham, n=6)
- b) 24 Stunden vor Versuchsbeginn Gadoliniumchlorid ( $GdCl_3$ , 10 mg/kg KG, Sigma München, Germany) gelöst in 0,9% Natriumchloridlösung ( $GdCl_3$  Sham, n=6) zur Blockade der Kupfferzellen
- c) 48 Stunden vor Versuchsbeginn liposomales Dichlormethyldiphosphonat ( $Cl_2MDP$ , 1 mg/kg KG, n=6) zur Kupfferzellblockade oder
- d) 5 Tage vor Versuchsbeginn Vinblastin (0,5 mg/kg KG) zur Depletion polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten (Vinblastin Sham, n=6)

unter Ethernarkose als Applikation in die Vena dorsalis penis.

Die Tiere, die das Schockprotokoll durchliefen, wurden wie folgt behandelt:

- a) Vehikel Schock (0,9% NaCl, Applikation 24 h vor Versuchsbeginn, n=6)
- b)  $GdCl_3$  Schock (24 h vor Versuchsbeginn, n=6)
- c)  $Cl_2MDP$  Schock (48 h vor Versuchsbeginn, n=6)
- d) Vinblastin Schock (5 Tage vor Versuchsbeginn, n=6).

Nach 6 Stunden und nach 24 Stunden wurden die Lebern zur histomorphometrischen Beurteilung des Leberzellschadens und zur RNA – Isolierung entnommen. Blutentnahmen zur Messung der alpha – Glutathion-S-Transferase-Konzentration als spezifischem Marker des hepatozellulären Schadens im Serum erfolgten zu Versuchsbeginn sowie nach 5 Stunden Reperfusion.

### **II.4.3. Applikation von Antioxidantien**

Der Hämoxygenase-1 Stoffwechsel gilt als zentraler antioxidativer Abwehrmechanismus der Zelle. Es wurde der Einfluß einer Blockade des HO-1 Stoffwechselweges auf die hepatozelluläre Schädigung nach hämorrhagischem Schock und Volumentherapie in Gegenwart potenter Antioxidantien untersucht. Dabei sollte untersucht werden, ob

Kupfferzellen und PMN die HO-1 Genexpression durch die Bildung freier Sauerstoffradikale beeinflussen. Dazu wurde den Tieren im zuvor beschriebenen Schockmodell entweder

- a) N-Acetylcystein (NAC, 75 mg/kg KG, Zambon GmbH, Gräfelfing, Deutschland, n=6)
- b) Das Vitamin E – Analogon Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonat, 6 mg/kg KG, Sigma, n=6) oder
- c) Desferoxamin (HES-DFO, 25 mM DFO, 60% entnommenes Blut, 40% HES-DFO, Biomedical Frontiers Inc., Minneapolis, MN, n=6)

kurz vor Beginn der Reperfusionphase appliziert.

Nach 6 Stunden und nach 24 Stunden wurden die Lebern zur histomorphometrischen Beurteilung des Leberzellschadens und zur RNA – Isolierung entnommen. Blutentnahmen zur Messung der alpha – Glutathion-S-Transferase-Konzentration als spezifischem Marker des hepatozellulären Schadens im Serum erfolgten zu Versuchsbeginn sowie nach 5 Stunden Reperfusion.

N-Formyl-methionin-leucyl-phenylalanin (fMLP) diente als Positivkontrolle infiltrierender polymorphkerniger Granulozyten.

## **II.5. Isolierung und Separation von Leberzellen**

### ***II.5.1. Zellisolierung***

Die Isolierung der Leberzellen erfolgte gemäß einem modifizierten Protokoll der von Kawada et al. (1993) beschriebenen Kollagenase-Perfusionstechnik aus den Lebern unmanipulierter männlicher Sprague-Dawley-Ratten, um *in vitro* Effekte von Gadoliniumchlorid und Vinblastin zu zeigen.

Dazu wurden die Tiere durch eine intraperitoneale Injektion von Pentobarbital (50mg/kg KG) narkotisiert und nach einer medianen Laparotomie heparinisiert (50 IU/g KG). Zunächst wurde die Vena portae kanüliert und mit einer kalziumfreien Pufferlösung (Krebs-Henseleit-Puffer; 6,96 g/l NaCl; 0,35 g/l KCl; 0,165 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,029 g/l EDTA; 2,1 g/l Natriumbikarbonat), über einen Zeitraum von 10 Minuten mit einer Flußrate von 10-15 ml/min. *in situ* nicht rezirkulierend vorperfundiert. Die Pufferlösung wurde über den gesamten Versuchszeitraum mit Carbogen (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) bei 37°C begast. Damit die Pufferlösung während des Versuchs aus dem Organ abfließen konnte, wurde die Vena cava

inferior unterhalb der Leber eröffnet. Während der Perfusion wurde die Leber freipräpariert und mitsamt der Kanüle in ein doppelwandiges Glasgefäß, das konstant auf 37°C erwärmt wurde, überführt. Die Vorperfusion mit kalziumfreier, EDTA-haltiger Pufferlösung diente zum einen dazu, Blut aus dem Gefäßsystem der Leber auszuspülen, zum anderen wurde dadurch die Zelladhärenz vermindert, so daß die Effektivität der anschließenden Kollagenaseverdauung erhöht wurde (Seglen, 1994). Anschließend erfolgte ex situ eine rezirkulierende Perfusion mit 0.1% Kollagenaselösung (30 mg Kollagenase; hepatozytenggeeignete Kollagenase aus *Clostridium histolyticum*, Life Technologies, Grand Island, USA; 30 ml kalziumhaltiger, EDTA-freier Krebs-Henseleit-Puffer) zur Andauung der bindegewebigen Organbestandteile. Diese Perfusion erfolgte in geschlossenem Kreislauf mit einer Flußgeschwindigkeit von 14,5 ml/min. über einen Zeitraum von 10 min. bei 37 °C unter konstanter Begasung mit Carbogen. Danach wurde die Leber mit etwa 10 ml der Perfusionslösung in eine Petrischale überführt, die Organkapsel mit einem Spatel eröffnet und die Zellen vorsichtig herausgeschält. Das Zellgemisch wurde anschließend in ein Gefäß mit 250 ml Inhalt gegeben und mit PBS (Life Technologies) und 1 ml Kalziumchlorid auf 100 ml aufgefüllt.

### ***II.5.2. Separation von Hepatozyten***

10 ml der Zellsuspension wurden mit PBS auf 50 ml aufgefüllt und bei 50 x g und einer Temperatur von 4 °C 3 Minuten zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde nach Resuspendieren erneut mit PBS auf 50 ml aufgefüllt und bei 30 x g zentrifugiert. So erhielt man ein Zellpellet, das fast ausschließlich Hepatozyten enthielt (> 95% HC). Nach erneuter Resuspension mit 5 ml PBS wurde eine Probe der Zellsuspension zur Vitalitätsbestimmung mit Trypanblau gefärbt. Die Auszählung der Zellen erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer unter einem Mikroskop mit 40-facher Vergrößerung, wobei die Vitalität der Hepatozyten im Durchschnitt mehr als 80 % betrug.

Die Hepatozyten ( $3 \times 10^6$ ) wurden auf kollagenbeschichtete 60 mm Petrischalen (40µg Rattenschwanz-Kollagen pro Petrischale; Sigma, Deutschland) überführt. Daraufhin wurden sie über einen Zeitraum von 24 Stunden in Williams E Medium (3 ml/Petrischale, Life Technologies), komplettiert mit 10 % fetalem Rinderserum (Life Technologies) und 100 µg/ml Gentamicin (Refobacin, Merck, Deutschland) bei einer Temperatur von 37 °C kultiviert. Nach 6 Stunden wurden nicht-adhärenente Zellen durch intensives Waschen mit PBS

abgelöst und frisches, serumfreies Williams E Medium zugegeben. Nach Ablauf der 24 stündigen Kultivierungszeit wurden die Petrischalen erneut mit PBS gewaschen und mit frischem, serumfreiem Williams E Medium aufgefüllt. Anschließend erfolgte eine 6 stündige Inkubation der Hepatozyten mit verschiedenen Konzentrationen Gadoliniumchlorid (1, 10 oder 100 mg/l) oder Vinblastin (0,05, 0,5 oder 5 mg/l) bei 37 °C. Diese Konzentrationen entsprechen in etwa der 0,1-, 1- oder 10-fachen Spitzenkonzentrationen an Gadoliniumchlorid oder Vinblastin, die in den *in vivo* Experimenten im Serum der Tiere erreicht wurden. Parallel dazu wurden Hepatozytenkulturen in Anwesenheit von Gadoliniumchlorid oder Vinblastin oxidativem Streß mit Cobaltchlorid (CoCl<sub>2</sub>, 300 µM, Sigma) ausgesetzt.

## II.6. Ribonucleinsäure (RNA)-Isolierung und Northern Blot Analyse

Gesamt-RNA wurde aus Lebergewebe (etwa 400mg) oder kultivierten Hepatozyten mittels der von CHOMCZYNSKI und SACCHI (1987) entwickelten Phenol-Chloroform-Extraktionsmethode isoliert. Es wurden in den nachfolgenden Arbeitsschritten nur RNase-freie Materialien und Lösungsmittel verwendet, um die RNA vor dem Abbau durch RNAsen zu schützen. Nach Homogenisieren der kultivierten Hepatozyten oder des Lebergewebes mittels Guanidiniumisothiocyanat-Puffer (4M Guanidiniumisothiocyanat, 20mM Natriumcitrat, 0,5% N-Laurylsarkosin, 2-Mercaptoethanol) erfolgte die Phenol-Chloroform-Extraktion (wassergesättigtes Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol= 250:49:1 Volumenanteile). Nach einer 30 minütigen Inkubationszeit auf Eis erfolgte die Zentrifugation bei 3000 x g, 30 min, woraufhin die wäßrige Phase abgenommen wurde. Durch Zugabe von Isopropylalkohol (70%) wurde die RNA bei – 20 °C gefällt. Bei 260 und 280 nm wurden durch Messung der optischen Dichte Konzentration und Reinheit der RNA bestimmt. Gleiche Mengen an RNA (20µg) wurden in Probenpuffer (50% Formamid, 2,2M Formaldehyd, 50mM 3-(N-morpholino)propansulfonsäure (pH 7,0), 2,72mg Saccharose, 34µg Bromphenolblau, 0,55µg Ethidiumbromid) aufgelöst, bei 65°C für 30 Minuten denaturiert und mittels Elektrophorese in einem 1,2%igen Agarose-Formaldehyd-Gel aufgetrennt. Danach erfolgte der Transfer der RNA auf eine positiv geladene Nylonmembran (Boehringer, Mannheim) durch Kapillarkräfte. Als Transferpuffer diente 10 x SSC (0,15M Natriumcitrat, 1,5M Natriumchlorid, pH 7,0). Anschließend wurde die RNA durch UV-Bestrahlung (Stratalinker 1800, Stratagene, La Jolla, CA, USA) auf der Membran fixiert.

Die Detektion der mRNA-Transkripte erfolgte durch Hybridisierung mit komplementären DNA (cDNA)-Fragmenten. Als HO-1-cDNA diente ein EcoR I/Hind III Restriktionsfragment

von 0,9 kb Länge (zur Verfügung gestellt von Dr. S. Shibahara, Department of Applied Physiology and Molecular Biology, Tohoku University School of Medicine, Sendai, Japan), welches aus einer Ratten HO-1 – DNA gewonnen wurde.

Im Anschluß an die Hybridisierung mit der HO-1 cDNA wurden die Membranen gewaschen und erneut hybridisiert. Als cDNA dienten die konstitutiv exprimierten Gene für beta-Aktin und Adenosintriphosphat-Synthase (ATP-Synthase), die als Haushaltsgene dienten.

Die cDNA für beta-Aktin wurde mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) gewonnen. Dabei diente genomische Ratten-DNA (Novagen, Madison, WI, USA) als Vorlage. Die folgenden Primer (MWG Biotech, Ebersberg) dienten als Vorlage zur Amplifizierung einer beta-Aktin-cDNA: 5'-GAG CTA TGA GCT GCC TGA CG-3' als *sense-primer* und 5'-AGC ACT TGC GGT CCA CGA TG-3' als *antisense primer*. 50 µl Reaktionsansatz in dünnwandigen PCR-Gefäßen (0,5 ml, Roth) enthielten: 1x PCR-Puffer, 250 µM 2'-desoxynucleotid-5'-triphosphat (dNTP), 50 ng genomische DNA der Ratte, 2 µM *sense primer*, 2 µM *antisense primer*, 2,5 mM Magnesiumchlorid und 1 U Taq Polymerase (Gene Amp RNA PCR Kit, Perkin Elmer, Weiterstadt). Nach einem initialen Denaturierungsschritt von einer Minute Dauer bei 94 °C folgten 35 Zyklen mit je 45 Sekunden DNA-Denaturierung bei 94 °C, 30 Sekunden Primeranlagerung bei 50 °C und 90 Sekunden DNA-Synthese bei 72 °C. In einem weiteren 10 minütigen Inkubationsschritt bei 72 °C erfolgte die Komplettierung der DNA-Synthese.

Eine weitere Aufreinigung der mittels PCR gewonnenen beta-Aktin-DNA-Fragmente erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese (2 % Agarose) zur Bestimmung der Größe des PCR-Produktes sowie einer Agarosegelelextraktion (Quiex Gel Extraction Kit, Qiagen, Hilden).

Die Markierung sowohl des PCR-Produktes als auch der HO-1- und ATP-Synthase- cDNA-Fragmente erfolgte durch die „random-primer-labeling“-Methode mit alpha-[<sup>32</sup>P]-2'-deoxycytidin 5'-triphosphat (alpha-[<sup>32</sup>P]-dCTP, 50µCi, Random Primers Labeling Kit, Life Technologies, Grand Island, NY, USA; Feinberg und Vogelstein 1983). Anschließend wurden die Fragmente über einer Säule aufgereinigt

Die Membranen wurden für mindestens zwei Stunden in Hybridisierungslösung (Rapid Hyb) bei 42°C prähybridisiert, die Hybridisierung mit markierter cDNA erfolgte für mindestens 16 Stunden bei 42°C in der gleichen Hybridisierungslösung. Anschließend wurden die Membranen 2x20min bei 42°C gewaschen (50mM Tris pH 8,6, 1M Natriumchlorid, 2mM EDTA, 1% SDS). Zur autoradiographischen Detektion der gebundenen cDNA wurden die Membranen bei – 70 °C für 4 – 72 Stunden mit einem Röntgenfilm (X-Omat, XAR-5, Eastman Kodak, Rochester, NY, USA) und Verstärkerfolie in Kontakt gebracht. Die Signale

wurden mit Hilfe eines Densitometers (Biorad GS-700 Imaging Densitometer, Biorad, Hercules, CA, USA) ausgewertet und entsprechend den Signalen der Haushaltsgene normalisiert.

## II.7. Western Blot Analyse

Etwa 150 mg des Lebergewebes wurde im Verhältnis 1:10 in einem hypotonen Zellysepuffer (10 mM TRIS pH 7,5, 10 mM NaCl, 10  $\mu$ M EDTA, 0,5 % Triton X-100, 0,02 % Natriumazid, 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid) homogenisiert und 5 min. bei 18 000 x g zentrifugiert. Die Konzentration an löslichem Gesamtprotein im Überstand wurde mittels einer spektralphotometrischen Methode (Protein Assay Kit II, Bio Rad, Hercules, Ca, USA) bestimmt. Das Prinzip dieser Messung beruht auf einer Verschiebung des Absorptionsmaximums einer sauren Lösung von Comassie Brilliant Blau von 465 nm nach 595nm nach Bindung an Proteine (Bradford, 1976). Danach wurden die Proben 5 min. im kochenden Wasserbad in Probenpuffer (62,5 mM TRIS pH 6,8, 2% SDS, 10 % Glycerin, 5 % 2-Mercaptoethanol, 0,0025 % Bromphenolblau) inkubiert, um anschließend durch Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page) unter denaturierenden Bedingungen (NuPAGE SDS Running Buffer, Novex, San Diego, USA) in 12 % Tris-Glycin-Gelen (Novex, Frankfurt) aufgetrennt zu werden. Dabei wurden je 100 $\mu$ g Protein pro Probe geladen. Als Positivkontrolle für HO-1 diente aufgereinigtes rekombinantes HO-1-Protein der Ratte. Der Transfer auf Polyvinylidendifluorid-Membranen (Westran, Schleicher & Schuell, Dassel) erfolgte mittels Elektrophorese (12 mM Tris Base, 96 mM Glycin, pH 8,3). Die Membranen wurden für maximal 48 Stunden bei 4 °C bis zur Antigendetektion aufbewahrt. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch 30 minütige Vorinkubation mit fettfreier Trockenmilch in Tween-haltiger Tris-gepufferter Kochsalzlösung (TTBS, 20 mM Tris pH 7,5, 0,5 M Natriumchlorid, 0,1 % Tween20) abgesättigt. Daraufhin erfolgte die Inkubation der Membranen mit einem polyklonalen Kaninchen-Anti-Ratte HO-1 Primärantikörper (Verdünnung 1:1000; Stress Gen Biotechnologies Corp., Sidney, BC, Canada) 90 min. bei Raumtemperatur. Ungebundener Primärantikörper wurde durch Waschen der Membran mit TTBS entfernt. Anschließend erfolgte eine weitere 90 minütige Inkubation bei Raumtemperatur mit einem Meerrettichperoxidase-gekoppelten Esel-anti-Kaninchen Sekundärantikörper (Verdünnung 1:10 000). Nach wiederholten Waschschritten mit TTBS

erfolgte die Detektion des Antigen-Antikörper-Konjugates mittels Luminol-verstärkter Chemiluminiszenz (ECL Western Blot Analysis System, Amersham Buchler, Braunschweig) gemäß den Angaben des Herstellers. Nach 1-5 minütigem Kontakt der Membranen mit einem Röntgenfilm (Hyperfilm ECL, Amersham Buchler, Braunschweig) einer mit Verstärkerfolie ausgekleideten Röntgenkassette wurde das Signal detektiert und densitometrisch ausgewertet.

## **II.8. Immunhistochemie**

Immunhistochemische Untersuchungen zum Expressionsmuster von HO-1 immunoreaktivem Protein wurden an immersionsfixierten, paraffineingebetteten Schnitten (in neutral gepuffertem, 10%igen Formalin) durchgeführt. Dabei wurden nach Versuchsende etwa 5 mm<sup>3</sup> dicke Gewebeblöcke aus der Leber geschnitten und in 10 %iger phoshatgepufferter Formaldehydlösung fixiert. Nach Einbetten in Paraffin wurden 4-5 µm dicke Schnitte angefertigt (Leica SM 2000 R, Leica, Nußloch). Nach Entparaffinieren mittels Xylen und absteigender Ethanolreihe wurden die Schnitte zunächst in einer Citratpufferlösung (0,01 M Citratpuffer, pH 6,0) in einem Mikrowellengerät 2 x 5 min. zum Kochen erhitzt, um die Antigene aufzuschließen („antigen retrieval“, Evers 1994). Danach erfolgte eine Hemmung der endogenen Peroxidaseaktivität durch Behandlung der Schnitte mit 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / Methanol. Nach Inkubation in Ziegen Serum zur Blockade unspezifischer Bindungsstellen wurden die Schnitte eine Stunde bei 37 °C mit einer HO-1 Primärantikörperlösung (StressGene Biotechnologies Corp., Sidney, BC, Kanada, Kaninchen-anti-Ratte, Verdünnung 1: 200) inkubiert. Die Immundetektion erfolgte mittels eines biotinierten sekundären Ziege-anti-Kaninchen-Antikörpers und anschließender Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Komplex-Färbung. Als Farbreagenzien zur Detektion der Peroxidaseaktivität dienten 3,3-Diaminobenzidin und 3 % Nickelchlorid. Zur Verbesserung der morphologischen Beurteilbarkeit erfolgte die Gegenfärbung der Schnitte mit Hämatoxylin. Als negative Kontrolle dienten Schnitte, die ohne Primärantikörperinkubation identisch behandelt wurden.

## **II.9. Chlorazetatesterase (CAE)-Färbung**

Die CAE-Färbung diente zur Quantifizierung der Akkumulation polymorphkerniger Granulozyten im Lebergewebe. Dazu wurden Gewebeblöcke in 10 %iger Formaldehydlösung

fixiert, in Paraffin eingebettet und anschließend semidünn geschnitten (5  $\mu\text{m}$ ). Der histochemische Nachweis esterasepositiver Leukozyten (0,07 %ige Naphthol-AS Chloracetatlösung in Natriumacetat-Veronal-Puffer) erfolgte nach entparaffinieren der Schnitte in Xylen und absteigender Ethanolreihe. Daraufhin erfolgte eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Die quantitative Auswertung der vaskulären und perivaskulären PMN erfolgte durch lichtmikroskopische Auszählung von je 50 Gesichtsfeldern.

## **II.10. $\alpha$ -Glutathion-S-Transferase-Konzentrationen im Serum**

Zur Beurteilung der hepatozellulären Schädigung wurde das leberspezifische Enzym  $\alpha$ -Glutathion-S-Transferase ( $\alpha$ -GST) bestimmt, welches durch seine besonders hohe Sensitivität in bezug auf den hepatozellulären Schaden und seine kurze Plasmahalbwertszeit gekennzeichnet ist. Dazu wurden zu Versuchsbeginn und nach 5 Stunden Reperfusion bzw. 6 Stunden nach Sham-Operation jeweils Blutproben zur Serumgewinnung entnommen und diese bis zur weiteren Aufarbeitung bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Die Bestimmung der  $\alpha$ -GST-Konzentration im Serum erfolgte in 100  $\mu\text{l}$  eines 1:50 verdünnten Serums mittels eines kommerziell erhältlichen Anti-Ratte- $\alpha$ -GST-ELISA (Hepkit<sup>TM</sup>-alpha, Biotrin international, Dublin, Irland).

## **II.11. Statistische Auswertung**

Die Werte wurden jeweils als Mittelwerte mit Standardfehlern ( $\pm\text{S.E.M.}$ ) dargestellt. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte nach Prüfung auf Normalverteilung (Kolmogorov-Smirnow-Test) und gleiche Varianz (Levene-Median-Test) unter Verwendung eines kommerziellen Softwarepaketes (Sigmastat<sup>TM</sup>, Jandel Scientific, San Rafael, CA, USA). Wenn die Kriterien für parametrische Testung erfüllt waren, wurde beim Vergleich zweier Gruppen der ungepaarte Student-t-Test verwandt. Im Falle des Vergleichs zwischen mehr als zwei Gruppen wurde nach einfaktorieller Varianzanalyse eine post-hoc Testung für multiple Vergleiche mit Hilfe des Student-Newman-Keuls Tests vorgenommen.

Der Vergleich mehrerer Zeitpunkte innerhalb der Gruppen erfolgte mittels Varianzanalyse für verbundene Stichproben und bei Signifikanz mittels post-hoc Student-Newman-Keuls Test.

Für alle statistischen Tests wurde bei einem  $p < 0,05$  von Signifikanz ausgegangen. Alle angegebenen p-Werte sind zweiseitig.

### III. Ergebnisse

#### III.1. Makrohämodynamische Effekte von Scheinoperation oder hämorrhagischem Schock und Volumentherapie

##### III.1.1. Makrohämodynamische Effekte der Scheinoperation

Scheinoperierte Tiere wurden wie Tiere der Schockgruppen präpariert, wurden jedoch keinem hämorrhagischen Schock unterzogen. Sie erhielten während der Dauer des Experimentes lediglich den Erhaltungsbedarf in Form von Ringerazetatlösung. Die Werte der scheinoperierten Kontrolltiere für den mittleren arteriellen Druck (MAD), die Herzfrequenz (HF) sowie die Basendefizitwerte (BE) lagen als Ausdruck einer stabilen Präparation während der gesamten Dauer des Experimentes im Normbereich. Die MAD -, HF – sowie die BE - Werte der scheinoperierten Tiere sind in den Abbildungen 1, 2 und 3 graphisch dargestellt.

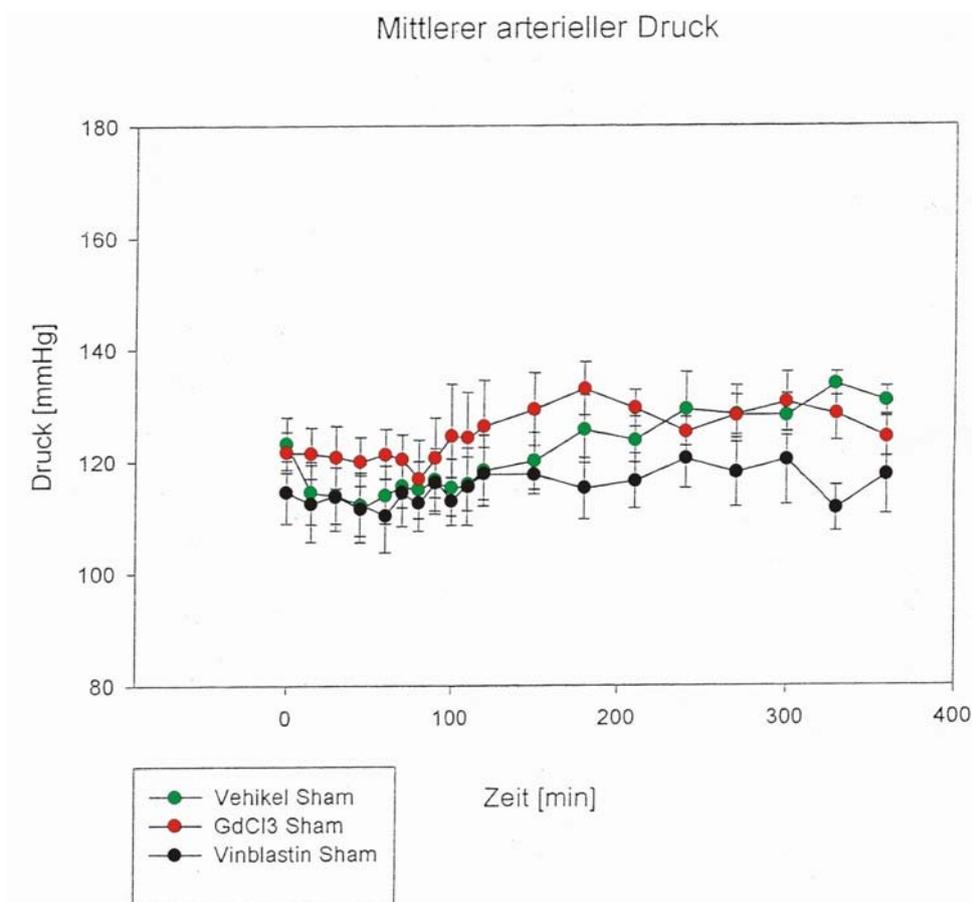


Abb. 1

Abb. 1

## Mittlerer arterieller Druck (MAD)

In der Abbildung sind die Werte des mittleren arteriellen Druckes der scheinoperierten Tiere von jeweils  $n = 6$  Tieren als Liniendiagramm dargestellt. Die Werte sind als Mittelwerte mit Standardfehlern angegeben.

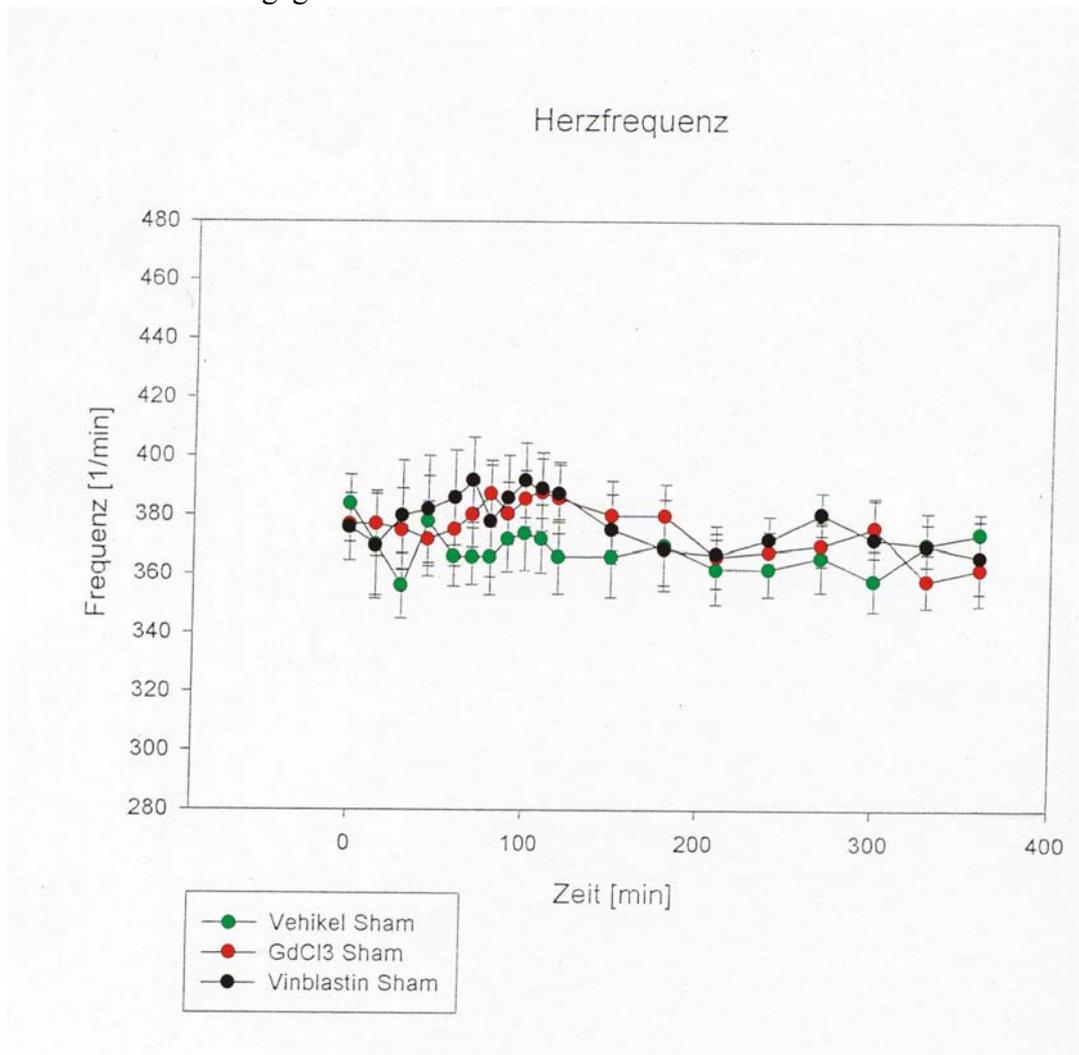


Abb. 2

Abb. 2

## Herzfrequenz (HF)

Die Abbildung zeigt die HF – Werte der scheinoperierten Tiere von jeweils  $n = 6$  Tieren als Liniendiagramm. Die Werte sind als Mittelwerte mit Standardfehlern angegeben.

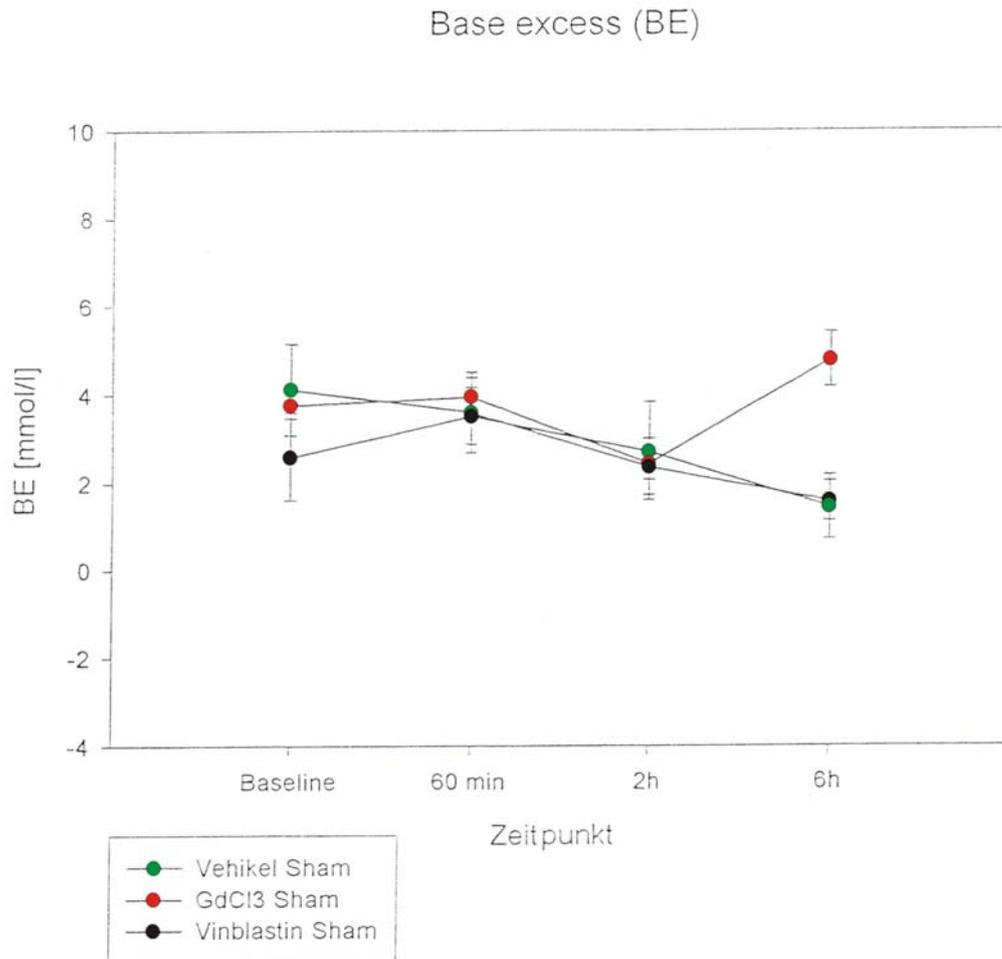


Abb. 3

Abb. 3

### Basendefizit (BE)

In der Abbildung sind die BE - Werte der scheinoperierten Tiere von jeweils  $n = 6$  Tieren als Liniendiagramm dargestellt. Die Werte sind als Mittelwerte mit Standardfehlern angegeben.

### III.1.2. Makrohämodynamische Effekte von Schock und Volumentherapie

Da das Schockmodell druckkontrolliert war, zeigten sich während der Schockphase zwischen den verschiedenen experimentellen Gruppen keine Unterschiede in den Werten für MAD und HF. Nach Ablauf der Schockphase zeigten die Tiere mit den scheinoperierten Tieren vergleichbare MAD – Werte. Nach der Volumentherapie wiesen alle Ratten eine stabile Hämodynamik auf und überlebten die jeweilige Beobachtungszeit bis zu 5 Stunden, was für ein reversibles Schockmodell spricht. Die Erholung des MAD, der HF sowie des BE spricht dafür, daß der Schock bei den Tieren mit Hämorrhagie reversibel und kompensiert war.

In den Abbildungen 4, 5 und 6 sind die Werte für MAD, HF und BE in den verschiedenen experimentellen Schockgruppen aufgezeigt, wobei sich in den verschiedenen Gruppen keine signifikanten Unterschiede in den Werten für MAD und HF zeigten.

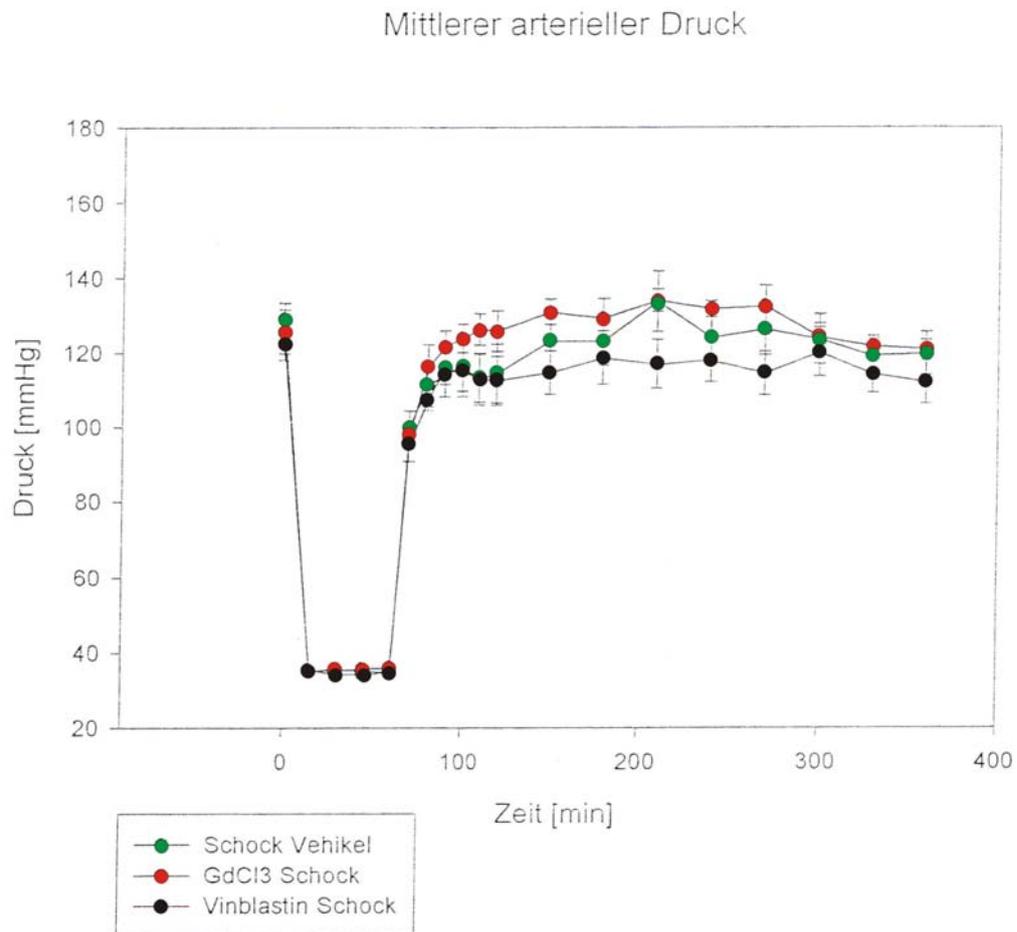


Abb. 4

Abb. 4  
Mittlerer arterieller Druck (MAD)

Die Abbildung zeigt die Werte des MAD in den verschiedenen Schockgruppen (Vehikel – Schock, GdCl<sub>3</sub> – Schock, Vinblastin – Schock) von jeweils n = 6 Tieren als Liniendiagramm. Die Werte sind als Mittelwerte mit Standardfehlern dargestellt.

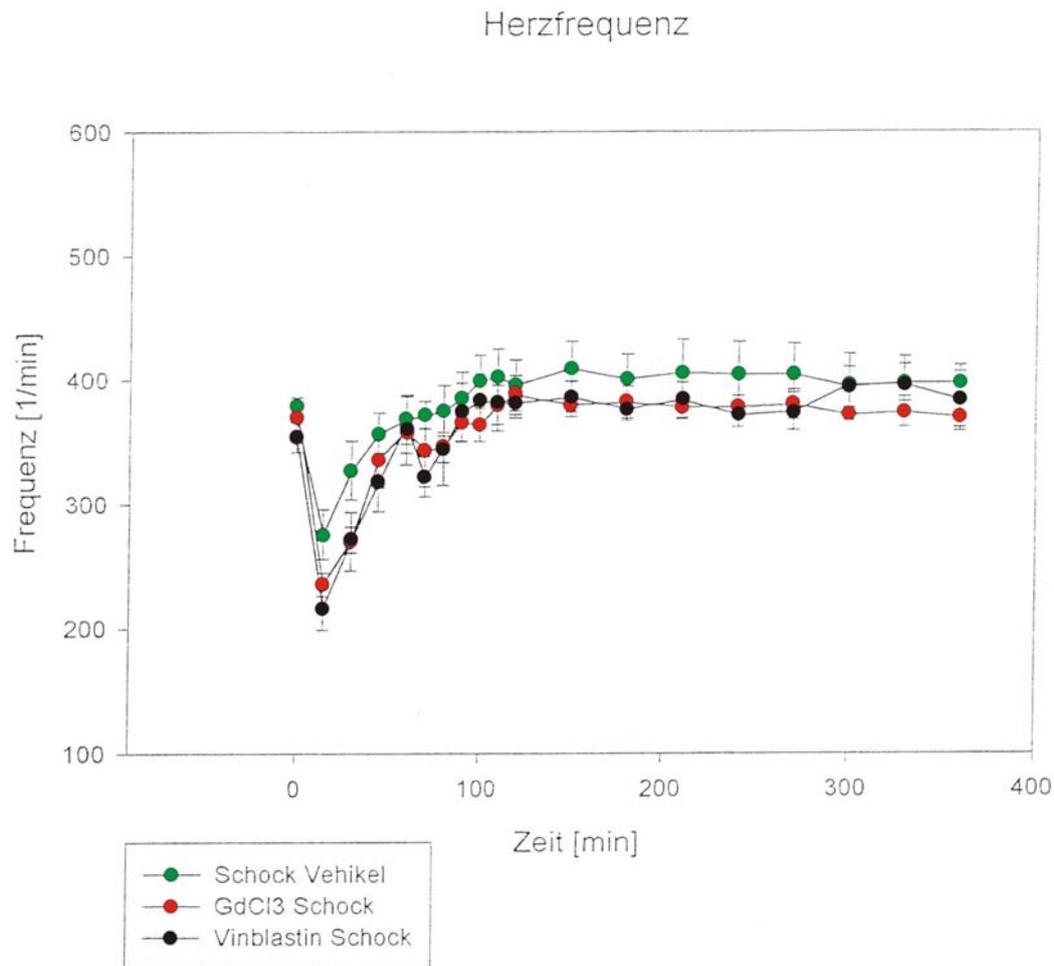


Abb. 5

Abb. 5

## Herzfrequenz (HF)

In der Abbildung sind die Werte der Herzfrequenz der Vehikel – Schock -, GdCl<sub>3</sub> – Schock – sowie Vinblastin – Schockgruppe von jeweils n = 6 Tieren als Liniendiagramm dargestellt. Sie sind als Mittelwerte mit Standardfehlern angegeben.

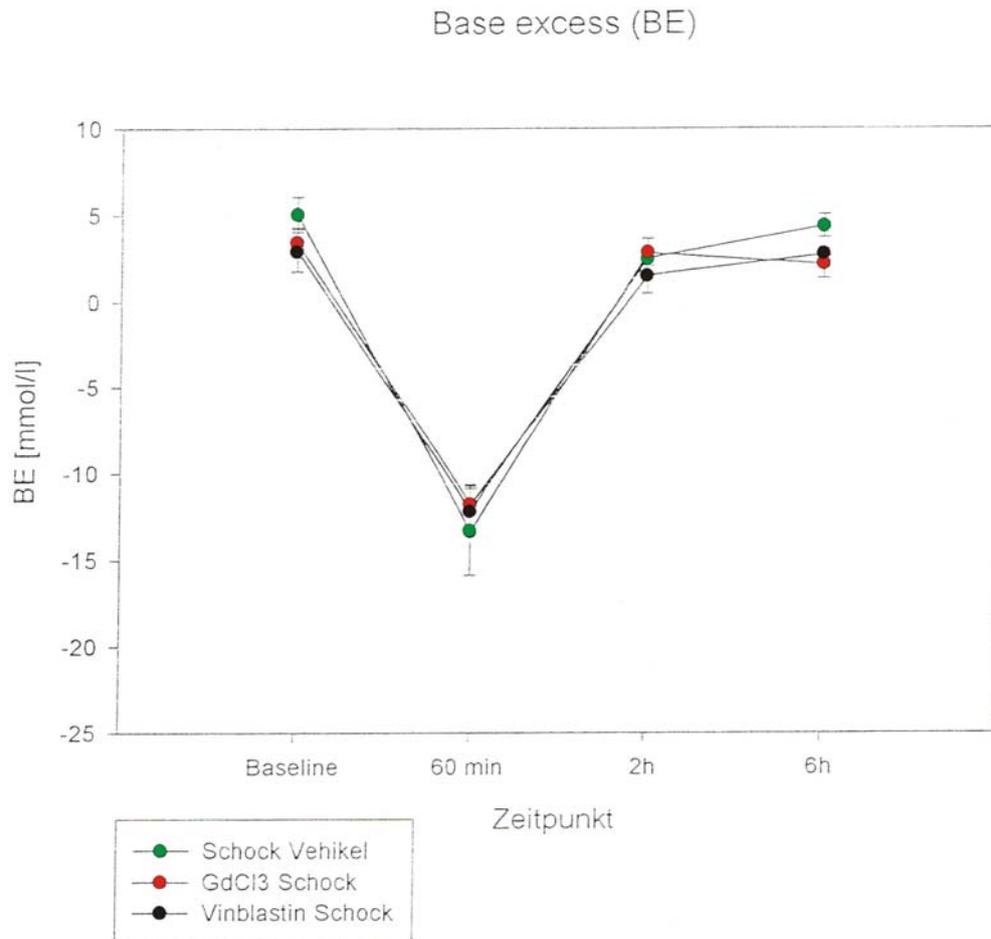


Abb. 6

Abb. 6  
Basendefizit (BE)

In der Abbildung sind die Werte des Basendefizites der Vehikel – Schock -, GdCl<sub>3</sub> – Schock – sowie Vinblastin – Schockgruppe von jeweils n = 6 Tieren dargestellt. Die Werte sind als Mittelwerte mit Standardfehlern angegeben

Die folgende Abbildung zeigt die Basendefizitwerte der scheinoperierten Kontrollen nach einer Stunde des Experimentes sowie die Werte der verschiedenen Schockgruppen am Ende der Schockphase.

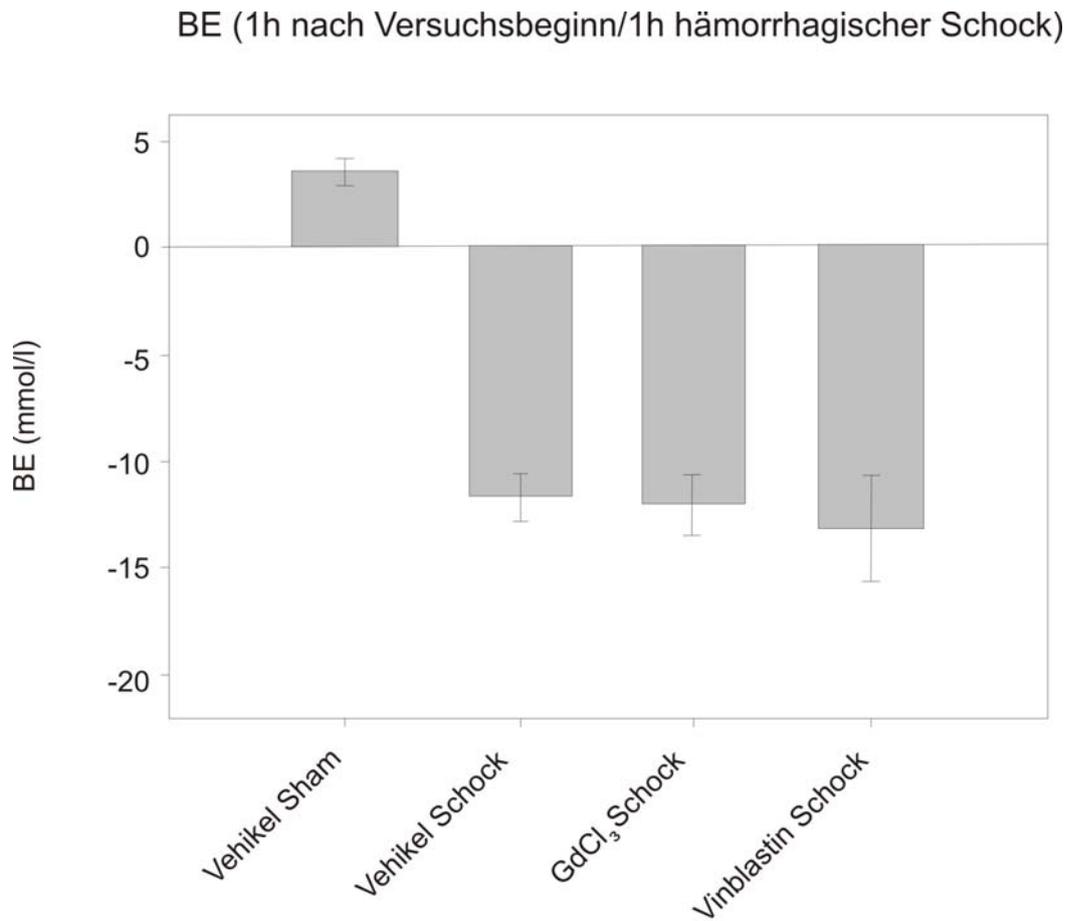


Abb. 7

Abb. 7

Basendefizit (BE)

Dargestellt sind die BE – Werte nach einer Stunde Scheinoperation und nach einer Stunde hämorrhagischen Schock als Mittelwerte mit Standardfehlern von je n = 6 Tieren.

Um während der einstündigen Schockphase einen mittleren arteriellen Druck von 35 mmHg zu erreichen und aufrechtzuerhalten, war die Entnahme gleicher Blutvolumina erforderlich.

Abbildung 8 zeigt die entnommenen Blutvolumina der verschiedenen Schockgruppen im Vergleich. Sie waren nicht signifikant verschieden.

### Entnommenes Blutvolumen

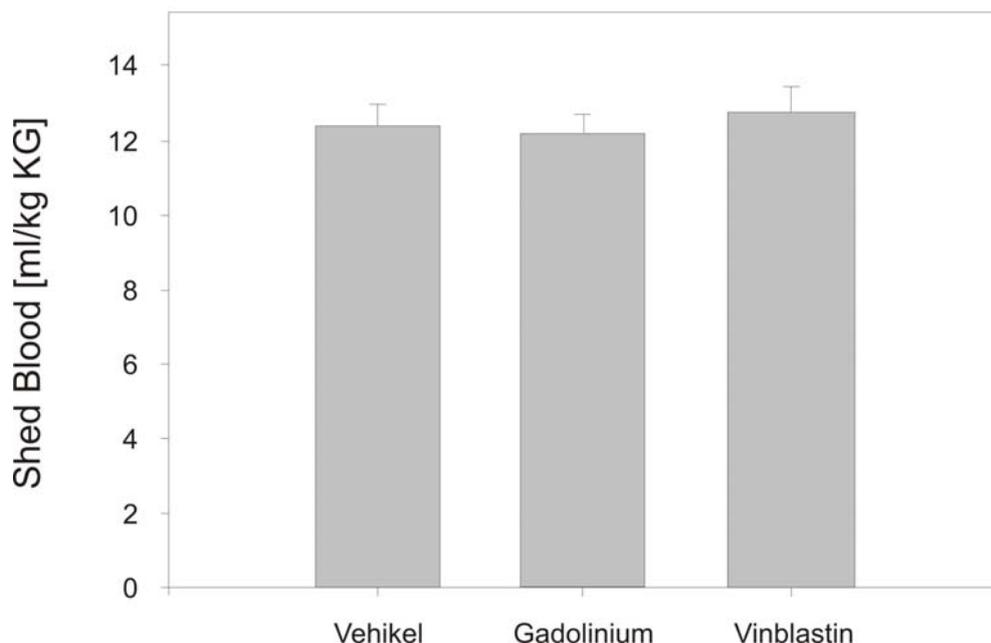


Abb. 8

Abb. 8

Entnommenes Blutvolumen in ml/kg KG

### III.2. Einfluss der Vorbehandlung mit Gadoliniumchlorid und Vinblastin auf die Infiltration mit Leukozyten nach Schock und Volumentherapie

Mittels Choracetatesterase (CAE) – Färbung wurden das Leberparenchym infiltrierende Leukozyten angefärbt. Esterase – positive Leukozyten wurden an Semidünnschnitten durch lichtmikroskopische Auszählung aus je 50 Gesichtsfeldern bestimmt. Im Vergleich zu den Tieren der scheinoperierten Kontrollgruppe (Vehikel – Sham) führten hämorrhagischer Schock und Reperfusion zu einer fast zweifachen Zunahme an infiltrierenden polymorphkernigen Granulozyten (PMN) innerhalb dieser Gruppe (Vehikel – Schock).

In einer weiteren Versuchsgruppe wurde scheinoperierten Tieren und Tieren, die einem Schockprotokoll unterworfen wurden, 24 Stunden vor Versuchsbeginn Gadoliniumchlorid appliziert. Bei diesen Gruppen zeigte sich, dass die vorherige Behandlung mit Gadoliniumchlorid die Infiltration mit PMN vermindert.

Nach der Applikation von Vinblastin 5 Tage vor dem Sham – bzw. Schock – Protokoll konnte gezeigt werden, dass die Vorbehandlung mit Vinblastin vollständig den durch Schock und

Reperfusion verursachten Anstieg an extravaskulären Leukozyten verhinderte. Die durch Vinblastin hervorgerufene Depletion neutrophiler Granulozyten wurde zusätzlich durch Auszählung zirkulierender Neutrophiler bestätigt (Vehikel:  $8,4 \pm 1,4$ ;  $GdCl_3$ :  $13,1 \pm 1,6$ ; Vinblastin:  $1,4 \pm 0,3 \times 10^3$  Zellen /  $\mu l$ ;  $P < 0,05$ ).

Zwei scheinoperierte Tiere erhielten 6 Stunden vor der Gewinnung des Lebergewebes fMLP, was zu einem massiven Anstieg der Infiltration esterasepositiver Leukozyten im Gewebe führte. Daher dienten diese Tiere als Positivkontrollen.

In der folgenden Abbildung 9 sind die Ergebnisse dargestellt.

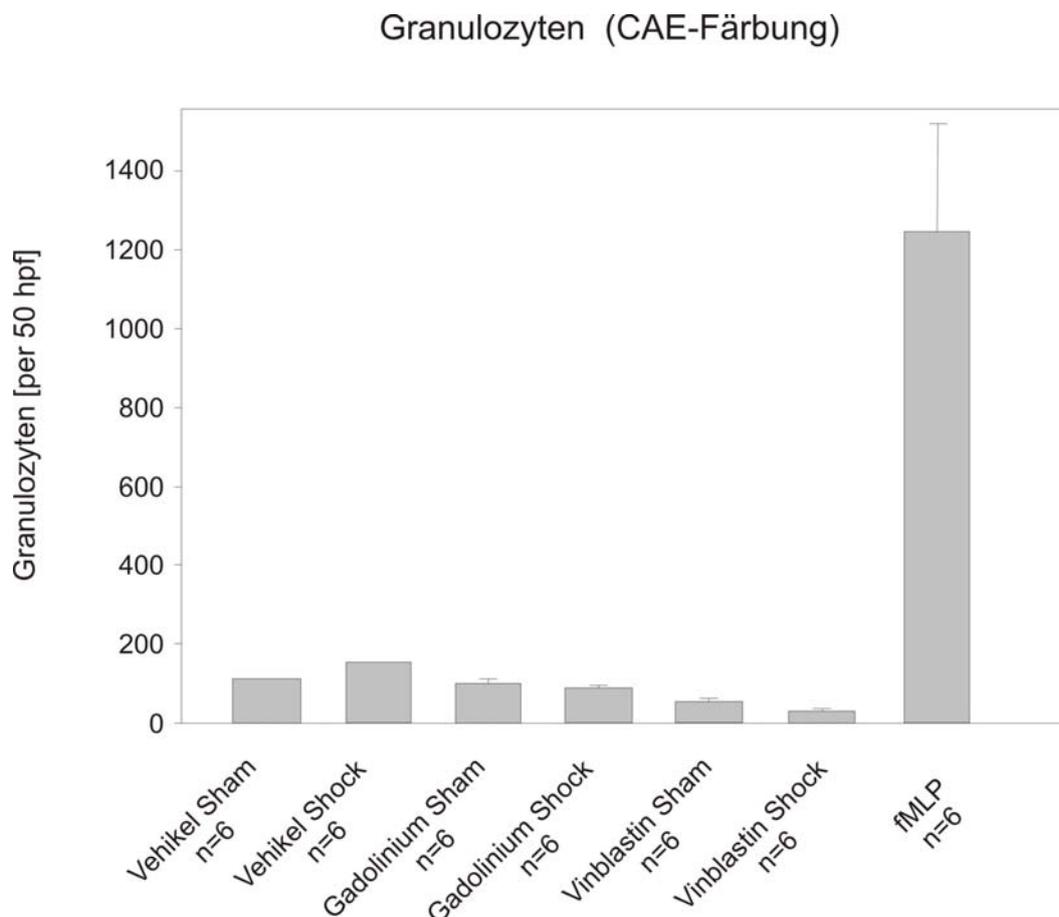


Abb. 9

Abb. 9

Einfluß von Gadoliniumchlorid und Vinblastin auf die Infiltration mit PMN nach Schock und Reperfusion bzw. nach sechsständiger Scheinoperation.

Dargestellt ist die Zu – bzw. Abnahme parenchymatöser esterasepositiver Leukozyten nach Schock und Reperfusion im Vergleich zu einem Scheinoperations – Protokoll, jeweils nach Gabe von Gadoliniumchlorid, Vinblastin oder anhand von Vehikel – Kontrollen mit jeweils n = 6 – 10 Tieren pro Gruppe. Die Werte sind als Mittelwerte mit Standardfehler angegeben.

### III.3. Zeitlicher Verlauf der HO-1 Genexpression nach hämorrhagischem Schock und Reperfusion

Die Lebern zur Untersuchung des zeitlichen Verlaufes der HO – 1 Genexpression wurden den scheinoperierten Tieren und den Tieren, die einem hämorrhagischen Schock mit Volumentherapie unterzogen wurden, zu unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen (zu Versuchsbeginn sowie nach 6 und 24 Stunden nach Versuchsbeginn). Die Bestimmung der HO – 1 Genexpression erfolgte mittels Northern Blot Analyse.

Bei scheinoperierten Kontrolltieren zeigte sich am Ende des Versuches eine geringe Induktion von HO – 1. Bei den Tieren, die das Schockprotokoll durchliefen, zeigte sich 6 Stunden nach Versuchsbeginn eine deutliche Zunahme der HO – 1 Genexpression im Vergleich zu den Kontrolltieren. Nach 24 Stunden waren die Werte der HO – 1 Genexpression noch leicht erhöht, aber im Vergleich zu den 6 Stunden Werten wieder deutlich abgefallen.

Die folgende Abbildung 10 zeigt repräsentative Blots von gepoolter RNA (n = 3)

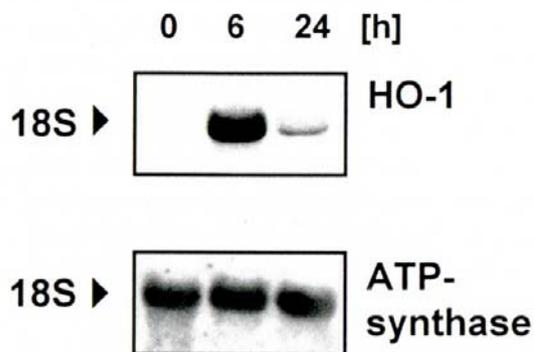


Abb. 10

Abb. 10

Zeitlicher Verlauf der HO – 1 Genexpression nach hämorrhagischen Schock und Volumentherapie

Die obere Abbildung zeigt die gepoolte RNA 0, 6 und 24 Stunden nach Versuchsbeginn (20 µg/lane, n = 3 Tiere zu jedem Zeitpunkt). Auf der unteren Abbildung erkennt man die Expression der ATP- Synthase.

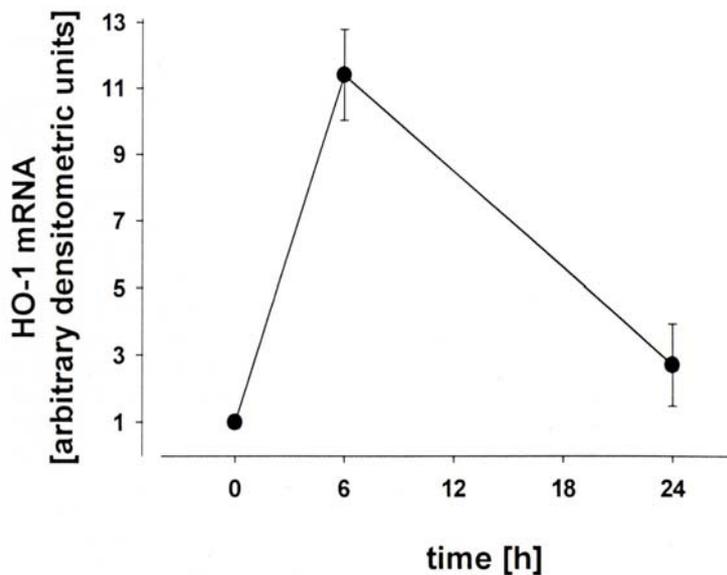


Abb. 11

Abb. 11

Densitometrische Auswertung der HO – 1 Genexpression

Die densitometrischen Daten wurden auf das Signal der ATP – Synthase normalisiert. Sie sind dargestellt als Mittelwerte mit Standardfehlern (n = 3 Tiere für jede Bedingung).

#### **III.4. Einfluss von Neutrophilen Granulozyten und Kupfferzellen auf die HO – 1 Genexpression nach hämorrhagischem Schock und Reperfusion**

Nach Vorbehandlung der Tiere mit Gadoliniumchlorid oder Vinblastin wurden je 6 – 10 Tiere pro Untersuchungsgruppe entweder scheinoperiert oder einem Schockprotokoll mit Reperfusion unterzogen. Gadoliniumchlorid diente dabei zur Kupfferzellblockade und Vinblastin zur Depletion von Leukozyten. Daneben dienten unbehandelte scheinoperierte oder geschockte Tiere als Kontrollen. fMLP wurde den Tieren verabreicht, die als positive Kontrollen der Infiltration mit aktivierten PMN dienen sollten. 6 Stunden nach Beginn des Versuches wurden die Lebern isoliert und die HO – 1 mRNA mittels Northern Blot Analyse bestimmt.

Bei diesen Versuchen zeigte sich, dass der Anstieg der HO – 1 Genexpression nach Schock und 5 Stunden Reperfusion im Vergleich zu scheinoperierten Kontrolltieren durch die vorherige Gabe von Gadoliniumchlorid ausblieb. Vinblastin hingegen hatte keinen nennenswerten Effekt auf die hepatozelluläre HO-1-Genexpression. Die durch fMLP

hervorgerufene Zunahme an aktivierten Leukozyten führte nur zu einer geringfügigen Zunahme an HO-1 mRNA.

In den folgenden Abbildungen 12 und 13 sind die Ergebnisse dargestellt.

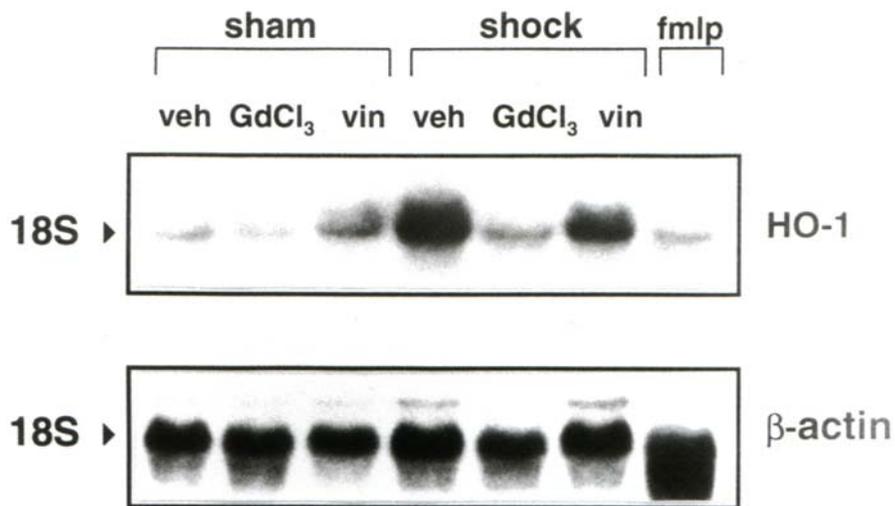


Abb. 12

Abb. 12

Dargestellt sind Northern Blots nach Hybridisierung mit HO - 1 cDNA (oberer Teil der Abbildung) oder β - Aktin cDNA (unterer Teil der Abbildung) 6h nach Beginn der Scheinoperation (Sham) bzw. Schock und Reperfusion (Schock). ( n = 6 - 10 Tiere pro Gruppe.)

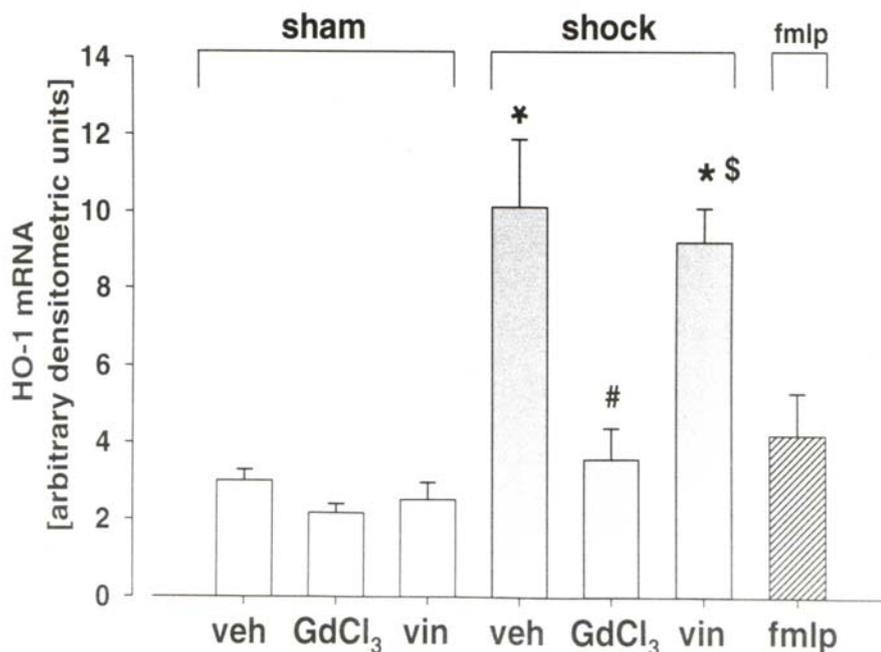


Abb. 13

Abb. 13

Die Abbildung zeigt die densitometrische Auswertung der HO – 1 Genexpression 6 Stunden nach Versuchsbeginn für scheinoperierte Tiere und Tiere, die ein Schockprotokoll durchliefen, für je  $n = 6 - 10$  Tiere pro Gruppe, dargestellt als Mittelwerte mit Standardfehlern. Die Daten sind auf das Signal von  $\beta$  - Aktin normalisiert.

Ein der Vorbehandlung mit Gadoliniumchlorid vergleichbarer Effekt auf die HO – 1 Genexpression zeigte sich nach Behandlung der Tiere mit liposomalem Dichlormethylendiphosphonat (Cl<sub>2</sub>MDP) 2 Tage vor Versuchsbeginn. Cl<sub>2</sub>MDP diente wie GdCl<sub>3</sub> zur Kupfferzellblockade und führte auch zur Reduktion der HO – 1 Genexpression nach Schock und Volumentherapie (densitometrische Einheiten für die HO – 1 mRNA: Vehikel Schock  $3,4 \pm 0,6$ ; Cl<sub>2</sub>MDP Schock  $1,2 \pm 0,2$ ).

Durch Western Blot Analyse konnte gezeigt werden, daß Gadoliniumchlorid nicht nur zu einer Reduktion von HO – 1 mRNA, sondern auch zu einer verminderten Konzentration an immunreaktivem HO – 1 Protein in der Leber führte. Dazu wurde den Tieren die Leber 6 Stunden nach Versuchsbeginn entnommen, Protein isoliert und das HO – 1 Protein mittels Western Blot Analyse nachgewiesen.

In Abbildung 14 ist ersichtlich, dass bei den mit Gadoliniumchlorid vorbehandelten Tieren eine signifikant verminderte Menge an HO-1-Protein nachgewiesen werden konnte.

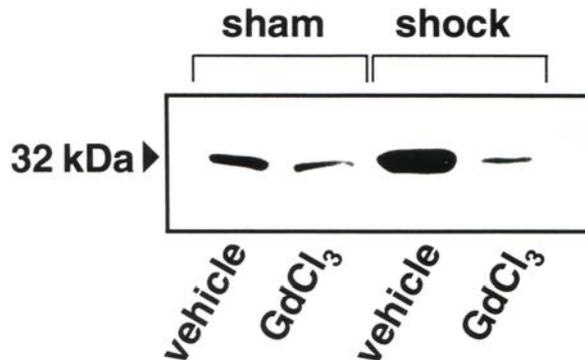


Abb. 14

Abb. 14

Western Blot Analyse

Dargestellt ist der Einfluß der Kupfferzellblockade durch GdCl<sub>3</sub> nach Scheinoperation und hämorrhagischem Schock und Reperfusion 6 Stunden nach Versuchsbeginn auf die Expression des HO – 1 Proteins für jeweils n = 6 – 10 Tiere pro Versuchsgruppe.

### III.5. Einfluss von freien Sauerstoffradikalen auf die HO – 1 Genexpression nach hämorrhagischem Schock und Reperfusion

Um zu untersuchen, ob Kupfferzellen und PMN durch die Bildung freier Sauerstoffradikale die Expression des HO – 1 Gens beeinflussen, wurden den Tieren vor der Volumentherapie verschiedene Antioxidantien verabreicht. Dabei handelte es sich um die chemisch unterschiedlichen Substanzen NAC (N – Acetylcystein), DFO (HES – DFO) und das Vitamin E Analogon Trolox. Es kam durch die Applikation dieser Antioxidantien zu einer etwa 40 – 60 % igen Reduktion der HO – 1 Genexpression auf mRNA Ebene. Unter scheinoperierten Bedingungen kam es nur zu einer geringen Expression von HO-1 mRNA, während bei den Tieren, die das Schockmodell durchliefen, eine deutliche Induktion der HO-1 zu verzeichnen war. Nach Applikation des Antioxidans HES-DFO sank die HO-1 Expression auf etwa 60%. Unter einer alleinigen Applikation von HES wurde die HO-1 unter Schockbedingungen verstärkt exprimiert. Dies spricht dafür, dass nicht die Trägersubstanz HES, sondern das DFO für die antioxidative Wirkung verantwortlich ist. Zu einer noch stärkeren Hemmung der HO-1

Expression auf etwa 50% kam es nach Applikation von NAC. Die Applikation von Trolox führte zur stärksten Hemmung der HO-1 Expression auf etwa 32%.

Dargestellt sind die Ergebnisse in folgender Tabelle 1.

	Densitometrische Einheiten
Kontrolle	1,2 ± 0,4
Vehikel Schock	14,9 ± 1,0
HES Schock	13,7 ± 0,9
HES-DFO Schock	8,8 ± 0,7
NAC Schock	8,3 ± 0,7
Trolox Schock	4,8 ± 1,0

Tab. 1

Tab. 1

Einfluß verschiedener Antioxidantien auf die HO – 1 Genexpression nach hämorrhagischem Schock und Reperfusion. Die Daten sind als Mittelwerte mit Standardfehlern für je n = 4 – 5 Tiere pro Gruppe dargestellt.

### III.6. Immunhistochemische Untersuchung der HO – 1 Genexpression

Immunhistochemische Untersuchungen an Leberschnitten mit einem polyklonalen Kaninchen - Anti – Ratte HO – 1 Antikörper zeigten nach Schock und Reperfusion eine *de novo* Synthese an immunreaktivem HO – 1 Protein in parenchymatösen Zellen der perizentralen Region und der Übergangszone. Diese *de novo* Synthese von HO – 1 Protein in Hepatozyten wurde durch Kupfferzellblockade mittels Gadoliniumchlorid verhindert. Vergleichbar zu den Ergebnissen auf mRNA – und Protein – Ebene kam es nach Applikation von Gadoliniumchlorid zur Kupfferzellblockade zu einer signifikanten Verminderung dieser *de novo* - Synthese in Hepatozyten unter Schockbedingungen.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung 15 dargestellt.

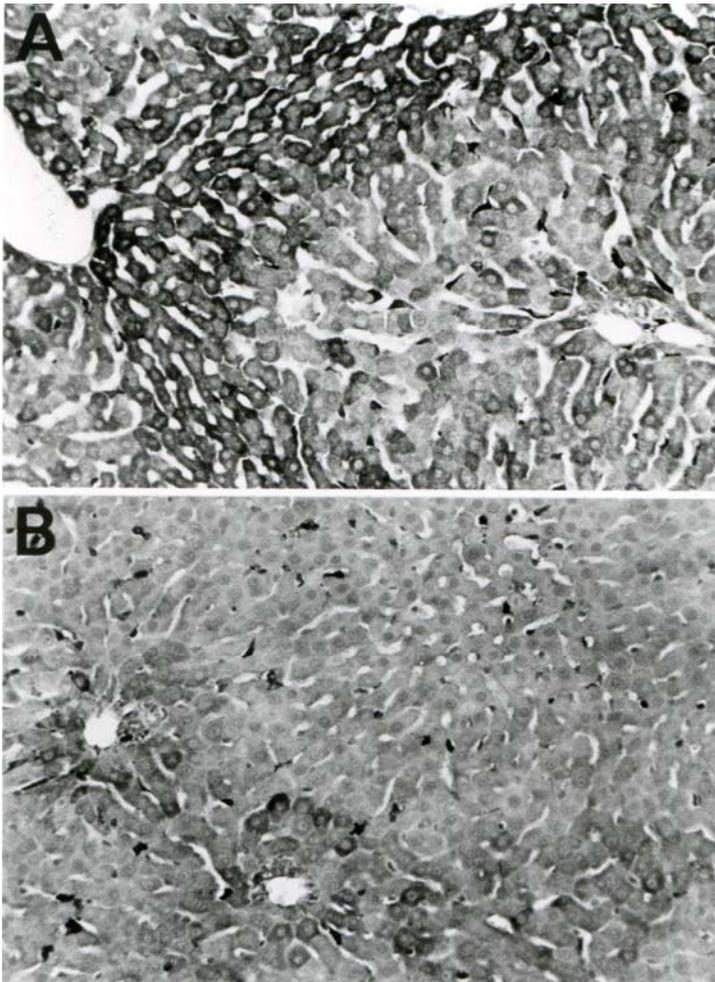


Abb. 15

Abb. 15

Einfluß der Kupferzellblockade auf das zelltypspezifische und azinäre Expressionsmuster von immunreaktivem HO – 1 Protein nach Schock und Reperfusion ohne und nach Gabe von Gadoliniumchlorid

Nach Verabreichung der Antioxidantien NAC, HES – DFO und Trolox vor der Reperfusion konnte die Bildung von immunreaktivem HO – 1 Protein in Hepatozyten der perizentralen Region und der Übergangszone in ähnlichem Ausmaß vermindert werden. Dies ist in Abbildung 16 gezeigt.

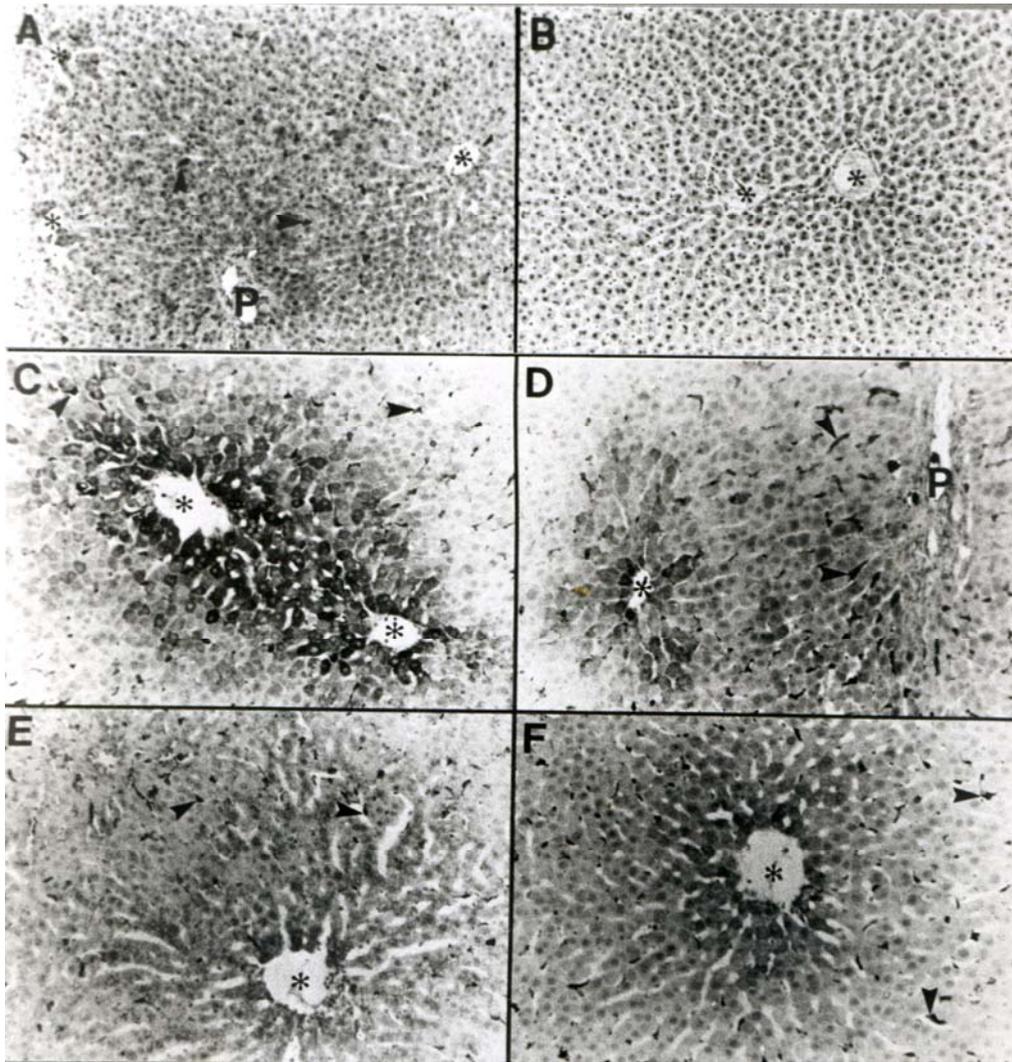


Abb. 16

Abb. 16

Einfluß von Antioxidantien auf das Expressionsmuster des HO – 1 Proteins

In scheinoperierten Kontrollen erfolgte die Expression des HO – 1 Proteins fast ausschließlich in nichtparenchymatösen Zellen der periportalen Zone (A). Nach hämorrhagischem Schock und Reperfusion erfolgte eine *de novo* Synthese des HO – 1 Proteins in Hepatozyten der perizentralen Zone und der Übergangszone sowie 5 Stunden nach Reperfusion eine Zunahme der Synthese in nichtparenchymatösen Zellen (C). Nach Vorbehandlung der Tiere mit den Antioxidantien DFO (D), NAC (E) und Trolox (F) zu Beginn der Reperfusionsphase wurde eine reduzierte Synthese des HO – 1 Proteins vor allem in parenchymatösen Zellen der perizentralen Region und der Übergangszone erkennbar, ähnlich der Kupfferzellblockade durch Gadoliniumchlorid. Abbildung B zeigt eine negative Kontrolle (ohne primären Antikörper).

### III.7. Einfluss von Gadoliniumchlorid und Vinblastin auf die HO – 1 mRNA Induktion in isolierten Hepatozyten

Um den substanzspezifischen Einfluß von Gadoliniumchlorid und Vinblastin auf die Expression des HO – 1 Gens zu untersuchen, wurden in Kontrollexperimenten primäre Hepatozytenkulturen 6 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen dieser Stoffe inkubiert. Für GdCl<sub>3</sub> wurden Konzentrationen von 1, 10 oder 100 mg/l, für Vinblastin Konzentrationen von 0,05, 0,5 oder 5 mg/l gewählt. Diese Konzentrationen entsprachen ungefähr dem 0,1 -, 1 - oder 10 - fachen der *in vivo* erreichten Plasmakonzentrationen. Parallel dazu wurden Hepatozytenkulturen in Anwesenheit der jeweiligen Konzentration an GdCl<sub>3</sub> oder Vinblastin oxidativem Streß ausgesetzt. Dazu wurden sie mit 300 µM Cobaltchlorid behandelt.

Hierbei zeigte sich nach Northern Blot Analyse, daß weder GdCl<sub>3</sub> noch Vinblastin zu einer Induktion des HO – 1 Gens führten. Cobaltchlorid hingegen führte, unbeeinflusst von Gadoliniumchlorid oder Vinblastin, zu einer deutlichen Zunahme der HO – 1 mRNA.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung 17 dargestellt.

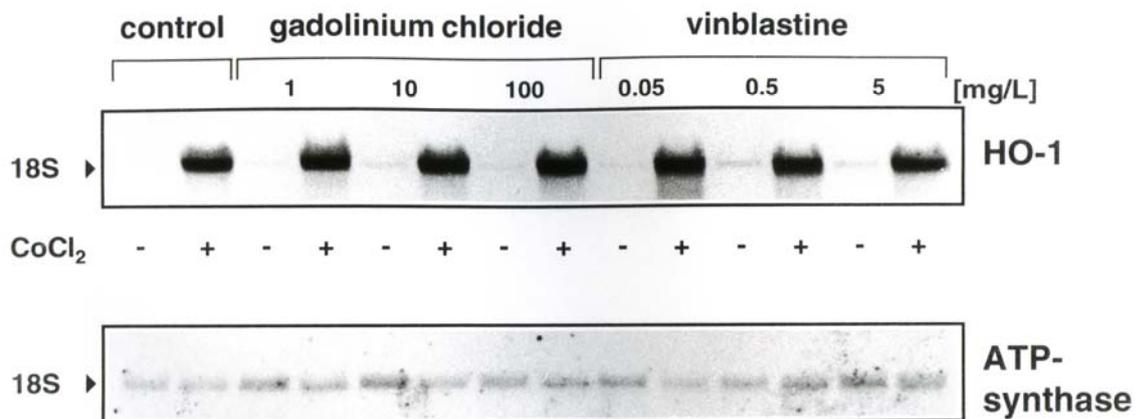


Abb. 17

Abb. 17

Substanzspezifischer Effekt von GdCl<sub>3</sub> und Vinblastin auf die HO – 1 mRNA Induktion unter oxidativen Stressbedingungen

Die Blots zeigen gepoolte mRNA von je n = 3 Experimenten pro Gruppe. Die Werte sind auf das Signal der ATP – Synthase normalisiert.

### III.8. Hepatozellulärer Schaden nach Hämorrhagie und Reperfusion

Um den hepatozellulären Schaden nach hämorrhagischem Schock und Reperfusion zu beurteilen, erfolgte die Bestimmung des  $\alpha$  - GST Wertes im Serum von scheinoperierten Tieren sowie von Tieren, die ein Schockprotokoll durchliefen. Des weiteren wurden scheinoperierte und geschockte Tiere mit  $GdCl_3$  und Vinblastin behandelt und deren  $\alpha$  - GST Wert im Anschluß an den Versuch bestimmt. Dabei konnte gezeigt werden, daß Hämorrhagie und Reperfusion im Vergleich zu Kontrolltieren zu einer signifikanten Zunahme des  $\alpha$  - GST Wertes im Serum führten. Während die Vorbehandlung der Tiere mit  $GdCl_3$  wie oben beschrieben zu einer Reduktion der HO - 1 Genexpression führte, kam es hierbei im Vergleich zu Vehikel - Kontrollen und mit Vinblastin behandelten Tieren zu einer deutlichen Zunahme des  $\alpha$  - GST Wertes, was als Zeichen eines erhöhten hepatozellulären Schadens gewertet werden kann.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung 18 dargestellt

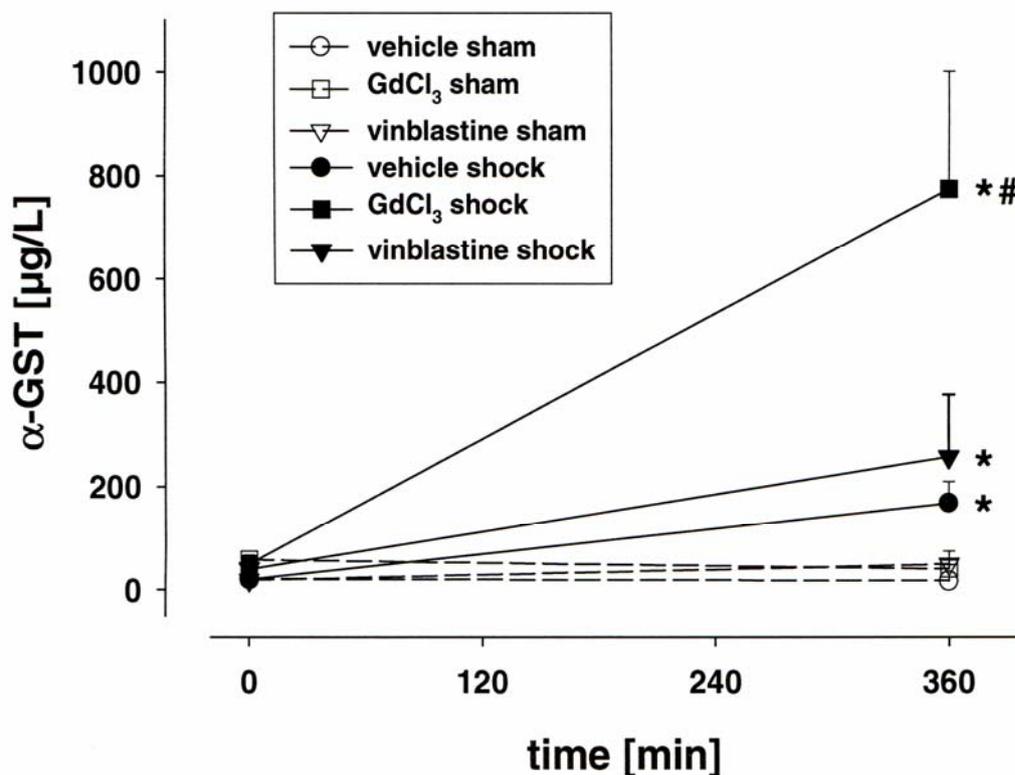


Abb. 18

Abb. 18

Graphische Darstellung der  $\alpha$ -GST-Werte nach hämorrhagischem Schock und Volumentherapie oder Scheinoperation (die Werte sind dargestellt als Mittelwerte mit Standardfehlern für jeweils n = 6-10 Tiere pro Versuchsgruppe)

## **IV. Diskussion**

Die Hämoxigenase-1 ist ein wichtiges induzierbares Stressgen, welches den hepatozellulären Schaden nach Hämorrhagie und Reperfusion mildert. In der vorliegenden Arbeit wurden die unterschiedlichen Funktionen von Kupfferzellen und neutrophilen Granulozyten als parakrine Regulatoren der Expression der Hämoxigenase-1 nach hämorrhagischem Schock und Reperfusion in Leberparenchymzellen untersucht.

### **IV.1. Modell des hämorrhagischen Schocks und makrohämodynamische Parameter**

Die Sequenz Ischämie und Reperfusion stellt eine der wichtigsten zur durch Sauerstoffradikale bedingten Organschädigung führenden pathophysiologischen Bedingungen dar. Bei ischämischen Ereignissen werden dabei sogenannte „kalte Ischämien“, beispielsweise in der Transplantationschirurgie, von sogenannten „warmen Ischämie“, wie sie im Rahmen von Schockereignissen auftreten, unterschieden.

Im Rahmen des hämorrhagischen Schocks besteht ein Restblutfluss („low-flow“- Ischämie), der in dem gewählten Schockmodell etwa ein Drittel des Normalblutflusses beträgt (Pannen 1997). Vergleichbare experimentelle Modelle des hämorrhagischen Schocks können in Modelle mit einer definierten hämorrhagischen Hypotension („fixed pressure“), mit definiertem Blutentzug („fixed volume“) oder mit definiertem physiologischen Endpunkt (beispielsweise dem Stadium der beginnenden Dekompensation oder dem Erreichen eines vorgewählten Basendefizites) eingeteilt werden. Darüber hinaus werden heparinisierte und nicht-heparinisierte sowie anästhesierte und nicht-anästhesierte Modelle unterschieden (Chaudry 1993 b). Als Anästhetikum wurde in diesen Untersuchungen die Pentobarbitalmonoanästhesie gewählt, welches sich durch eine gute Steuerbarkeit und eine gute hämodynamische Stabilität im hämorrhagischen Schockmodell an der Ratte auszeichnet (Bühren 1989, Rose 1991).

Zusammenfassend handelt es sich bei dem vorliegenden Schockmodell demnach um ein druckgesteuertes, nicht-heparinisiertes modifiziertes Wiggers Schockmodell (Wiggers 1942). In den vorliegenden Untersuchungen lagen die Werte für den mittleren arteriellen Druck (MAD), die Herzfrequenz (HF) und des Basendefizites (BE) der scheinoperierten Tiere während des gesamten Versuches im Normbereich. Lediglich in den mit Gadoliniumchlorid

behandelten Tieren fand sich am Ende des sechsständigen Versuches eine minimale Zunahme des Basendefizitwertes, wobei dieser dennoch innerhalb der physiologischen Grenzen blieb. Dies spricht für eine minimale Beeinträchtigung der Tiere durch die Präparation und eine ausreichende Deckung des basalen Flüssigkeitsbedarfes durch Ringerazetatlösung.

Die Werte für den mittleren arteriellen Druck lagen entsprechend dem druckkonstanten Schockmodell bei den Tieren mit hämorrhagischem Schock und Reperfusion während der 60-minütigen Schockphase bei etwa 35 mmHg. Zur Aufrechterhaltung des Zieldruckes von 35 mmHg waren während der gesamten Schockphase weitere fraktionierte Blutentnahmen nötig, damit endogene Kompensationsmechanismen zur Erhöhung des MAD überwunden werden konnten. Das spricht dafür, dass es bei dem vorliegenden Schockmodell nicht zu einer kardiovaskulären Dekompensation der Tiere kam. Am Ende des hämorrhagischen Schocks waren die Basendefizit-Werte der einzelnen Schockgruppen vergleichbar. Dies spricht für einen vergleichbaren hämorrhagischen Insult in den einzelnen Schockgruppen.

Eine Stunde nach Beginn der Volumentherapie sowie im weiteren Verlauf bis zum Ende des Versuches lagen die Werte des MAD, der Herzfrequenz und des Basendefizites bei den Tieren der einzelnen Schockgruppen im Normbereich, was für eine ausreichende Flüssigkeitszufuhr sowie ein voll reversibles Schockmodell spricht. Auch hier waren die Basendefizit-Werte der mit Gadoliniumchlorid vorbehandelten Tiere minimal erhöht, lagen jedoch innerhalb der physiologischen Grenzen.

Bei dem vorliegenden Schockmodell handelt es sich aufgrund der kurzen Schockdauer von 60 Minuten und der adäquaten Volumentherapie um ein kliniknah gestaltetes Modell. Durch die Retransfusion mit 60% des entzogenen Blutvolumens und Ringerazetatlösung entsprechend dem dreifach entzogenen Blutvolumen kam es bei den Versuchstieren zu einer leichten Hämodilution mit Hämatokritwerten zwischen 25 und 30% bzw. Hämoglobinwerten zwischen 8 und 9 g/dl, wie sie nach überlebtem Schockereignis heute klinisch angestrebt werden (Bauer 1996b, Pannen 1997). Bei dem vorliegenden Schockmodell handelt es sich daher um ein kompensiertes, voll reversibles und kliniknah therapiertes Modell.

## **IV.2. Hepatozellulärer Schaden nach hämorrhagischem Schock und Volumentherapie**

Zur Beurteilung des hepatozellulären Schadens nach hämorrhagischem Schock und Reperfusion wurden die  $\alpha$ -Glutathion-S-Transferase ( $\alpha$ -GST) - Werte im Serum von scheinoperierten Tieren sowie Tieren, die das Schockprotokoll durchliefen, zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. In neueren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass  $\alpha$ -GST im Vergleich zu den klassischen Schädigungsparametern Glutamat-Oxalazetat-Transaminase (GOT bzw. AST) und Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT bzw. ALT) wesentlich spezifischer und sensitiver zur Erfassung einer hepatozellulären Schädigung ist. Zudem zeichnet sich die  $\alpha$ -GST durch eine kurze Plasmahalbwertszeit und eine homogene Verteilung in der Leber aus (Redl, 1995).

Bei den scheinoperierten Kontrolltieren zeigte sich nach 6 Stunden kein signifikanter Anstieg der  $\alpha$ -GST - Serumkonzentration im Vergleich zu den Ausgangswerten, was neben einer stabilen Hämodynamik auch für eine stabile Präparation spricht.

Bei den Tieren, die das Schockprotokoll durchliefen, zeigte sich im Vergleich zu den Ausgangswerten eine deutliche Zunahme des  $\alpha$ -GST Wertes, was Ausdruck einer hepatozellulären Schädigung durch hämorrhagischen Schock und Volumentherapie ist.

Bei den mit Gadoliniumchlorid vorbehandelten Tieren, die das Schockprotokoll durchliefen, fand sich eine deutliche Zunahme des  $\alpha$ -GST Wertes im Serum. Verglichen mit den  $\alpha$ -GST - Werten der übrigen unbehandelten scheinoperierten oder geschockten Tiere oder der Tiere, die vor Durchlaufen der Scheinoperation oder des Schockmodelles mit Vinblastin vorbehandelt wurden, spricht dies für eine deutlich stärkere hepatozelluläre Schädigung nach Kupfferzellblockade durch Gadoliniumchlorid und Durchlaufen des Schockprotokolls. Während eine Kupfferzellblockade die HO-1 Induktion nach Hämorrhagie und Reperfusion vermindert, deutet ein erhöhter  $\alpha$ -GST Wert bei den mit Gadoliniumchlorid vorbehandelten Tieren auf einen größeren hepatozellulären Schaden hin.

## **IV.3. Die Bedeutung der HO-1**

Das Expressionmuster von HO-1 nach hämorrhagischem Schock und Volumentherapie wurde 0, 6 und 24 Stunden nach Versuchsbeginn in der Leber untersucht.

Scheinoperierte Kontrolltiere exprimierten am Versuchsende lediglich geringe Mengen an HO-1 mRNA. Diese insgesamt geringe HO-1 Expression lässt sich vermutlich auf den operativen Eingriff zurückführen. Dies steht im Einklang mit vorhergehenden

Untersuchungen, bei denen sich unter physiologischen Bedingungen in der Gesamtleber nur eine sehr geringe, konstitutiv exprimierte HO-1 mRNA zeigte (Maines 1988).

Bei den Versuchstieren, die das Schockmodell durchliefen, zeigte sich hingegen eine ausgeprägte HO-1 Induktion. Der zeitliche Verlauf der Induktion zeigte dabei nach 6 Stunden sein Maximum. Diese Ergebnisse stimmen mit früheren Untersuchungen von M. Bauer (1996 b) überein, der auf mRNA - Ebene ein Induktionsmaximum nach 4 bis 6 Stunden und auf Protein-Ebene nach 6 Stunden nachwies.

In früheren Untersuchungen wurde gezeigt, dass die Hämoxxygenase 1 durch eine Vielzahl verschiedener Stimuli induziert werden kann. Als Induktoren sind dabei Hämorrhagie/Reperfusion als Modell eines generalisierten Ischämie/Reperfusionssyndromes, Endotoxinämie und Glutathiondepletion zu nennen. Gemeinsam sind diesen Stimuli, Häm eingeschlossen, dass sie oxidativen Stress auslösen oder die Glutathionkonzentration verändern können (Applegate 1991). Weiter konnte gezeigt werden, dass es zu einem zelltypspezifischen und räumlichen Verteilungsmuster der HO-1 Expression nach unterschiedlichen Stressereignissen kommt. Unter physiologischen Bedingungen kann HO-1 nur in Kupfferzellen nachgewiesen werden, während nach hämorrhagischem Schock und nachfolgender Reperfusion eine signifikante Zunahme in Nichtparenchymzellen und eine de-novo-Synthese von HO-1 mRNA und Protein in Hepatozyten nachgewiesen wurde. Nach hämorrhagischem Schock und Volumentherapie kommt der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und der dadurch vermittelten HO-1 Expression in Hepatozyten in der perizentralen Region und in der Übergangszone dabei eine besondere Bedeutung zu (Bauer I., 1998, Rensing 1999).

In vorhergehenden Studien (Bauer I., 1998) wurde das zelltypspezifische und räumliche Expressionsmuster der Hämoxxygenase-1 untersucht. Hepatozyten zeigen unter physiologischen Bedingungen eine nur sehr schwach ausgeprägte HO-1 Expression.

Unter Stressbedingungen fand sich in den Untersuchungen von I. Bauer keine Beeinflussung der Gleichgewichtskonzentrationen an HO-2 mRNA oder Protein. Dem hingegen fand sich nach hämorrhagischem Schock und Volumentherapie eine deutliche Zunahme der Expression von HO-1. Diese Zunahme an HO-1 in isolierten Hepatozyten konnte durch immunhistochemische Untersuchungen gestützt werden, welche eine Zunahme der HO-1 Expression vor allem in Hepatozyten der Perizentralregion nachwiesen.

In den Nicht-Parenchymzellen fand sich bei scheinoperierten Tieren eine ausgeprägte HO-1 Expression. Nach Schock und Volumentherapie fand sich eine HO-1 Expression, die sich nicht von der in scheinoperierten Kontrolltieren unterschied. In den immunhistochemischen Kontrollen fanden sich sowohl bei scheinoperierten als auch bei geschockten Tieren hauptsächlich periportal gelegene HO-1 positive Nichtparenchymzellen. Obwohl sowohl Ito- als auch Kupfferzellen HO-1 mRNA Transkripte exprimieren, fand sich HO-1 Protein lediglich in Kupfferzellen. Diese Diskrepanz zwischen der HO-1 mRNA und HO-1 Protein-Expression in isolierten Itozellen lässt auf posttranskriptionale Regulationsmechanismen in den verschiedenen Zellpopulationen schließen. Die deutliche Zunahme der Expression von HO-1 auf Proteinebene in den Nichtparenchymzellen der Tiere mit Scheinoperation oder dem Schockmodell ist daher am ehesten Ausdruck einer hohen Expression von HO-1 in Kupfferzellen. Gestützt wurde diese Annahme durch die periportal lokalisierten HO-1 positiven Nichtparenchymzellen. Kupfferzellen phagozytieren und bauen alternde Erythrozyten ab, während Hepatozyten freies oder an Haptoglobin gebundenes Häm abbauen (Bissel, 1972). Die Untersuchungen von I. Bauer legen nahe, dass in der normalen Leber HO-1 in Hepatozyten nicht induziert ist, obwohl Häm ein starker Induktor dieses Enzyms ist. Desweiteren kann geschlossen werden, dass beim Zerfall der Erythrozyten in den Kupfferzellen ein Stoff freigesetzt wird, der nicht vom Häm-Typ ist, aber dennoch eine Induktion der HO-1 in Kupfferzellen bewirken kann. Ebenso lässt sich vermuten, dass die Expression von HO-1 in Hepatozyten und Kupfferzellen unterschiedlich reguliert wird.

In vorhergehenden Untersuchungen (Rensing, 1999) wurde die protektive Bedeutung des HO-1 Stoffwechsels im Rahmen des hämorrhagischen Schocks und anschließender Reperfusion untersucht. Dabei wurde vergleichbar mit den vorliegenden Untersuchungen bei scheinoperierten und geschockten Tieren die hepatozelluläre Schädigung durch Bestimmung der  $\alpha$ -GST- Serumkonzentration sowie durch computergestützte Bildanalyse von Leberschnitten zur Beurteilung von Nekroseflächen untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind mit den hier vorliegenden Ergebnissen vereinbar, da sich bei scheinoperierten Tieren weder histomorphologische Anzeichen eines Leberschadens noch erhöhte  $\alpha$ -GST-Werte zeigten, wohingegen bei geschockten Tieren die  $\alpha$ -GST-Werte im Vergleich zu den Ausgangswerten erhöht waren und sich histomorphologisch eine Verminderung der intakten Azini auf 68,8 % zeigte.

Zur Beurteilung des protektiven Mechanismus des Hämoxigenase – Stoffwechsels im Rahmen des H/R wurde dieser mit dem falschen Substrat und spezifischen Hemmstoff Zinn -

Protoporphyrin-IX (SnPP-IX) blockiert. Bei den mit SnPP-IX vorbehandelten Tieren fand sich histologisch kein Anzeichen eines Leberzellschadens, die  $\alpha$  – GST – Werte waren bei diesen Tieren jedoch am Versuchsende mäßig erhöht. Bei den Tieren des Schockprotokolls führte die vorherige Applikation von SnPP-IX im Vergleich zu den unbehandelten geschockten Tieren zu einer weiteren ausgeprägten Erhöhung der  $\alpha$  – GST- Werte im Serum. Histomorphologisch waren am Versuchsende bei den mit SnPP-IX vorbehandelten geschockten Tieren nur noch 42,6 % der Azini intakt. Diese Untersuchungen legen einen protektiven Mechanismus des Hämoxxygenasestoffwechsels im Rahmen eines bei H/R entstehenden oxidativen Stresses nahe.

Entsprechende Ergebnisse lassen sich in einem Rattenmodell nach Rhabdomyolyse nachweisen, indem eine protektive Funktion der HO-1 Induktion hinsichtlich der Entwicklung eines durch oxidativen Stress bedingten Nierenschadens nachgewiesen werden konnte (Nath, 1992).

Bezüglich der funktionellen Bedeutung des HO-1 Stoffwechsels scheint ein Perfusionsversagen für die Entwicklung einer Organschädigung eine wichtige Rolle zu spielen (Suematsu 1992, Chun 1994). Die Ergebnisse von M Bauer (1996 b) und Mitarbeiter zeigten, dass es nach hämorrhagischem Schock und anschließender Reperfusion nach einer Blockade des HO-1 Stoffwechsels mit SnPP IX zu einem anhaltenden deutlichen Anstieg des Druckes und Widerstandes in der Pfortader kam, was zu einem Abfall des portalen Blutflusses führte. Diese Ergebnisse sind wahrscheinlich auf den Einfluss des nach H/R gebildeten CO zurückzuführen. Der vasodilatative Effekt von CO und NO ist dabei gegenläufig zu dem nach Ischämie und Reperfusion zur Aufrechterhaltung eines gewissen Druckes induzierten Vasokonstriktoren Endothelin-1 (ET-1), wobei das Gleichgewicht zwischen den Vasodilatoren und Vasokonstriktoren nach einem ischämischen Ereignis gestört ist (Zimmermann 1994, Clemens 1997). Dadurch kommt es in der Leber nach H/R zu einem mikrovaskulären Perfusionsdefizit mit einer Perfusionsheterogenität, wobei in der gleichen mikrovaskulären Einheit ein Nebeneinander von Sinusoiden mit erhaltenem oder gesteigertem Blutfluss und solchen mit verminderter Perfusion besteht (Bauer I. 1995, Vollmar 1994). Der Gesamtblutfluss der Leber kann dabei normal sein (funktioneller Shunt). Ein ähnlich instabiles Gleichgewicht des Vasodilators NO und des Vasokonstriktors Endothelin - 1 in der Leber konnte in einem Endotoxin - Schockmodell gezeigt werden (Pannen 1996 a, b). Es ist also zu vermuten, dass die HO-1 – abhängige CO – Bildung und Aktivierung der Guanylatcyklase in oxidativen Stressmodellen eine protektive Funktion zur Erhaltung der Leberperfusion hat.

Als mögliche Schutzmechanismen vor einer hepatozellulären Schädigung nach H/R kommen weiterhin die verschiedenen Metabolite des Hämoxigenase-1 Stofwechsels in Frage. Das beim Hämabbau entstehende Biliverdin und das durch die Biliverdinreduktase entstehende Bilirubin sind antioxidativ wirksame Stoffe, die zum Schutz der Leber nach einem oxidativen Stressereignis beitragen können. Beim Hämabbau durch die Hämoxigenase wird zudem Eisen freigesetzt und es wird vermutet, dass die schädigenden Effekte von reaktiven Sauerstoffverbindungen eisenabhängig sind. Wie bereits beschrieben kann intrazelluläres Eisen in der Fenton – Reaktion die Entstehung des toxischen Hydroxylradikals aus Superoxidanionen oder Wasserstoffperoxid katalysieren. Freies, intrazellulär nicht metabolisiertes Eisen wird von Ferritin in Form von  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen gebunden und so an der Teilnahme an der Fenton – Reaktion abgehalten. Es ist bekannt, dass Häm neben einer HO-1 Induktion auch die vermehrte Bildung von Ferritin bewirkt, wodurch eine vermehrte Bindung von Eisen an Ferritin und somit eine verminderte Bildung von ROS erklärt werden kann (Eisenstein 1991, Balla 1993).

#### **IV.4. Die Bedeutung reaktiver Sauerstoffradikale**

Ein ischämisches Ereignis wie bei einem hämorrhagischen Schock führt charakteristischerweise aufgrund des bestehenden Sauerstoffgradienten zu einer perizentralen ischämischen Schädigung. Unter physiologischen Bedingungen ist der Sauerstoffpartialdruck in der periportalen Region etwa 2-fach höher als in der perizentralen Region. Mit dem Sauerstoffgradienten vergesellschaftet ist auch eine zonale Verteilung unterschiedlicher Stoffwechselwege, wie beispielsweise dem Harnstoffzyklus, der Glutaminsynthese oder der Gluconeogenese. Diese zonale Verteilung unterschiedlicher Stoffwechselwege scheint in Anbetracht des Sauerstoffgradienten dafür zu sprechen, dass eine zumindest partielle  $\text{O}_2$  – abhängige Genregulation der Schlüsselenzyme dieser Stoffwechselwege existiert.

Im Gegensatz zu einer isolierten Leber - Ischämie mit nachfolgender Reperfusion wird bei einem „low-flow“- Ereignis wie im vorliegenden Schockmodell der initiale ischämische Gewebeschaden und die durch die folgende Reperfusion bedingte Schädigung zusätzlich durch eine Endotoxämie (durch aus dem Darmtrakt durch die ischämische Störung der Mukosabarriere in das Pfortadersystem eingeschwemmte Bakterien und Toxine) aggraviert. Nach hämorrhagischem Schock und Volumentherapie kommt es aufgrund der verminderten Leberperfusion zu einer Verstärkung des schon unter physiologischen Bedingungen bestehenden zonalen Sauerstoffgradienten. Daraus resultiert eine Ischämie der perizentral

gelegenen Hepatozyten. Dies galt ursprünglich als der primäre Schädigungsmechanismus im hämorrhagischen Schock. In neueren Studien konnte aber dargelegt werden, dass das Wiedereinsetzen des mikrovaskulären Blutflusses nach transientscher Ischämie im Rahmen eines Schockereignisses trotz der Wiederherstellung der systemischen hämodynamischen Parameter Herzzeitvolumen und Blutdruck von einer sekundären Stase gefolgt ist (WANG 1990, M. BAUER 1995, CLEMENS 1995a, b). Dabei spielen sowohl physikalische als auch hämorrheologische Faktoren, wie eine Endothelschädigung mit folgendem Flüssigkeitsverlust ins Interstitium und in die Endothelzellen eine Rolle. Hieraus folgt eine Endothelzellschwellung, eine Hämokonzentration und eine interstitielle Ödembildung, was zu einer weiteren Abnahme der Perfusion führt (Menger 1997). Diese zu einer Gewebsschädigung führende Sequenz aus Ischämie und Reperfusion wird als Ischämie/Reperfusionssyndrom (I/R) bezeichnet.

Granger und McCord machten die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) für die sekundäre Gewebsschädigung nach Ischämie und Reperfusion verantwortlich. ROS entstehen durch den stufenweisen Abbau von Adenosintriphosphat (ATP) zu Hypoxanthin und der gleichzeitigen Umwandlung der Xanthindehydrogenase zur Xanthinoxidase. In einem weiteren Xanthinoxidase – abhängigen Stoffwechselschritt entstehen  $O_2^-$  und  $H_2O_2$ . Diese Produkte können in Anwesenheit von intrazellulärem Eisen durch die sogenannte Fenton – oder Haber-Weiss-Reaktion (Haber 1934) zu dem toxischen Hydroxylradikal umgewandelt werden. Hydroxylradikale interferieren mit Transkriptionsfaktoren wie Aktivator-Protein-1 (AP-1) oder Hypoxieinduzierbarem Faktor-1 (HIF-1), welche sich in der Promotorregion des HO-1 Gens finden und die HO-1 Genexpression unter Stressbedingungen regulieren. Freies, intrazellulär nicht metabolisiertes Eisen wird von Ferritin in Form von  $Fe^{3+}$  - Ionen gebunden und so durch die Bindung an Ferritin an der Fenton – Reaktion abgehalten.

Während der Reperfusionsphase gebildete freie Sauerstoffradikale können Leberzellen direkt durch Oxidation struktureller Proteine, Membranlipide oder ihrer DNA schädigen (Haglund 1991). Jaeschke und Mitarbeiter konnten jedoch zeigen, dass Hepatozyten protektive Faktoren besitzen, die sie vor dem direkten toxischen Effekt der ROS schützen. Neuere Untersuchungen deuten zudem darauf hin, dass ROS über ihren direkten zytotoxischen Effekt hinaus als sogenannte „second messenger“ fungieren. Dabei induzieren und unterhalten sie die nach Ischämie und Reperfusion entstehende Entzündungsreaktion durch eine Aktivierung von redoxsensitiven Transkriptionsfaktoren (wie zum Beispiel nukleärer Faktor  $\kappa B$  (NF $\kappa B$ ) oder Aktivator-Protein-1 (AP-1)) und einer konsekutiven Aktivierung der abhängigen

Genprodukte (wie intercellular-adhesion-molecule-1 (ICAM -1)) (Jaeschke 1995, Essani 1996, Sun 1996). Auch sind ROS an einer Leukozyten-Endothel-Interaktion beteiligt.

Jaeschke und Mitarbeiter konnten zeigen, dass ROS sowohl intrazellulär in Hepatozyten als auch extrazellulär durch Nichtparenchymzellen exprimiert werden. Hierbei sind vor allem polymorphkernige neutrophile Granulozyten als auch Kupfferzellen als Quellen der reaktiven Sauerstoffradikale zu nennen. Insbesondere den Kupfferzellen als ortsständigen Makrophagen kommt im Rahmen des hämorrhagischen Schocks aufgrund ihrer Phagozytosefähigkeit des aus dem Darmtrakt eingeschwemmten Materials eine Schlüsselrolle zu. Aktivierte Makrophagen setzen zytotoxische Mediatoren, darunter freie Radikale frei. Im Rahmen des Ischämie/Reperfusionssyndromes kommt es zudem zu einer Infiltration des Lebergewebes mit polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMNL). Jaeschke postulierte, dass Kupfferzellen in der Frühphase, polymorphkernige neutrophile Granulozyten hingegen in der Spätphase der Reperfusion, d.h. 24 Stunden nach einer einstündigen Ischämiephase, die Hauptquellen reaktiver Sauerstoffspezies darstellen. Bislang war die spezifische Funktion der Kupfferzellen und PMNL als parakrine Regulatoren des hepatozellulären Schadens nach Hämorrhagie und Reperfusion (H/R) jedoch kaum verstanden.

#### **IV.5. Bedeutung der Kupfferzellen und PMNL auf die HO-1 Genexpression**

Wie bereits in den vorangegangenen Abschnitten erwähnt, gelten sowohl polymorphkernige neutrophile Granulozyten als auch Kupfferzellen als wichtige Quellen der im Rahmen der Ischämie und Reperfusion gebildeten freien Sauerstoffradikale. Diese wiederum scheinen als „second messenger“ bei der Aktivierung des stressabhängigen HO-1 Gens zu fungieren und somit die HO-1 Expression in Hepatozyten zu regulieren. Der Pathomechanismus der parakrinen Regulation der hepatozellulären HO-1 Genexpression und die Rolle der PMNL und Kupfferzellen sollte im Rahmen der vorliegenden Studie untersucht werden.

Die Sequenz Hämorrhagie/Reperfusion führt zu einer Infiltration des Leberparenchyms mit polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten. In der vorliegenden Studie wurde die Anzahl der das Lebergewebe infiltrierenden Leukozyten nach Chlorazetatesterase (CAE) – Färbung an Semidünnschnitten lichtmikroskopisch ausgezählt. Dabei ließ sich bei Tieren, die das Schockprotokoll durchliefen im Vergleich zu scheinoperierten Tieren fast die doppelte Anzahl an esterasepositiven Leukozyten bestimmen. Als Positivkontrolle dienten Tiere, denen 6 Stunden vor Gewinnung des Lebermaterials fMLP appliziert worden war und bei denen es

zu einer deutlich größeren Anzahl an infiltrierenden Leukozyten kam. Bei den Tieren, die zuvor mit Vinblastin zur Depletion von Leukozyten behandelt wurden, kam es zu einer Verhinderung der Einwanderung von Leukozyten in das Lebergewebe nach H/R. Die durch Auszählung zirkulierender neutrophiler Granulozyten bestätigte Abnahme der Leukozytenzahl spricht für eine suffiziente Leukozytendepletion mit Vinblastin.

Applikation von Gadoliniumchlorid zur Kupfferzell-Blockade führte interessanterweise auch zu einer Verminderung der das Lebergewebe infiltrierenden PMNL nach Hämorrhagie/Reperfusion. Dies lässt vermuten, dass die Kupfferzellen einen Einfluss auf die Leukozyteninfiltration des Lebergewebes haben. Diese Beeinflussung könnte durch die in Kupfferzellen gebildeten ROS erfolgen. Bereits in früheren Arbeiten wurde eine Rolle der durch Kupfferzellen gebildeten ROS bei der Leukozyten-Endothel-Adhäsion diskutiert. Daher war man der Ansicht, dass die durch Kupfferzellen gebildeten freien Radikale auch an der Rekrutierung von Leukozyten im Rahmen des Ischämie-Reperfusionssyndromes beteiligt sind. Zu diesem Konzept passt das Ergebnis, dass eine Blockade der Kupfferzellen zu einer Reduzierung der Leukozyteninfiltration nach H/R führt.

Wie bereits beschrieben, führte der in der vorliegenden Untersuchung durchgeführte hämorrhagische Schock mit anschließender Reperfusion zu einer signifikanten HO-1 Genexpression in Leberhomogenaten mit einem Maximum nach 5 Stunden Reperfusion (also in der Frühphase der Ischämie-Reperfusion) verglichen mit scheinoperierten Kontrolltieren. Auf mRNA – Ebene konnte eine Verhinderung der HO-1 Expression durch Kupfferzellblockade mit Gadoliniumchlorid nach H/R beobachtet werden. Einen vergleichbaren Effekt auf die HO-1 mRNA Expression konnte nach Kupfferzellblockade mit  $\text{Cl}_2\text{MDP}$  beobachtet werden. In den vorliegenden immunhistochemischen Untersuchungen zeigte sich nach Kupfferzellblockade eine Reduktion von HO-1 immunoreaktivem Protein in Hepatozyten der perizentralen Region und der Übergangszone. Nach Depletion der neutrophilen Granulozyten mittels Vinblastin ebenso wie nach Vorbehandlung der Tiere mit fMLP hingegen blieb die HO-1 Genexpression unbeeinflusst. Dies spricht dafür, dass PMNs zumindest in der Frühphase der Reperfusion keinen Einfluss auf die HO-1 Genexpression haben.

Vergleichbare Ergebnisse zur Suppression der HO-1 nach Kupfferzellblockade fanden sich auch nach Applikation von Antioxidantien. Scheinoperierten Tieren und Tieren, die das Schockprotokoll durchliefen, wurde vor Beginn der Reperusionsphase chemisch unterschiedliche Antioxidantien verabreicht (darunter das Vitamin E - Analogon Trolox, N-Acetylcystein und DFO, welches Komplexe mit Eisen eingeht und so die Fenton-Reaktion

verhindert). Alle diese Antioxidantien verminderten die Expression von HO-1 mRNA und auch die Bildung von HO-1 immunoreaktivem Protein in den Hepatozyten der Perizentralregion und der Übergangszone in vergleichbarer Weise wie eine Kupfferzellblockade mit Gadoliniumchlorid. Da die Antioxidantien direkt vor der Reperfusion appliziert wurden und die Ergebnisse der verminderten HO-1 Genexpression mit denen nach Kupfferzellblockade übereinstimmen, lässt dies eine Bedeutung der Kupfferzellen bei der hepatozellulären Stressantwort in der Frühphase der Reperfusion vermuten.

In Untersuchungen an der Leber von Mäusen konnte die Arbeitsgruppe von Rizzardini Hinweise dafür finden, dass die durch Endotoxinämie vermittelte hepatozelluläre Anreicherung von HO-1 mRNA durch eine interzelluläre Kommunikation zwischen Kupfferzellen und Hepatozyten bedingt war. In diesen Versuchsreihen übte durch Kupfferzellen freigesetztes Interleukin-1 einen parakrinen Effekt auf Mäuse - Hepatozyten aus (Rizzardini, 1993). Jedoch muss davon ausgegangen werden, dass nach Hämorrhagie und Reperfusion bei der Ratte eine viel geringere Zytokinfreisetzung als nach Endotoxinämie auftritt (Bauer I, 1998). Eine alleinige Zytokin - vermittelte HO-1 Induktion scheint daher nach hämorrhagischem Schock und Reperfusion unwahrscheinlich. In vorhergehenden Untersuchungen konnte zudem nachgewiesen werden, dass eine Endotoxinämie nur eine schwache Induktion von HO-1 bewirkt und dass diese zudem auf Nichtparenchymzellen beschränkt ist (Bauer I, 1998).

Da es nach Kupfferzellblockade, nicht jedoch nach Depletion neutrophiler Granulozyten zu einer deutlichen Abnahme der HO-1 Expression nach H/R kam, könnte man daraus schließen, dass es zu einer parakrinen hepatozellulären HO-1 Genregulation durch die von Kupfferzellen freigesetzten reaktiven Sauerstoffverbindungen kommt. PMNL scheinen auf diesen parakrinen Regulationsmechanismus keinen Einfluß zu haben. In jedem Fall scheint eine Infiltration mit PMNL nach H/R und auch ein substantiell vergrößerter Einstrom von PMNL nach Stimulation mit fMLP zumindest in dem Beobachtungszeitraum bis zu 6 Stunden nach hämorrhagischem Schock keine suffiziente parakrine HO-1 Induktion in angrenzenden Hepatozyten zu verursachen. Die den ROS zugeschriebene Schlüsselrolle wird durch die Tatsache unterstützt, dass es nach Ischämie und Reperfusion zu einer HO-1 Induktion vor allem in der perizentralen Region und in der Übergangszone kommt. In diesen Bereichen des Leberläppchens ist der Schaden nach Ischämie aufgrund des Sauerstoffgradienten am größten und es kommt zur hauptsächlichen Bildung von ROS in diesen Regionen. Die HO-1 ist neben

den eingangs bereits erwähnten zonal regulierten Genen ein unter Stressbedingungen mit einem typischen azinären Verteilungsmuster reguliertes Gen.

Um zu untersuchen, ob die chemischen Substanzen Gadoliniumchlorid und Vinblastin selbst einen Effekt auf die Induktion der HO-1 haben, wurden isolierte Hepatozyten 6 Stunden lang mit verschiedenen Konzentrationen an Gadoliniumchlorid und Vinblastin inkubiert. Die Konzentration dieser Stoffe entsprach dabei jeweils der 0,1-, 1- oder 10fachen der *in vivo* zu erwartenden Konzentration dieser Substanzen. Weder Gadoliniumchlorid noch Vinblastin führten dabei in den isolierten Hepatozyten zu einer HO-1 Genexpression. Dies spricht dafür, dass diese Substanzen einen spezifischen Effekt auf Kupfferzellen beziehungsweise PMNL, nicht jedoch auf Hepatozyten ausüben und dass es darüber hinaus zu einer Beeinflussung der Hepatozyten durch Kupfferzellen oder PMNL in der Leber kommen muss, damit es zu einer HO-1 Induktion in Hepatozyten kommt. Zusätzlich wurden isolierte Hepatozyten in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen an Gadoliniumchlorid und Vinblastin oxidativem Stress ausgesetzt. Dazu wurden sie in Anwesenheit dieser Substanzen mit Cobaltchlorid inkubiert. Cobaltchlorid führte zu einer deutlichen Stressantwort in Form einer HO-1 Genexpression, was weder durch Gadoliniumchlorid noch durch Vinblastin beeinflusst wurde. Diese fehlende Wirksamkeit von Gadoliniumchlorid auf die HO-1 Genexpression von isolierten Hepatozyten nach oxidativem Stress stützt wiederum die Annahme, dass Gadoliniumchlorid eine spezifische Wirkung auf den durch Kupfferzellen bedingten oxidativen Stress, nicht jedoch direkt auf die HO-1 Genexpression der Hepatozyten hat.

In früheren Untersuchungen wiesen Jaeschke und Mitarbeiter (1991) darauf hin, dass eine Kupfferzellblockade und eine verminderte Infiltration von PMNL nach einer kompletten Leberischämie mit nachfolgender Reperfusion einen protektiven Mechanismus darstellen. Ebenso zeigten weitere Untersuchungen in Modellen einer kompletten „warmen“ oder „kalten“ Leberischämie und Reperfusion, dass es nach Kupfferzellblockade mit Gadoliniumchlorid zu einer reduzierten hepatozellulären Schädigung kam, während eine Stimulierung der Kupfferzellen zu einer verstärkten Hepatotoxizität führte. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung zeigen jedoch, dass es im Rahmen des hämorrhagischen Schocks mit anschließender Volumentherapie (sogenannte „low-flow“ – Ischämie) nach Kupfferzellblockade zu einer verstärkten hepatozellulären Schädigung kommt. Daraus kann man schließen, dass eine Kupfferzellblockade in Modellen einer isolierten Leberischämie von Nutzen ist, dies jedoch in Modellen wie dem vorliegenden hämorrhagischen Schockmodell

nicht der Fall ist. Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz zwischen der hepatozellulären Schädigung in Modellen einer isolierten Leberischämie und Modellen eines H/R wäre der Einfluss von aus dem ischämisch geschädigten Darm eingeschwemmtem Toxinen und Mediatoren, welche durch Kupfferzellen abgefangen und phagozytiert werden, ohne eine Leberzellschädigung hervorzurufen. Nach Kupfferzellblockade wäre diese Filterfunktion aufgehoben und eine akute Leberzellschädigung wäre zu beobachten.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie lassen vermuten, dass in einem kliniknah gestalteten Modell von Hämorrhagie und Reperfusion Kupfferzellen an einer adaptiven Stressantwort beteiligt sind und dass ihre Blockade zu einer verstärkten Leberzellschädigung führt. Die Regulation dieser Stressantwort erfolgt dabei über eine Regulation des HO-1 Gens. Da aus Kupfferzellen freigesetzte ROS als hauptsächliche „second – messenger“ bei der Expression der HO-1 gelten, legen die vorliegenden Ergebnisse nahe, dass Kupfferzellen, nicht jedoch PMNL an der Regulation einer hepatozellulären Stressantwort in der frühen Phase der Reperfusion nach hämorrhagischem Schock beteiligt sind.

Zusammenfassend ergibt sich, dass es sich bei der Hämoxigenase-1 um ein stressinduzierbares Gen handelt, welches in der Leber in einem spezifischen räumlichen und zellulären Verteilungsmuster exprimiert wird. Der HO-1 kommt im Rahmen eines hämorrhagischen Schocks mit anschließender Volumentherapie über mehrere Mechanismen eine entscheidende protektive Bedeutung zu. Im Rahmen eines kliniknah gestalteten Modells eines kompensierten Schocks (Hämorrhagie und anschließende Volumentherapie) wird das HO-1 Gen auf mRNA – und auf Proteinebene induziert, und zwar hauptsächlich in Hepatozyten der Perizentralregion und der Übergangszone. Diese Induktion ist Ausdruck einer durch das ischämische Ereignis hervorgerufenen oxidativen Stressantwort, welche durch reaktive Sauerstoffverbindungen hervorgerufen wird. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die unterschiedlichen Funktionen von Kupfferzellen und neutrophilem Granulozyten als parakrine Regulatoren der Expression der HO-1 in Hepatozyten nach hämorrhagischem Schock zu untersuchen. Durch unsere Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass Kupfferzellen durch die Bildung von ROS einen parakrinen Effekt auf benachbarte Hepatozyten haben und so an der Induktion des HO-1 Gens beteiligt sind. Ein solcher Effekt ließ sich für PMNL nicht nachweisen. Nach Kupfferzellblockade mittels Gadoliniumchlorid zeigte sich in der vorliegenden Arbeit eine deutliche Abnahme der HO-1 Genexpression auf mRNA - wie auch auf Proteinebene. Eine Kupfferzellblockade mit Gadoliniumchlorid ergab einen deutlichen hepatozellulären Schaden, welcher durch Messung des  $\alpha$  – GST Wert im

Serum bestimmt wurde. Da die Induktion von HO-1 über verschiedene Mechanismen einen protektiven Einfluss auf die Leber im Rahmen eines Stressereignisses hat, kommt den Kupferzellen als parakrine Regulatoren der HO-1 Genexpression ebenso eine protektive Rolle zu.

## V. Literaturverzeichnis

- Applegate, L. A., P. Luscher, and R. M. Tyrrell. "Induction of heme oxygenase: a general response to oxidant stress in cultured mammalian cells." Cancer Res. 51.3 (1991): 974-78
- Balla, G. et al. "Ferritin: a cytoprotective antioxidant strategem of endothelium." J.Biol.Chem. 267.25 (1992): 18148-53.
- Balla, G. et al. "Exposure of endothelial cells to free heme potentiates damage mediated by granulocytes and toxic oxygen species." Lab Invest 64.5 (1991): 648-55.
- Baeuerle, P. A. and T. Henkel. "Function and activation of NF-kappa B in the immune system." Annu.Rev.Immunol. 12 (1994): 141-79.
- Bauer, I. et al. "Transcriptional activation of heme oxygenase-1 and its functional significance in acetaminophen-induced hepatitis and hepatocellular injury in the rat." J.Hepatol. 33.3 (2000): 395-406.
- Bauer, I. et al. "Expression pattern of heme oxygenase isoenzymes 1 and 2 in normal and stress-exposed rat liver." Hepatology 27.3 (1998): 829-38.
- Bauer, M. "[The physiopathology of sepsis. Current concepts]." Anaesthesist 45.4 (1996): 312-22.
- Bauer, M. et al. "ET-1 induced alterations of hepatic microcirculation: sinusoidal and extrasinusoidal sites of action." Am.J.Physiol 267.1 Pt 1 (1994): G143-G149.

- Bauer, M. et al. "Attenuation of shock-induced hepatic microcirculatory disturbances by the use of a starch-deferoxamine conjugate for resuscitation." Crit Care Med. 23.2 (1995): 316-22.
- Bauer, M. et al. "Evidence for a functional link between stress response and vascular control in hepatic portal circulation." Am.J.Physiol 271.5 Pt 1 (1996): G929-G935.
- Beal, A. L. and F. B. Cerra. "Multiple organ failure syndrome in the 1990s. Systemic inflammatory response and organ dysfunction." JAMA 271.3 (1994): 226-33.
- Ben Shaul, V. et al. "Lipopolysaccharide-induced oxidative stress in the liver: comparison between rat and rabbit." Shock 12.4 (1999): 288-93.
- Brune, B., K. U. Schmidt, and V. Ullrich. "Activation of soluble guanylate cyclase by carbon monoxide and inhibition by superoxide anion." Eur.J.Biochem. 192.3 (1990): 683-88.
- Bulkley, G. B. "Physiology of reactive oxidant-mediated signal transduction: an overview." Biochem.Soc.Trans. 25.3 (1997): 804-12.
- Choi, A. M. and J. Alam. "Heme oxygenase-1: function, regulation, and implication of a novel stress-inducible protein in oxidant-induced lung injury." Am.J.Respir.Cell Mol.Biol. 15.1 (1996): 9-19.
- Chomczynski, P. and N. Sacchi. "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." Anal.Biochem. 162.1 (1987): 156-59.
- Davies, P. et al. "The role of macrophage secretory products in chronic inflammatory processes." J.Invest Dermatol. 74.5 (1980): 292-96.

Decker, K. "Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells)."

Eur.J.Biochem. 192.2 (1990): 245-61.

Deitch, E. A. et al. "Evidence favoring the role of the gut as a cytokine-generating organ in

rats subjected to hemorrhagic shock." Shock 1.2 (1994): 141-45.

Deutschman, C. S. et al. "Increased expression of cytokine-induced neutrophil

chemoattractant in septic rat liver." Am.J.Physiol 271.3 Pt 2 (1996): R593-R600.

Essani, N. A. et al. "Cytokine-induced upregulation of hepatic intercellular adhesion

molecule-1 messenger RNA expression and its role in the pathophysiology of murine  
endotoxin shock and acute liver failure." Hepatology 21.6 (1995): 1632-39.

Ewing, J. F. and M. D. Maines. "Glutathione depletion induces heme oxygenase-1 (HSP32)

mRNA and protein in rat brain." J.Neurochem. 60.4 (1993): 1512-19.

Ewing, J. F., V. S. Raju, and M. D. Maines. "Induction of heart heme oxygenase-1 (HSP32)

by hyperthermia: possible role in stress-mediated elevation of cyclic 3':5'-guanosine  
monophosphate." J.Pharmacol.Exp.Ther. 271.1 (1994): 408-14.

Farhood, A. et al. "Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) expression and its role in

neutrophil-induced ischemia-reperfusion injury in rat liver." J.Leukoc.Biol. 57.3  
(1995): 368-74.

Ganey, P. E. et al. "Activated neutrophils from rat injured isolated hepatocytes." Lab Invest

70.1 (1994): 53-60.

- Gauthier, T. W., K. L. Davenpeck, and A. M. Lefer. "Nitric oxide attenuates leukocyte-endothelial interaction via P-selectin in splanchnic ischemia-reperfusion." Am.J.Physiol 267.4 Pt 1 (1994): G562-G568.
- Goda, N. et al. "Distribution of heme oxygenase isoforms in rat liver. Topographic basis for carbon monoxide-mediated microvascular relaxation." J.Clin.Invest 101.3 (1998): 604-12.
- Granger, D. N. "Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury." Am.J.Physiol 255.6 Pt 2 (1988): H1269-H1275.
- Haglund, U. and B. Gerdin. "Oxygen-free radicals (OFR) and circulatory shock." Circ.Shock 34.4 (1991): 405-11.
- Harbrecht, B. G. et al. "Inhibition of nitric oxide synthesis during endotoxemia promotes intrahepatic thrombosis and an oxygen radical-mediated hepatic injury." J.Leukoc.Biol. 52.4 (1992): 390-94.
- Huang, L. E. et al. "Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit." J.Biol.Chem. 271.50 (1996): 32253-59.
- Huitinga, I. et al. "Liposome mediated affection of monocytes." Immunobiology 185.1 (1992): 11-19.
- Jaeschke, H. "Vascular oxidant stress and hepatic ischemia/reperfusion injury." Free Radic.Res.Commun. 12-13 Pt 2 (1991): 737-43.

Jaeschke, H. "Mechanisms of oxidant stress-induced acute tissue injury."

Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 209.2 (1995): 104-11.

Jaeschke, H. and A. Farhood. "Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver." Am.J.Physiol 260.3 Pt 1 (1991): G355-G362.

Jaeschke, H., A. Farhood, and C. W. Smith. "Neutrophils contribute to ischemia/reperfusion injury in rat liver in vivo." FASEB J. 4.15 (1990): 3355-59.

Jaeschke, H. et al. "Glutathione peroxidase-deficient mice are more susceptible to neutrophil-mediated hepatic parenchymal cell injury during endotoxemia: importance of an intracellular oxidant stress." Hepatology 29.2 (1999): 443-50.

Jaeschke, H. et al. "Complement activates Kupffer cells and neutrophils during reperfusion after hepatic ischemia." Am.J.Physiol 264.4 Pt 1 (1993): G801-G809.

Jaeschke, H. et al. "Functional inactivation of neutrophils with a Mac-1 (CD11b/CD18) monoclonal antibody protects against ischemia-reperfusion injury in rat liver." Hepatology 17.5 (1993): 915-23.

Jarrar, D. et al. "Inhibition of tyrosine kinase signaling after trauma-hemorrhage: a novel approach for improving organ function and decreasing susceptibility to subsequent sepsis." Ann.Surg. 231.3 (2000): 399-407.

Jungermann, K. and N. Katz. "Functional specialization of different hepatocyte populations." Physiol Rev. 69.3 (1989): 708-64.

Jungermann, K. and T. Kietzmann. "Oxygen: modulator of metabolic zonation and disease of the liver." Hepatology 31.2 (2000): 255-60.

- Kanwar, S. and P. Kubes. "Nitric oxide is an antiadhesive molecule for leukocytes." New Horiz. 3.1 (1995): 93-104.
- Kapoor, R. and K. Prasad. "Beneficial effects of antioxidants in hemorrhagic shock." Angiology 46.4 (1995): 281-97.
- 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.
- Keyse, S. M. and R. M. Tyrrell. "Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 86.1 (1989): 99-103.
- Kietzmann, T. et al. "Arterial oxygen partial pressures reduce the insulin-dependent induction of the perivenously located glucokinase in rat hepatocyte cultures: mimicry of arterial oxygen pressures by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>." Biochem.J. 321 ( Pt 1) (1997): 17-20.
- Kietzmann, T. et al. "A ferro-heme protein senses oxygen levels, which modulate the glucagon-dependent activation of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene in rat hepatocyte cultures." Biochem.Biophys.Res.Commun. 195.2 (1993): 792-98.
- Laskin, D. L. and A. M. Pilaro. "Potential role of activated macrophages in acetaminophen hepatotoxicity. I. Isolation and characterization of activated macrophages from rat liver." Toxicol.Appl.Pharmacol. 86.2 (1986): 204-15.

- Laskin, D. L., A. M. Pilaro, and S. Ji. "Potential role of activated macrophages in acetaminophen hepatotoxicity. II. Mechanism of macrophage accumulation and activation." Toxicol.Appl.Pharmacol. 86.2 (1986): 216-26.
- Laskin, D. L. et al. "Modulation of macrophage functioning abrogates the acute hepatotoxicity of acetaminophen." Hepatology 21.4 (1995): 1045-50.
- Lee, P. J. et al. "Hypoxia-inducible factor-1 mediates transcriptional activation of the heme oxygenase-1 gene in response to hypoxia." J.Biol.Chem. 272.9 (1997): 5375-81.
- Liu, P. et al. "Activation of Kupffer cells and neutrophils for reactive oxygen formation is responsible for endotoxin-enhanced liver injury after hepatic ischemia." Shock 3.1 (1995): 56-62.
- Maines, M. D. "Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications." FASEB J. 2.10 (1988): 2557-68.
- Maines, M. D. et al. "Induction of kidney heme oxygenase-1 (HSP32) mRNA and protein by ischemia/reperfusion: possible role of heme as both promotor of tissue damage and regulator of HSP32." J.Pharmacol.Exp.Ther. 264.1 (1993): 457-62.
- Maines, M. D., G. M. Trakshel, and R. K. Kutty. "Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal heme oxygenase. Only one molecular species of the enzyme is inducible." J.Biol.Chem. 261.1 (1986): 411-19.
- Marzi, I. et al. "Effect of anti-tumor necrosis factor alpha on leukocyte adhesion in the liver after hemorrhagic shock: an intravital microscopic study in the rat." Shock 3.1 (1995): 27-33.

- Mayumi, T. et al. "Zonal heterogeneity of hepatic injury following shock/resuscitation: relationship of xanthine oxidase activity to localization of neutrophil accumulation and central lobular necrosis." Shock 5.5 (1996): 324-32.
- McGuire, G. M., P. Liu, and H. Jaeschke. "Neutrophil-induced lung damage after hepatic ischemia and endotoxemia." Free Radic.Biol.Med. 20.2 (1996): 189-97.
- Millhorn, D. E. et al. "Regulation of gene expression for tyrosine hydroxylase in oxygen sensitive cells by hypoxia." Kidney Int. 51.2 (1997): 527-35.
- Nath, K. A. et al. "Induction of heme oxygenase is a rapid, protective response in rhabdomyolysis in the rat." J.Clin.Invest 90.1 (1992): 267-70.
- Nathan, C. F. "Secretory products of macrophages." J.Clin.Invest 79.2 (1987): 319-26.
- Nathan, C. F. et al. "Extracellular cytolysis by activated macrophages and granulocytes. II. Hydrogen peroxide as a mediator of cytotoxicity." J.Exp.Med. 149.1 (1979): 100-13.
- Omert, L. et al. "A role of neutrophils in the down-regulation of IL-6 and CD14 following hemorrhagic shock." Shock 9.6 (1998): 391-96.
- Packer, M. A., C. M. Porteous, and M. P. Murphy. "Superoxide production by mitochondria in the presence of nitric oxide forms peroxynitrite." Biochem.Mol.Biol.Int. 40.3 (1996): 527-34.
- Pannen, B. H. et al. "Regulation of hepatic blood flow during resuscitation from hemorrhagic shock: role of NO and endothelins." Am.J.Physiol 272.6 Pt 2 (1997): H2736-H2745.

- Pannen, B. H. et al. "Protective role of endogenous carbon monoxide in hepatic microcirculatory dysfunction after hemorrhagic shock in rats." J.Clin.Invest 102.6 (1998): 1220-28.
- Pittard, A. J., W. J. Hawkins, and N. R. Webster. "The role of the microcirculation in the multi-organ dysfunction syndrome." Clin.Intensive Care 5.4 (1994): 186-90.
- Rai, R. M. et al. "Gadolinium chloride alters the acinar distribution of phagocytosis and balance between pro- and anti-inflammatory cytokines." Shock 6.4 (1996): 243-47.
- Redl, H. et al. "Plasma glutathione S-transferase as an early marker of posttraumatic hepatic injury in non-human primates." Shock 3.6 (1995): 395-97.
- Rensing, H. et al. "Differential expression pattern of heme oxygenase-1/heat shock protein 32 and nitric oxide synthase-II and their impact on liver injury in a rat model of hemorrhage and resuscitation." Crit Care Med. 27.12 (1999): 2766-75.
- Rensing, H. et al. "Role of reactive oxygen species for hepatocellular injury and heme oxygenase-1 gene expression after hemorrhage and resuscitation." Shock 12.4 (1999): 300-08.
- Rizzardini, M. et al. "Cytokine induction of haem oxygenase mRNA in mouse liver. Interleukin 1 transcriptionally activates the haem oxygenase gene." Biochem.J. 290 (Pt 2) (1993): 343-47.
- Schoeniger, L. O. et al. "Myocardial heat shock gene expression in pigs is dependent on superoxide anion generated at reperfusion." Shock 1.1 (1994): 31-35.

- Schoeniger, L. O. et al. "Heat-shock gene expression excludes hepatic acute-phase gene expression after resuscitation from hemorrhagic shock." Surgery 112.2 (1992): 355-62.
- Shibahara, S., R. M. Muller, and H. Taguchi. "Transcriptional control of rat heme oxygenase by heat shock." J.Biol.Chem. 262.27 (1987): 12889-92.
- Suematsu, M. et al. "Carbon monoxide: an endogenous modulator of sinusoidal tone in the perfused rat liver." J.Clin.Invest 96.5 (1995): 2431-37.
- Tenhunen, R., H. S. Marver, and R. Schmid. "The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 61.2 (1968): 748-55.

## **VII. Danksagung**

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Hauke Rensing, Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin des Universitätsklinikums des Saarlandes, Homburg, für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und seine stetige Unterstützung und Betreuung bei deren Fertigstellung bedanken.

Für die Möglichkeit, in seinem Institut zu arbeiten, bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Reinhard Larsen, Direktor der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin des Universitätsklinikums des Saarlandes, Homburg.

Bei Herrn Prof. Dr. med. Michael Menger, Direktor des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie am Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg, bedanke ich mich für die Möglichkeit, die tierexperimentellen Untersuchungen in seinem Institut durchzuführen.

Mein besonderer Dank gilt allen Mitarbeitern des Forschungslabors der Anästhesie in Homburg, für die stets außergewöhnlich nette und kompetente Zusammenarbeit.

Meinen Eltern gebührt mein besonderer Dank für ihre stetige Unterstützung während meines Studiums und ihrer wiederholten Ermutigungen während der Fertigstellung dieser Arbeit.

## VIII. Lebenslauf

### Persönliche Daten

<b>Name</b>	Schönhofen
<b>Vorname</b>	Sandra
<b>Anschrift</b>	Zum Schwimmbad 6 66459 Kirkel
<b>Telefon</b>	06841 – 994575
<b>Geburtsdatum</b>	23.09.1976
<b>Geburtsort</b>	Trier
<b>Familienstand</b>	ledig
<b>Staatsangehörigkeit</b>	deutsch
<b>Konfession</b>	römisch-katholisch

### Schulbildung

1983 – 1987	Grundschule Süd in Bitburg
1987 – 1989	Gemeinsame Orientierungsstufe der Otto-Hahn-Realschule und des St. Willibrord-Gymnasiums in Bitburg
1989 – 1996	St. Willibrord-Gymnasium in Bitburg mit Abschluss der Allgemeinen Hochschulreife

### Studium

Oktober 1996	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes
August 1998	Ärztliche Vorprüfung
August 2000	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
April 2002	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

2002/2003

Praktisches Jahr

1. Terial Innere Medizin am Centre Hospitalier  
Universitaire Vaudois (CHUV) in Lausanne,  
Schweiz im Rahmen des Erasmus-Austausch-  
Programms

2. Terial Psychiatrie am Universitätsklinikum  
des Saarlandes

3. Terial Chirurgie am Universitätsklinikum  
des Saarlandes

April 2003

3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

### **Beruflicher Werdegang**

07/2003 – 09/2004

Ärztin im Praktikum in der Klinik für Psychiatrie  
und Psychotherapie am Universitätsklinikum des  
Saarlandes

10/2004 – 02/2005

Assistenzärztin in der Klinik für Psychiatrie  
und Psychotherapie am Universitätsklinikum des  
Saarlandes

03/2005 – 09/2005

Assistenzärztin in der Klinik für Kinder- und Jugend –  
psychiatrie und Psychotherapie, Universitätsklinikum  
des Saarlandes

10/2005 – 02/2006

Assistenzärztin in der Klinik für Psychiatrie  
und Psychotherapie am Universitätsklinikum des  
Saarlandes

03/2006 – 04/2007

Assistenzärztin an der Klinik für Neurologie am  
Universitätsklinikum des Saarlandes

Seit 05/2007

Assistenzärztin in der Klinik für Psychiatrie  
und Psychotherapie am Universitätsklinikum des  
Saarlandes

Seit 19.03.2009

Fachärztin für Psychiatrie und Psychotherapie an der  
Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie des  
Universitätsklinikums des Saarlandes

**Publikation**

PAXIAN M., RENSING H, RICKAUER A, SCHÖNHOFEN S, SCHMECK J, PANNEN  
BHJ, BAUER I AND BAUER M

Kupffer cells and neutrophils as paracrine regulators of the heme oxygenase-1 gene in  
hepatocytes after hemorrhagic shock

Shock, 2001 Jun; 15(6): 438-45