

Aus der Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie  
des Universitätsklinikums des Saarlandes  
(Direktor: Univ. Professor Dr. Thomas Volk)

**Resveratrol reduziert den Leberschaden nach hämorrhagischem Schock an der  
Ratte via Östrogenrezeptor vermittelter Wirkentfaltung  
-eine tierexperimentelle Untersuchung-**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes  
2024

**vorgelegt von:  
Thilo Mertke  
geboren am 08.06.1983 in Berlin-Zehlendorf**



# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>6</b>
1.1.	Resveratrol verbessert die Leberfunktion via Östrogenrezeptor vermittelter Wirkentfaltung nach hämorrhagischem Schock der Ratte	6
1.2.	Resveratrol therapy improves liver function via estrogen-receptors after hemorrhagic shock in rats	8
<b>2.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>10</b>
2.1.	Schock	10
2.2.	Reperusionsphase	11
2.3.	Schockorgane	12
2.4.	Die Leber im Schock	12
2.5.	Resveratrol	14
2.6.	Die Wirkweise von Resveratrol	16
2.6.1.	Antioxidative Wirkung von Resveratrol	18
2.6.1.1.	Hochregulation von Phosphatase und Tensin Homologon (PTEN)	16
2.6.1.2.	Aktivierung von nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2)	17
2.6.1.3.	Aktivierung von forkhead box protein Os (FoxOs)	17
2.6.1.4.	Induktion von transcription factor EB (TFEB)	17
2.6.1.5.	AMP-activated protein kinase (AMPK)-Aktivierung	17
2.6.2.	Antiinflammatorische Wirkung	18
2.6.2.1.	Arachidonsäure-Kaskade	18

2.6.2.2. Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells NF-κB	19
2.6.2.3. SIRT1-Aktivierung	19
2.6.2.4. Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)	19
2.6.2.5. Aktivator-Protein-1 (AP-1)-Kaskade	19
2.6.3. Einfluss auf Zellzyklus und Apoptose	19
2.6.4. Beeinflussung des Energiehaushalts der Zelle durch Aktivierung der Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase (AMPK)	20
2.6.5. Östrogenrezeptorvermittelte Wirkung	20
2.7. Resveratrol und Schock	21
2.8. Fragestellung	22
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>23</b>
3.1. Tiere	23
3.2. Substanzen und Medikamente	23
3.3. Narkose	23
3.4. Chirurgisches Vorgehen	24
3.5. Hämorrhagisches Schockmodell	25
3.6. Versuchsprotokoll	26
3.7. Messung der Plasmaverschwinderate von Indocyaningrün	27
3.8. Intravitalmikroskopie	27
3.8.1. Autofluoreszenzmessung von Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH)	27
3.8.2. Messung der hepatischen Mikrozirkulation	28
3.8.2.1. Herstellung der Fluorescein-Isozyanat markierte Erythrozyten (FITC-Erythrozyten)	28

3.8.3.	Messung der hepatozellulären Integrität mittels Propidiumiodid	28
3.9.	Statistische Auswertung	29
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>30</b>
4.1.	Hämodynamik	30
4.2.	Plasmaverschwinderate von Indocyaningrün	33
4.3.	Intravitalmikroskopie	34
4.3.1.	Autofluoreszenzmessung von Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH)	34
4.3.2.	Messung der hepatischen Mikrozirkulation	35
4.3.2.1.	Anzahl der perfundierten Sinusoide	35
4.3.2.2.	Erythrozytäre Flussgeschwindigkeit	36
4.3.2.3.	Hepatischer Perfusionsindex	37
4.3.3.	Messung der hepatozellulären Integrität mittels Propidiumiodid	37
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>39</b>
5.1.	Zusammenfassung der Hauptergebnisse	39
5.2.	Diskussion der Methode	40
5.3.	Diskussion der Ergebnisse	42
5.3.1.	$PDR_{ICG}$	42
5.3.2.	Propidiumiodid gefärbte Zellen	43
5.3.3.	NADPH-Autofluoreszenz	44
5.3.4.	Hepatische Mikrozirkulation	45
5.3.5.	Stärken und Grenzen der Studie	46

5.4.	Schlussfolgerung	47
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>48</b>
<b>7.</b>	<b>Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen</b>	<b>61</b>
7.1.	Abbildungsverzeichniss	61
7.2.	Tabellen	62
<b>8.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	
<b>9.</b>	<b>Publikationen &amp; Danksagung</b>	<b>63</b>
8.1.	Publikationen	63
8.2.	Danksagungen	64
	<b>Lebenslauf</b>	<b>65</b>

# **1. Zusammenfassung**

## **1.1. Resveratrol verbessert die Leberfunktion via Östrogenrezeptor vermittelter Wirkentfaltung nach hämorrhagischem Schock der Ratte**

Resveratrol ist ein Phytoalexin, welches erstmals 1939 durch Michio Takaoka aus der Heilpflanze *Veratum grandiflorum* isoliert werden konnte. Nachdem das wissenschaftliche Interesse an der Substanz initial eher gering war, erfreut sich Resveratrol aktuell einer wachsenden Beliebtheit in der Forschung. Neben der positiven Beeinflussung von Erkrankungen wie Diabetes, Fettleber und Alzheimer konnten direkte, protektive Wirkungen für mehrere Organe gezeigt werden. So scheint Resveratrol eine protektive Wirkung auf Organe wie Gehirn, Herz, Niere und Leber in der Ischämie zu haben. Hierfür werden verschiedene Mechanismen verantwortlich gemacht. Zum einen hat Resveratrol eine eigene, antioxidative Aktivität. Zum anderen scheinen immunmodulierende Effekte von Resveratrol sowie Eingriffe in den Energiestoffwechsel der Zellen und Regulation antioxidativ aktiver Enzyme eine Rolle zu spielen. Für die intrazelluläre Wirkvermittlung von Resveratrol spielt hier, zumindest teilweise, die Aktivierung von Östrogenrezeptoren eine Rolle. Resveratrol kann dabei in gleicher Aktivität an die Östrogenrezeptoren 1 und 2 (E1 und E2) binden. Die Wirkung von Resveratrol am Rezeptor entspricht hierbei jedoch nur einem Bruchteil derer von Estradiol.

In der hier vorliegenden Studie untersucht unsere Forschungsgruppe die Organ-protektive Wirkung von Resveratrol nach hämorrhagischem Schock bei der Ratte am Beispiel der Leber. Mit Hilfe des Östrogenrezeptor-Antagonisten ICI 182,780 wurde zusätzlich die Rolle der Östrogenrezeptoren untersucht. Genutzt wurde ein druckgesteuertes Schockmodell, welches sich durch eine gute Reproduzierbarkeit und Abläufe nahe der klinischen Realität auszeichnet.

Hierzu durchliefen anästhesierte und spontanatmende, männliche Sprague-Dawley Ratten einen 90-minütigen, hämorrhagischen Schock. Dieser wurde durch die rasche Blutentnahme bis zu einem Mitteldruck von 30 – 40 mmHg ausgelöst. Im Anschluss an die Schockphase erfolgte die intravenöse Gabe von Resveratrol, Resveratrol + ICI 182,780, ICI 182,780 oder Vehikellösung. Es folgte eine 120-minütige Reperfusionphase. Hierbei wurden zunächst 60% des entnommenen Blutes retransfundierte. Zusätzlich erfolgte die Infusion von Vollelektrolytlösung in einer Dosis von 200% des entnommenen Blutvolumens in der ersten sowie % des entnommenen Blutvolumens in der zweiten Stunde. Als Kontrolle diente jeweils eine Sham-Gruppe, die zwar dasselbe chirurgische Vorgehen durchliefen, jedoch keinem hämorrhagischen Schock ausgesetzt wurden. Es erfolgten hier lediglich die Entnahme von Blutgasanalysen (BGA's) und eine kontinuierliche Infusion von Vollelektrolytlösung. Im Anschluss an den Versuchsaufbau erfolgten die Messungen.

Zur Überprüfung der exkretorischen Leberfunktion wurde die Messung der Plasmaverschwinderate von Indocyaningrün ( $PDR_{ICG}$ ) durchgeführt. Mittels Intravitalmikroskopie konnten Einblicke in Perfusion, Redox-Status und Zellschaden gewonnen werden.

Bei den Tieren, die einen hämorrhagischen Schock durchliefen, kam es zu einer signifikanten Verschlechterung der Plasmaverschwinderate von ICG ( $PDR_{ICG}$ ). Durch die Gabe von Resveratrol kam es zu einer signifikanten Verbesserung der  $PDR_{ICG}$  im Vergleich zu unbehandelten Tieren; dieser Effekt konnte durch die Gabe des Östrogenrezeptor-Antagonisten ICI 182,780 aufgehoben werden. Bei der hepatischen Perfusion sowie dem Redox-Status konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Der mittels Propidiumiodid dargestellte Zellschaden war in den Schock-Gruppen signifikant höher als in den Kontrollgruppen. Ausnahme bilden die Tiere, die im Anschluss an den hämorrhagischen Schock mit Resveratrol behandelt wurden. Hier konnte kein signifikant höherer Zellschaden, verglichen mit den Kontrollgruppen, nachgewiesen werden.

Die von uns erhobenen Ergebnisse zeigen, dass Resveratrol zu einer signifikanten Verbesserung der exkretorischen Leberfunktion sowie zu einem geringeren Zellschaden nach hämorrhagischem Schock bei der Ratte führt. Diese Effekte scheinen über Östrogenrezeptoren vermittelt zu werden, da sie mit Hilfe des Östrogenrezeptor-Antagonisten ICI 182,780 aufgehoben werden können.

## 1.2. Resveratrol improves liver function via estrogen receptors after hemorrhagic shock in rats

Resveratrol is a phytoalexin, which was first isolated by Michio Takaoka from *Veratum grandiflorum* in 1939. While scientific interest in resveratrol was initially quite limited, there is now a growing interest in this substance. In addition to its positive influence on conditions such as diabetes, fatty liver disease and Alzheimer's disease, resveratrol also seems to have a beneficial effect on several different organ systems. Interestingly, multiple studies have suggested a protective effect of resveratrol on organs such as the brain, heart, kidneys and liver during ischemia, and a number of potential explanatory mechanisms have been proposed. On one hand, resveratrol itself has antioxidative capacities. On the other hand, it has regulating effects on the immune system, influences cell metabolism, and can act as a promoter for antioxidant enzymes. Furthermore, estrogen-receptors seem to play a key role in mediating its intracellular activity. Resveratrol can bind to estrogen-receptors 1 and 2 (E1 and E2) with identical binding affinity. However, the strength of its agonist activity on the receptor is only a fraction of that of estradiol.

In this study, we examined the organ-protective activity of resveratrol after haemorrhagic shock on the liver in rats. Additionally, we used ICI 182,780, an estrogen-receptor antagonist, to evaluate the role of estrogen-receptors in mediating organ protection. For the purpose of this study, we used a pressure-driven shock model which stands out due to its reproducibility and its similarity to clinical practice.

In this experiment, anaesthetised and spontaneously breathing male Sprague-Dawley rats underwent haemorrhagic shock over a period of 90 minutes. Shock was induced by rapid withdrawal of blood with a target mean arterial pressure of 30 – 40 mmHg. After the shock period, either resveratrol, resveratrol + ICI 182,780, ICI 182,780 alone or a vehicle solution were administered intravenously. This was followed by a reperfusion period of 120 minutes. During this time, 60% of the withdrawn blood was re-administered intravenously. Additionally, rats were resuscitated with an infusion of Ringer's lactate solution in a dose of 200% of the extracted blood volume during the first hour, and 100% of the extracted blood volume during the second hour. Moreover, we included a control group for each experimental group, which underwent the same surgical procedures but did not undergo induction of haemorrhagic shock. In these control groups, blood samples were taken and a continuous infusion of Ringer's lactate solution was administered. This experimental protocol was followed by data acquisition.

To assess excretory liver function, the plasma disappearance rate of indocyanine green ( $PDR_{ICG}$ ) was evaluated. Using intravital microscopy, it was possible to gain insight into hepatic perfusion, redox-state and cellular damage.

Animals that underwent hemorrhagic shock showed a significant decrease in the plasma disappearance rate of indocyanine green ( $PDR_{ICG}$ ). The administration of resveratrol led to a significant increase in  $PDR_{ICG}$ . However, this effect could not be observed in rats in whom ICI 182,780 was administered simultaneously. There were no detectable differences in hepatic perfusion and redox state between the groups. Cellular damage, as shown by propidium iodide uptake, was significantly more extensive in shock groups compared to control groups. An exception was found in animals that were treated with resveratrol after undergoing haemorrhagic shock. In these animals, no increase in cellular damage was detected compared to animals from the control groups.

Our results demonstrate a significant improvement in excretory liver function and a significant decrease in cellular damage following the administration of resveratrol after induction of haemorrhagic shock in rats. These effects seem to be mediated by estrogen-receptors, as the therapeutic effects of resveratrol could be antagonised by simultaneous administration of the estrogen-receptor antagonist ICI 182,780.

## 2. Einleitung

### 2.1. Schock

Der Schock und seine Folgen stellen in der heutigen Intensiv- und Notfallmedizin nach wie vor ein akut lebensbedrohliches Krankheitsbild mit einer hohen Letalität dar. In ihrem Consensus-Paper von 2014 definiert die European Society of Intensive Care Medicine den Schock wie folgt [16]:

*„Shock is best defined as a life-threatening, generalized form of acute circulatory failure associated with inadequate oxygen utilization by the cells. It is a state in which the circulation is unable to deliver sufficient oxygen to meet the demands of the tissues, resulting in cellular dysfunction.“*

*„Schock ist am besten definiert als eine lebensbedrohliche, generalisierte Form des akuten Kreislaufversagens in Kombination mit einem inadäquaten Sauerstoffumsatz der Zellen. Es ist ein Zustand, in dem der Kreislauf nicht in der Lage ist, den Geweben [Organen] genug Sauerstoff zu liefern, um ihre Anforderungen zu erfüllen, woraus eine zelluläre Dysfunktion resultiert.“*

Schock resultiert aus einer oder der Kombination der folgenden Ursachen:

- 1) verminderter venöser Rückfluss
- 2) kardiales Pumpversagen
- 3) Obstruktion großer Gefäße oder des Herzens
- 4) Verlust des Gefäßtonus mit resultierender Fehldistribution

Der hämorrhagische Schock ist charakterisiert durch einen Verlust und daraus resultierendem Mangel an Sauerstoffträgern, sowie zirkulierendem Blutvolumen. Veranschaulichen lässt sich dies mit Hilfe der Formel:

$$D_{O_2} = ((pS_{O_2} \times Hb \times 1,34) + (P_{O_2} \times 0,003)) \times HZV$$

Das Sauerstoffangebot  $D_{O_2}$  setzt sich also wie folgt zusammen: die prozentuale Sättigung ( $pS_{O_2}$ ) des Hämoglobins (Hb) multipliziert mit dem Korrekturfaktor 1,34, da 1g Hämoglobin 1,34ml  $O_2$  transportieren. Addiert wird der geringe Anteil an physikalisch gelöstem Sauerstoff, berechnet aus dem Sauerstoffpartialdruck  $P_{O_2} \times 0,003$ . Multipliziert mit dem Herz-Zeit-Volumen (HZV) ergibt sich so das globale Sauerstoffangebot.

Zwar kann ein gewisser Blutverlust noch über eine Steigerung des Herz-Zeit-Volumens ausgeglichen werden, jedoch reicht dies im Verlauf der Blutung mit dem resultierenden Mangel an Sauerstoffträgern nicht mehr aus, um eine ausreichende Sauerstoffversorgung der Gewebe zu gewährleisten. Zusätzlich führt ein verringertes Blutvolumen zu einer Abnahme des

Schlagvolumens, wodurch, trotz gesteigerter Frequenz, kein ausreichendes Herz-Zeit-Volumen mehr sichergestellt werden kann.

Durch die sympathoadrenerge Aktivierung kommt es zu einer peripheren Vasokonstriktion mit Umverteilung des Blutflusses zu den akut lebenswichtigen Organen wie Herz und Gehirn. Dies geht auf Kosten der Durchblutung der, in der Akutsituation für das Überleben weniger wichtigen, Organe wie Darm, Niere und Leber. Durch diesen Mechanismus kommt es zu einer Aggravation des Sauerstoffdefizits in diesen Organen. Die Zellen sind gezwungen, zunehmend auf anaeroben Stoffwechsel umzustellen, es kommt zu einem Mangel energiereicher Substrate wie Adenosin-Triphosphat und einer Ansammlung anaerober Stoffwechselendprodukte wie Laktat in den Zellen. Der Mangel an ATP führt zu einer verminderten Aktivität der  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ , und  $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$ . Hierdurch kommt es zu einer Ansammlung von  $\text{Na}^+$  in den Zellen. Der so entstehende Anstieg der intrazellulären  $\text{Na}^+$ -Konzentration sorgt für eine Hemmung des  $\text{Na}^+\text{-H}^+\text{-Antiports}$ . Der so resultierende Anstieg der extrazellulären  $\text{H}^+$ -Konzentration sowie die Anreicherung von Laktat führen zu einer Azidose. Durch eine intrazelluläre Anreicherung von osmotisch aktiven Teilchen kommt es zu einem Wassereinstrom mit resultierender Schwellung der Zellen. Durch die intrazelluläre Azidose kommt es zu einer gestörten Enzymaktivität und verringerter Proteinbiosynthese. [103]

## 2.2. Reperusionsphase

In der Reperusionsphase kommt es häufig zu einer weiteren Schädigung der Organe, dem sogenannte Reperfusionssyndrom oder Ischämie-Reperfusionssyndrom.

Das Ischämie-Reperfusionssyndrom ist definiert als „*paradoxe Exazerbation von zellulärer Dysfunktion und Zelltod, die auf die Wiederherstellung des Blutflusses in zuvor ischämien Geweben folgt* [18].

Die Wiederherstellung der Sauerstoffversorgung und der Mangel an antioxidativen Substanzen in ischämien Zellen führt zu einer Ansammlung reaktiver Sauerstoffspezies. Zusätzlich wird die Bildung von Sauerstoffradikalen mittels verschiedener Signalwege angeregt. Der so entstehende oxidative Stress nimmt eine Schlüsselrolle für den Reperfusionsschaden ein. Er sorgt seinerseits für DNA-Schäden und Schädigung von Zellmembranen. Zusätzlich kommt es zur Ausschüttung von Entzündungsmediatoren wie  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{IFN-}\gamma$  und Phospholipase A2, Thromboxanen und Leukotrienen. Es kommt zur Einwanderung von Mastzellen und Makrophagen, die ihrerseits zu oxidativem Stress und einer Aggravation der Entzündungsreaktion beitragen. [103, 87] Das entstehende capillary-leak Phänomen führt seinerseits zu Ödembildung mit einer verlängerten Diffusionsstrecke, Zellschwellungen und -untergang. [26, 12] Bedingt durch Immun- und

Komplementaktivierung kann es zu einem Cytokinsturm mit systemischer Entzündungsreaktion kommen. So können auch andere Organe geschädigt werden.

### **2.3. Schockorgane**

Durch die oben genannten Mechanismen kommt es zur Ausbildung typischer Schockorgane, also Organe, die im Falle des Schocks zuerst entsprechende, charakteristische Veränderungen zeigen. Auch wenn prinzipiell jedes Organ zum Schockorgan werden kann, sind typischerweise Niere, Leber, Darm und Gehirn zuerst betroffen. Im Folgenden soll auf die Besonderheiten der Leber in ihrer Rolle als Schockorgan eingegangen werden.

### **2.4. Die Leber im Schock**

Die Leber in ihrer zentralen Lage im rechten Oberbauch nimmt das Blut aus dem Darmtrakt auf. Als zentrales Stoffwechselorgan fließen normalerweise bis zu 25% des Herz-Zeit-Volumens durch die Leber. Hierbei werden etwa 20-30% über die *Arteria hepatica* und 70-80% über die *Vena portae hepatis* gestellt. [52] Mikroskopisch lässt sich die Leber in funktionelle Einheiten, die sogenannten Sinusoide, einteilen. Diese werden eingegrenzt durch Triplets aus Lebervene, -arterie und einen Gallengang, in ihrer Mitte befindet sich die Zentralvene.

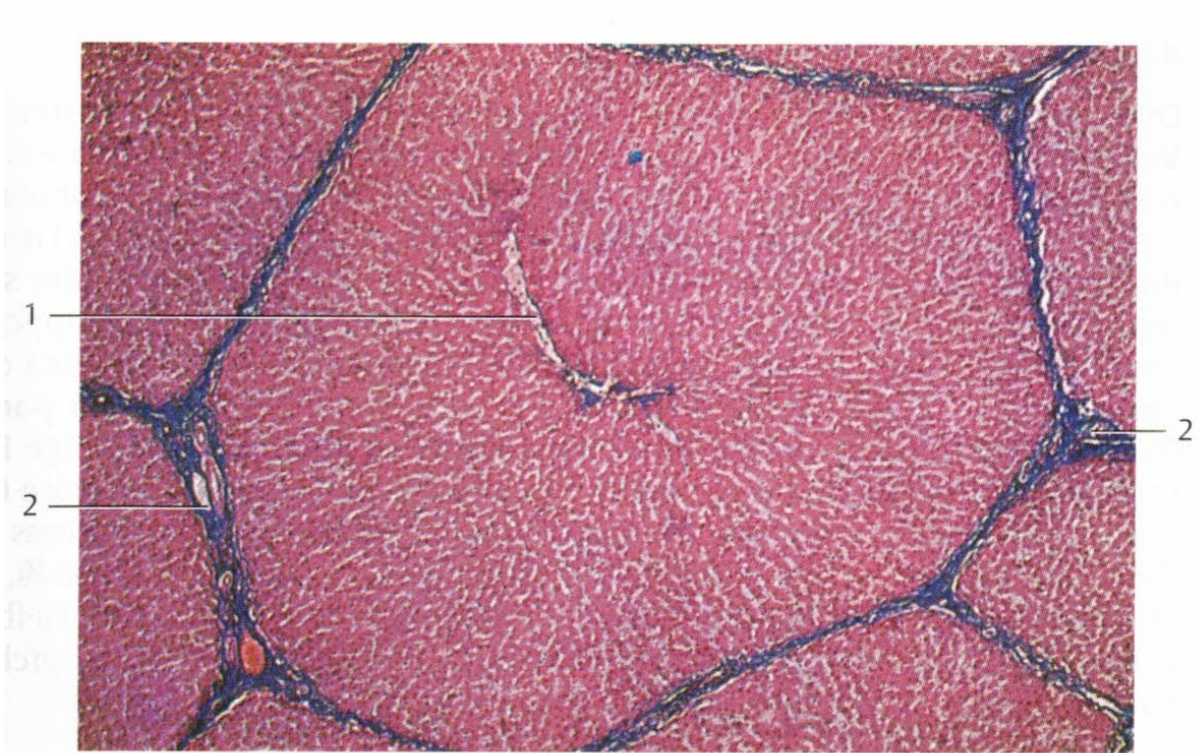


Abbildung 1: Zentralvenenläppchen (1: *V. centralis*, 2: *A. hepatica*, *V. portae*), Schweineleber Taschenatlas Histologie, 13te Auflage, Wolfgang Kühnel, Thieme 2014.

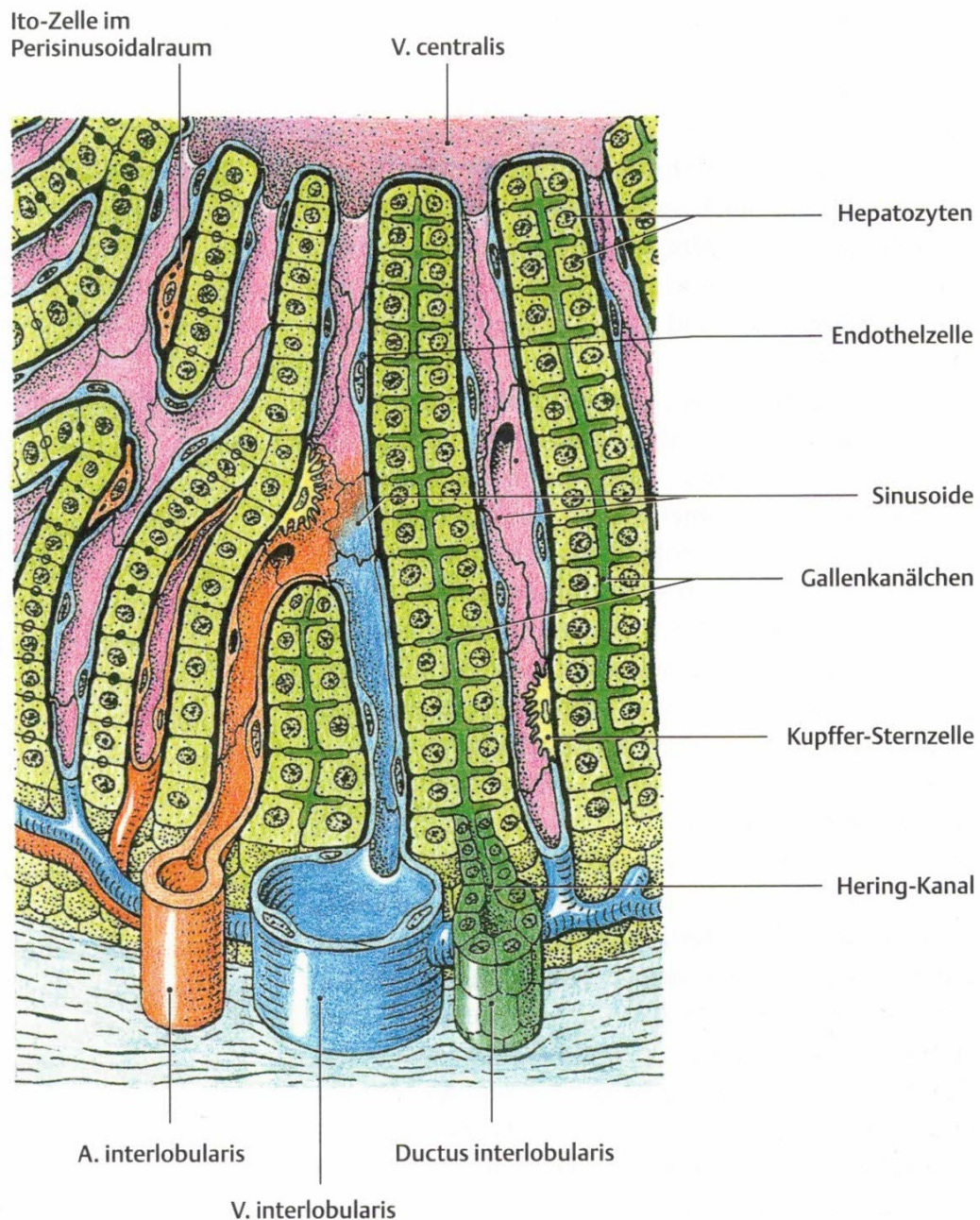


Abbildung 2: Periportalfeld und Lebersinusoide zwischen Leberzellbalken, Kurzlehrbuch Histologie, Norbert Ulfig, Thieme 2005

Im Schock gehört die Leber zu den ersten Organen, deren Durchblutung auf Grund der sympathoadrenergen Aktivierung reduziert wird. Auf Grund der abnehmenden Nährstoffversorgung hin zu den Zentralvenen ist dies der Ort, von dem ausgehend sich erste Nekrosen bilden. Es bilden sich die charakteristischen, zentrilobulären Nekrosen aus.

Als Zeichen des Leberzelluntergangs kommt es zu einem sprunghaften, fulminanten Anstieg der Transaminasen Aspartat-Aminotransferase, (ASAT, früher Glutamat-Oxalacetat-Transaminase kurz GOT) und Alanin-Aminotransferase, (ALAT, auch Glutamat-Pyruvat-Transaminase kurz GPT).

Durch die eingeschränkte Leberfunktion kommt es zur Ansammlung neurotoxischer Metabolite wie Ammoniak und  $\gamma$ -Aminobuttersäure. Die reduzierte Syntheseleistung der Leber zeigt sich durch eine Koagulopathie mit Anstieg der internationaly normalized Ratios (INR) und Abfall der Prothrombinzeit. Auch die Albuminsynthese ist verringert, auf Grund der langen Halbwertszeit des Albumins ist dies jedoch in der Akutphase laborchemisch nicht nachweisbar. [22, 45, 83]

Als Folge der Reperfusion kommt es vornehmlich durch Bildung reaktiver Sauerstoffspezies zur weiteren Leberzellschädigung und Induktion einer Immunantwort. Hierbei schädigt sich die Leber nicht nur selbst, vielmehr kommt es durch Induktion eines systemic inflammatory response Syndroms (SIRS) zu einer systemischen Organschädigung. Folgen können beispielsweise ein hepatopulmonales Syndrom oder ARDS (acute respiratory distress Syndrome) sein. [32, 33]

Das Outcome des schockbedingten Leberversagens ist schlecht. Nur etwa 50% der Patienten überleben den ersten Monat, die Überlebenschance nach einem Jahr beträgt 25%. [21]

## 2.5. Resveratrol

Bei Resveratrol handelt es sich um ein Phytoalexin, welches erstmals 1939 durch den Japaner Michio Takaoka in der Heilpflanze *Veratum grandiflorum* nachgewiesen werden konnte. [91] Der Trivialname Resveratrol setzt sich aus dem Pflanzennamen und der chemischen Struktur zusammen. Es handelt sich um ein Resorzin Derivat, das in Pflanzen der *Veratum*-Gruppe vorkommt und einen Alkohol bildet. Chemisch handelt es sich um 3,4',5-trihydroxy-*trans*-stilbene [72] und kommt in der, wesentlich häufigeren *Trans*-Konfiguration sowie der instabileren *Cis*-Konfiguration vor:

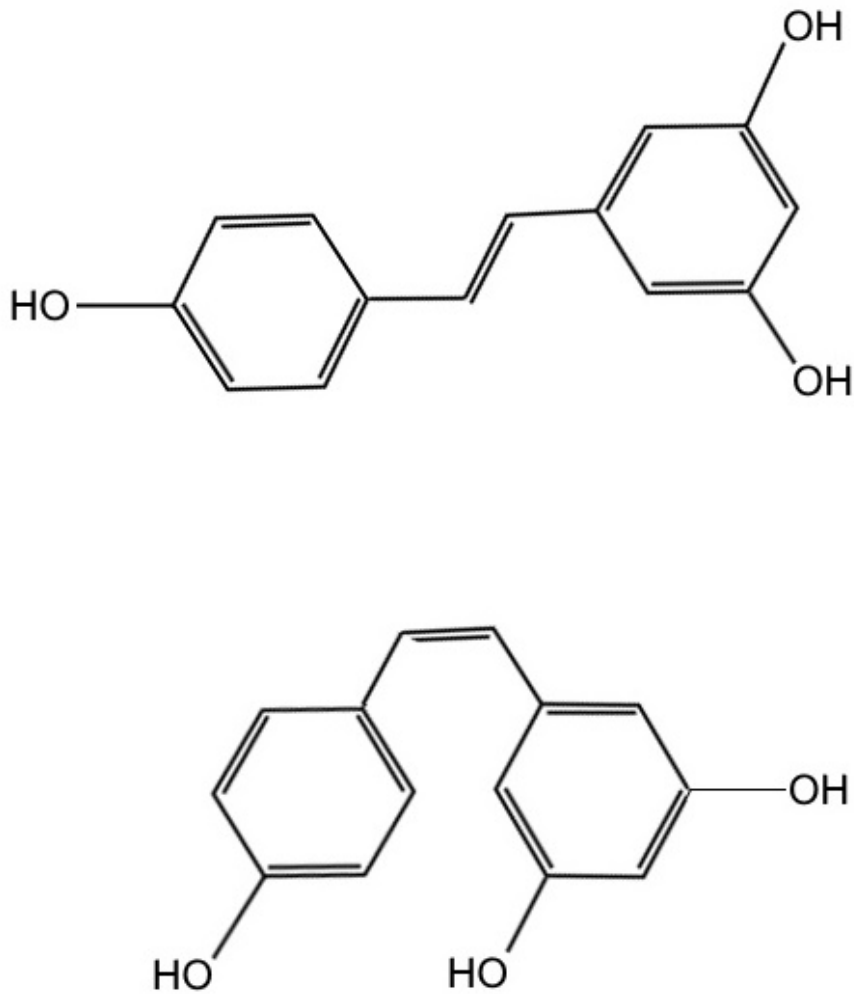


Abbildung 3: Struktur von Resveratrol, die häufigere trans-Konfiguration oben, die instabilere cis-Konfiguration unten (T. Mertke, Laboratorium der experimentellen Anästhesie, Uks Homburg, Saar)

Nach der initialen Beschreibung von Resveratrol wurde zunächst wenig zum Thema Resveratrol publiziert. Eine Pubmed-Suche mit dem Schlagwort Resveratrol bringt für den Zeitraum von Entdeckung bis Mitte der 1990er Jahre lediglich 47 Resultate. Seither ist die Anzahl an Publikationen explodiert, insgesamt sind mittlerweile 18.856 Artikel zum Schlagwort Resveratrol bei Pubmed gelistet (stand November 2024).

Nebenbei hat Resveratrol als Nahrungsergänzungsmittel einen regelrechten Hype erlebt, beworben mit mannigfaltigen, teils wenig belegten Vorteilen für die Gesundheit und einer lebensverlängernden

Wirkung. So führt allein der Online-Händler Amazon 126 Produkte in der Kategorie „Antioxidant Resveratrol“. Auch in Kosmetikprodukten findet Resveratrol als „anti-aging“ Substanz zunehmend Anwendung.

In wissenschaftlichen Publikationen sind diverse Organ-protective Eigenschaften beschrieben worden, darunter für das Herz [21, 69], das Gehirn [53, 78, 37, 112] und die Nieren. [40] Weiter werden antikanzerogene Wirkungen untersucht, [55, 77, 95] auch klinische Studien zur Wirkung von Resveratrol bei Morbus Alzheimer sind durchgeführt worden. [85, 41]

Resveratrol wird weiterhin als Erklärung für das „french paradox“ diskutiert, da es in hoher Konzentration in der Schale der blauen Weintraube und daraus resultierend Rotwein vorkommt. [15]

## **2.6. Die Wirkweise von Resveratrol**

Für Resveratrol sind unterschiedliche Wirkmechanismen und Wirkorte beschrieben worden, angefangen bei der eigenen, antioxidativen Aktivität bis zur Regulation verschiedener Gene. [73, 35] Für die Wirkentfaltung im hämorrhagischen Schock stehen die antioxidative Wirkung von Resveratrol, sowie seine antiinflammatorische und immunmodulierende Wirkung im Vordergrund. Auch die Einwirkung auf Zellzyklus und Apoptose sowie auf den Energiehaushalt der Zelle erscheinen als wichtige Ansatzpunkte. Ferner sind durch Östrogenrezeptor vermittelte Wirkungen beschrieben, was teils zu unterschiedlichen Ausprägungen der Wirkung in Abhängigkeit vom Geschlecht führt.

### **2.6.1. Antioxidative Wirkung von Resveratrol**

Zunächst besitzt Resveratrol an sich eine antioxidative Wirkung. [105] Jedoch wirkt Resveratrol nicht nur als Elektronenakzeptor an sich, sondern wirkt auch regulatorisch auf die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies ein. So hemmt es Komplex III der Atmungskette durch Konkurrenz zu Coenzym Q. [115] Zusätzlich wird die Expression von antioxidativ aktiven Enzymen wie Catalase [27] und Superoxid Dismutase [47], Glutation Peroxidase NADPH Guinon Oxidoreductase und Glutathin-S-Transferase aktiviert. [81]

Für die regulatorische Wirkung von Resveratrol sind fünf Signalkaskaden verantwortlich: Die Hochregulation des Phosphatase und Tensin Homologons (PTEN), die Aktivierung von nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (NRF2), die Aktivierung von forkhead box protein Os (FoxOs), die Induktion von transcription factor EB (TFEB) sowie die Aktivierung der AMP-activated protein kinase (AMPK). Auf diese soll im Folgenden eingegangen werden:

#### **2.6.1.1. Hochregulation von Phosphatase und Tensin Homologon (PTEN)**

Resveratrol sorgt für eine Aktivierung des Phosphatase und Tensin Homologons (PTEN), was wiederum zu einer Phosphorylierung von AKT führt. AKT sorgt für eine Dephosphorylierung des forkhead box protein Os (FoxOs), was somit länger im Nukleus verbleibt, und so als Transkriptionsfaktor zu einer vermehrten Synthese antioxidativ aktiver Enzyme wie Superoxid Dismutase und Catalase führt. [47]

#### **2.6.1.2. Aktivierung von nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2)**

Der nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2) stellt einen der Hauptregulatoren für mehrere, antioxidativ wirkender Gene dar. Im Cytoplasma liegt er inaktiviert im Komplex mit dem Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) vor. Resveratrol sorgt für eine Lösung des Nrf2/Keap1 Komplex. Nrf2 kann so in den Nucleus transferieren und in Kombination mit dem antioxidant response Element (ARE) für eine Transkription antioxidativer Enzyme sorgen.[58]

#### **2.6.1.3. Aktivierung von forkhead box protein Os (FoxOs)**

Resveratrol hat eine direkte, stabilisierende Wirkung auf die dephosphorylierte Form von FoxOs. Somit wird die Transkription antioxidativer Gene gefördert.[80, 110]

#### **2.6.1.4. Induktion von transcription factor EB (TFEB)**

Resveratrol aktiviert den transcription factor EB (TFEB), was die Bildung von Autophagosomen und Lysosomen fördert. Auch deren Fusion zu einem Autophagolysosom wird gefördert.[114]

#### **2.6.1.5. AMP-activated protein kinase (AMPK)-Aktivierung**

Durch die Aktivierung der AMP-activated protein kinase (AMPK) werden gleich mehrere Effekte vermittelt: Zum einen wird die Integrität der dephosphorylierten Form von FoxOs erhöht und dessen Translokation in den Zellkern gefördert. So steigt dessen Aktivität im Zellkern. Zum anderen sorgt AMPK für eine Dephosphorylierung von peroxisome proliferator-activated receptor gamma

coactivator 1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ). Nach Deacetylierung durch Sirtuin-1 (SIRT1) sorgt PGC-1 $\alpha$  wiederum für eine Stimulation von Nrf2 und verstärkt somit dessen transkribierende Aktivität.[110]

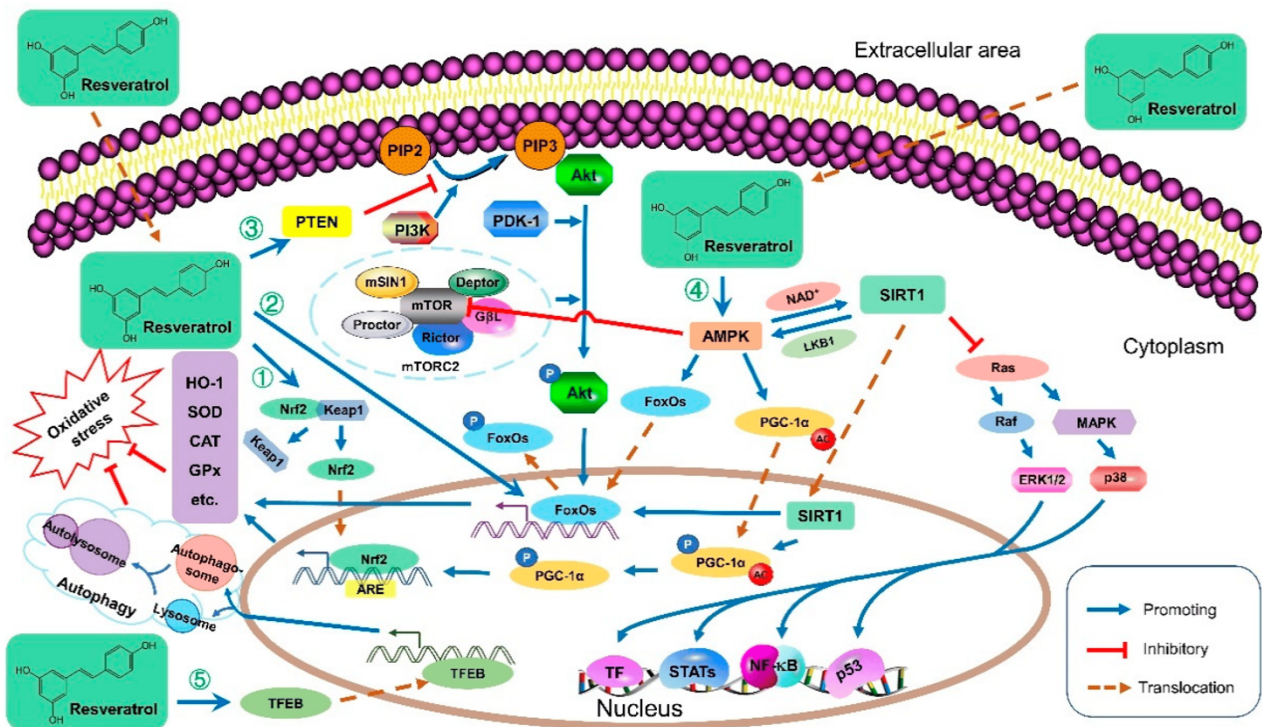


Abbildung 4: Antioxidative Wirkmechanismen von Resveratrol (Health Benefits and Molecular Mechanisms of Resveratrol: A Narrative Review, Meng *et al.*, Foods 2020, 9, 340).

### 2.6.2. Antiinflammatorische Wirkung

Es sind mehrere antiinflammatorische Wirkweisen von Resveratrol beschrieben. So konnten unter Therapie mit Resveratrol eine signifikante Senkung von Entzündungsmediatoren wie beispielsweise der proinflammatorischen Cytokine Interleukin 2, 6 und 19 (IL-2, IL-6, IL-19) und Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) bei Hasen nachgewiesen werden. [113] Auch eine Reduktion der Cyclooxygenase-2 (COX-2) Aktivität konnte nachgewiesen werden. [56] Bei mit dem Humanen T-lymphotropen Virus 1 (HTLV-1) infizierten T-Zellen konnte *in vitro* eine Reduktion der Zytokinexpression nachgewiesen werden, [31] zusätzlich konnte eine Hemmung der Lymphozytenproliferation gezeigt werden. [36] Diese antiinflammatorische Wirkung spielt beispielsweise auch für die protektive Wirkung auf Gefäßsystem und Gehirn eine Rolle. [111, 9]

Wie auch die antioxidative Wirkung wird die antiinflammatorische Wirkung von Resveratrol über mehrere Signalkaskaden bzw. Wirkorte vermittelt:

- Die Arachidonsäure-Kaskade
- Die Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (NF-κB) Kaskade
- Die Aktivierung von Sirtuin 1
- Die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)
- Die Aktivator-Protein-1 (AP-1)-Kaskade

#### **2.6.2.1. Arachidonsäure-Kaskade**

Die Arachidonsäure wird unter Katalyse durch die Cyclooxygenase zu Eicosanoiden oxidiert. Resveratrol hemmt sowohl die Aktivität der Cyclooxygenase als auch ihre Transkription. Somit kommt es zu einer verminderten Umwandlung der Arachidonsäure zu Prostaglandinen wie PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub> und Thromboxanen.[60, 89]

#### **2.6.2.2. Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (NF-κB)**

Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (NF-κB) stellt dabei eine Familie von Transkriptionsfaktoren dar, welche für die Expression einer ganzen Reihe von Genen verantwortlich ist, die regulatorisch auf die inflammatorische Antwort der Zellen wirkt. Normalerweise liegt NF-κB inaktiv im Zytoplasma vor. Resveratrol kann die Aktivierung von NF-κB hemmen und verringert so die durch NF-κB vermittelte Expression der proinflammatorischen Zytokine IL-1, IL-6 und IL-10 sowie TNF-α.[61, 84]

#### **2.6.2.3. SIRT1-Aktivierung**

Die Aktivierung von Sirtuin 1 (SIRT1) spielt eine Rolle bei der antiinflammatorischen Wirkung von Resveratrol. Durch die Resveratrol vermittelte Aktivierung von SIRT1 kommt es zu einer Hemmung der Toll-like-Rezeptor-4 (TLR-4) / NF-κB Kaskade und so zur verstärkten Hemmung der oben genannten Zytokine. [46]

#### **2.6.2.4. Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)**

Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) stellen eine Familie stressinduzierbarer Kinasen dar, die eine Schlüsselrolle bei mehreren Prozessen wie Apoptose, Proliferation, Differenzierung und Entzündung einnehmen. Sie werden durch Translokation in den Zellkern aktiviert und aktivieren ihrerseits dort verschiedene Transkriptionsfaktoren wie NrF2 und NF-κB durch Phosphorylierung. Durch Hemmung der MAPK kann Resveratrol beispielsweise die Expression von COX-2 hemmen. [20, 30]

#### **2.6.2.5. Aktivator-Protein-1 (AP-1)-Kaskade**

Das Aktivator-Protein-1 (AP-1) reguliert eine Reihe von Vorgängen, wie beispielsweise Proliferation, Differenzierung, Inflammation und Apoptose. Resveratrol kann die TNF-vermittelte Aktivierung von AP-1 blockieren und so die AP-1 vermittelte Genexpression reduzieren. Auf diese Weise kann Resveratrol die Produktion von IL-8 und COX-2 reduzieren.[62, 92]

#### **2.6.3. Einfluss auf Zellzyklus und Apoptose**

Resveratrol kann an Integrin  $\alpha_v\beta_3$  binden, wodurch es zu einer Aktivierung der Extracellular-signal Regulated Kinases 1 und 2 (ERK 1/2) kommt. [75] Hierdurch wird die Expression der COX-2 induziert. Es wird angenommen, dass COX-2 an das Small Ubiquitin-Related Modifier-1 (SUMO-1) sowie die phosphorylierte Form von ERK 1/2 bindet. [59] In Bindung mit p53 transloziert der Komplex in den Nukleus, wo es zu einer Phosphorylierung von p53 und der Transkription p53-abhängiger Gene und Induktion der Apoptose kommt. [90]

#### **2.6.4. Beeinflussung des Energiehaushalts der Zelle durch Aktivierung der Adenosinmonophosphat-aktivierten Proteinkinase (AMPK)**

Die AMPK stellt eine wichtige Kontrollinstanz des zellulären Energiehaushalts und Regulator der zellulären Homöostase dar. Hierbei reagiert AMPK auf Veränderungen im intrazellulären Verhältnis von Adenosintriphosphat (ATP), Adenosindiphosphat (ADP) und Adenosinmonophosphat (AMP). Die Aktivierung von AMPK führt zu einer gesteigerten Energiebereitstellung durch verstärkte Fettsäureoxydation [100, 1], Glycolyse [63, 3] und Glucoseaufnahme [54, 104]. Es kommt zu einer verstärkten Energiebereitstellung aus Zellbestandteilen mittels Autophagie [10] sowie zu einer gesteigerten, mitochondrialen Biogenese. [4, 51]

Gleichzeitig werden anabole Stoffwechselschritte durch AMPK gehemmt. So werden beispielsweise Glycogensynthese und Gluconeogenese [68] sowie die Fettsäure- und Cholesterolsynthese [14, 70] gehemmt.

Die Aktivierung der AMPK durch Resveratrol konnte in verschiedenen Geweben nachgewiesen werden.

Es konnte gezeigt werden, dass die AMPK Aktivierung eine wichtige Rolle bei der Neuroprotektion am ischämischen Hirn der Ratte spielt. Verantwortlich wird hierfür die AMPK vermittelte Autophagie gemacht. [74] Auch für die kardio-protective Wirkungen von Resveratrol im metabolischen Syndrom scheint die Reduktion der ROS-Konzentration durch Induktion der Autophagie via AMPK eine wichtige Rolle zu spielen. Die verringerte ROS-Konzentration führt hier zu einer geringeren endothelialen Dysfunktion. [88]

#### **2.6.5. Östrogenrezeptorvermittelte Wirkung**

Resveratrol kann in gleicher Aktivität an die Östrogenrezeptoren 1 und 2 binden (ER-1 und ER-2). Hierbei kann es sowohl als Agonist, als auch als Antagonist wirken. [8] In seiner Wirkung ist Resveratrol jedoch etwa 7.000 mal schwächer als Estradiol. [38] Resveratrol wirkt dabei allerdings nicht auf alle Signalkaskaden stimulierend, sondern nur selektiv. So wird mittels Östrogenrezeptoren eine Hochregulation der Transkription antioxidativer Enzyme bewirkt. [7, 86] Auch für die immunmodulierende Wirkung von Resveratrol spielen Östrogenrezeptoren eine wichtige Rolle. Es konnte eine signifikante Reduktion der Expression von IL-6 in der Leber nach hämorrhagischem Schock nachgewiesen werden. [109] Gleichzeitig führt die Gabe von Resveratrol jedoch nicht zu einer Proliferation des Uterusendothels oder einer Gewichtszunahme des Uterus von Ratten. [94]

## 2.7. Resveratrol und Schock

Die beschriebenen Wirkungen von Resveratrol machen es zu einer interessanten Substanz bei dem Versuch, die Folgen eines hämorrhagischen Schocks zu mindern und das Outcome von Patienten mit diesem Krankheitsbild zu verbessern.

Zwar gibt es bereits einige Publikationen zum Thema Ischämie-Reperfusionsschaden, jedoch relativ wenige im Zusammenhang mit hämorrhagischem Schock.

Ayub *et al.* konnten zeigen, dass die Gabe von Resveratrol während der Reperfusion zu einem längeren Überleben nach hämorrhagischem Schock bei Ratten führt. [2] Die genauen Vorgänge sind jedoch noch unklar.

Als mögliche Wirkweise kommen mehrere in Frage:

Zunächst ist die antioxidative Wirkung von Resveratrol zu nennen. Hierbei scheint jedoch die Expression antioxidativer Enzyme eine wichtigere Rolle zu spielen als die direkte, antioxidative Wirkung von Resveratrol. Als Grund hierfür wird die geringe Plasma- und Gewebekonzentration diskutiert, die nach Behandlung mit Resveratrol erreicht wird. [43]

Zweiter Punkt ist die immunmodulierende Wirkung von Resveratrol. Die Gabe von Resveratrol in der Reperusionsphase bewirkt eine signifikante Reduktion an Entzündungsmediatoren in Leber [107], Lunge [102] und Herz [93]. Dies korreliert mit einem verringerten Gewebeschaden. Außerdem bewirkt die Gabe von Resveratrol eine verbesserte myokardiale Kontraktilität. [50] Möglicherweise sind Teile der Wirkung mittels Östrogenrezeptoren vermittelt. Yu *et al.* konnten nachweisen, dass Resveratrol zwar zu einer signifikanten Reduktion an IL-6, ICAM-1 und Chemokinen führt, dieser Effekt jedoch durch die Gabe des Östrogenrezeptor-Antagonisten ICI 182,780 aufgehoben wird. [109] Dies reiht sich ein in die Beobachtung, dass prämenopausale Frauen ein geringeres Risiko für die Entwicklung eines Mehrorganversagens nach hämorrhagischem Schock haben als Männer in gleichem Alter und mit gleicher Verletzungsschwere. [29]

Drittens sorgt Resveratrol für einen geringeren Schaden an Mitochondrien nach hämorrhagischem Schock. So führt es zu einer verbesserten mitochondrialen Funktion und verringerte mitochondriale Synthese vom ROS in Leber und Niere. [97] Hao *et al.* konnten zeigen, dass die Gabe von Resveratrol eine verbesserte aerobe Kapazität und verringerte Laktatproduktion in den Mitochondrien der Niere bewirkt. [98]

## 2.8. Fragestellung

In verschiedenen Untersuchungen an unterschiedlichen Organen konnte bereits eine protektive Wirkung von Resveratrol gezeigt werden. Die beschriebenen, antiinflammatorischen und antioxidativen Wirkungen von Resveratrol sowie seine Wirkung auf Energiestoffwechsel und Apoptose machen es zu einer interessanten Substanz im Hinblick auf die Verminderung eines Reperfusionsschadens. Hierbei scheinen die Wirkungen teilweise durch Östrogenrezeptoren vermittelt zu werden.

Die meisten der durchgeführten Studien untersuchen die Wirkung von Resveratrol *in vitro*, die Wirkungsentfaltung *in vivo* ist jedoch noch wenig untersucht. Gleichzeitig basieren viele der Daten auf einem Ischämie-Reperusions-Modell, wenige der Daten stammen aus Modellen mit hämorrhagischem Schock.

In der hier vorgestellten Studie untersucht unsere Forschungsgruppe die Organ-protektiven Wirkungen von Resveratrol am Beispiel der Leber. Hierzu wurde *in vivo* an einem klinisch relevanten, druckkontrollierten Modell des hämorrhagischen Schocks am Rattmodell untersucht, ob die Organ-protektiven Eigenschaften von Resveratrol nachweisbar sind und inwiefern diese über Östrogenrezeptoren vermittelt sind.

Der gewählte Versuchsaufbau bewegt sich hierbei nahe an der klinischen Realität. Die Zeitabfolge aus hämorrhagischem Schock und die im Anschluss gegebene Medikation stellen Abläufe in der Notfallmedizin nach. Die Gabe der Medikation nach dem Ereignis entspricht, im Gegensatz zu Untersuchungen nach einer Präkonditionierung, eher den Abläufen einer klinischen Intervention. Die Reperfusion erfolgte mittels einer Mischung aus Blutbestandteilen und kristalloider Lösung, entsprechend dem normalen klinischen Vorgehen.

Die Messung der Leberfunktion erfolgt *in vivo* mit der Plasmaverschwinderate von ICG ( $PDR_{ICG}$ ) anhand eines klinisch gut evaluierten Parameters.

Mit Hilfe der Intravitalmikroskopie können weitere Aussagen zu Vorgängen *in vivo* getroffen werden: Mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Erythrozyten kann die Durchblutung der Leber quantifiziert werden. Die Anfärbung freiliegender Doppelstrang-DNA ermöglicht die Darstellung terminal geschädigter Zellen und so die Quantifizierung des Leberzellschadens. Schließlich kann mit Hilfe der Autofluoreszenz von NADPH eine Aussage zum Redox-Status der Leberzellen getroffen werden.

Es wird die Hypothese aufgestellt, dass die Therapie mit Resveratrol zu einem reduzierten Leberschaden nach hämorrhagischem Schock bei der Ratte führt. Gemessen wird dies *in vivo* mit Hilfe der  $PDR_{ICG}$  sowie mit Hilfe der Intravitalmikroskopie der Leber.

## **3. Material und Methoden**

### **3.1. Tiere**

Als Versuchstiere kamen männliche Sprague-Dawley-Ratten mit einem Gewicht von 200-300 Gramm zum Einsatz. Diese wurden von Charles River Laboratories International, Inc., Sulzfeld, Deutschland bezogen. Die Versuche wurden nach Genehmigung durch das Landesamt für Soziales, Gesundheit und Verbraucherschutz, Saarbrücken, Genehmigung Nr. 47/2011 in den Laboratorien der experimentellen Anästhesie der Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie der Universitätskliniken des Saarlandes durchgeführt. Die Haltung der Tiere erfolgte in der Versuchstierhaltung der experimentellen Chirurgie des Universitätsklinikums des Saarlandes. Hier wurden die Tiere unter einem festen Tag/Nacht-Rhythmus von 12/12 Stunden gehalten. Während dieser Zeit hatte die Tiere freien Zugang zu Wasser und Trockenfutter. Die Tiere erhielten 12 Stunden vor dem Eingriff keine feste Nahrung. Wasser war weiterhin frei verfügbar.

### **3.2. Substanzen und Medikamente**

Der Östrogenrezeptor Antagonist ICI 182,780 wurde von Tocris, Bristol, UK bezogen. Resveratrol, sowie alle weiteren Substanzen wurden, soweit nicht anders angegeben, von der Firma Sigma-Aldrich, München erworben. Zur Herstellung der Stammlösungen wurde Resveratrol in Ethanol (EtOH) gelöst und mittels sterilisiertem und destilliertem Wasser auf eine Endkonzentration von 80 µg/ml verdünnt. ICI 182,870 wurde ebenfalls in EtOH gelöst und mit destilliertem und sterilisiertem Wasser auf eine Endkonzentration von 20 µg/ml verdünnt. Die Konzentration von EtOH in den verabreichten Lösungen war nicht höher als 1%.

### **3.3. Narkose**

Zur Narkoseeinleitung wurden die Tiere zunächst mittels Sevofluran inhalativ sediert. Die Narkose erfolgte mit Hilfe von Pentobarbital-Natrium (Narcoren; Merial GmbH, Hallbergmoos, Deutschland). Dies wurde in einer Dosierung von 60mg/kg Körpergewicht intraperitoneal in einen der unteren Quadranten des Abdomens injiziert. Die Narkosetiefe wurde so gewählt, dass das Tier jederzeit spontan atmete. Die Narkosetiefe wurde regelmäßig mit Hilfe von akustischen Reizen oder Schmerzreizen überprüft. Vor der chirurgischen Inzision wurde die Narkose um eine lokale Betäubung mittels Bupivacain 0,5% ergänzt. Nach dem Etablieren des zentralvenösen Zuganges,

wie in 3.4. beschrieben, wurde die Narkose durch intravenöse Gabe von Pentobarbital nach Bedarf fortgeführt.

### **3.4. Chirurgisches Vorgehen**

Die Tiere wurden in Rückenlage auf Korkplatten gelagert. Direkt bei der Lagerung der Tiere wurde eine rektale Temperatursonde zur Überwachung der Körpertemperatur gelegt. Diese wurde mittels externer Wärmequellen zwischen 36°C und 37,5°C in der Operations- und Reperfusionphase sowie zwischen 34,5°C und 35,5°C in der Schockphase konstant gehalten.

Nach Erreichen der chirurgischen Toleranz erfolgte ein ca. 2cm langer Schnitt median oberhalb des Sternums. Es folgte die Darstellung der Trachea und das Einführen einer Polyethylen- (PE-) Kanüle. Diese wurde ca. einen Zentimeter in die Trachea eingeführt, hierbei wurde auf seitengleiche Atembewegungen geachtet. Im Anschluss wurde die Kanüle, zur Minimierung des Totraumes, auf das notwendige Mindestmaß gekürzt. Ein flüssigkeitsgefüllter PE-Katheter wurde in die rechte *Vena jugularis* eingeführt. Er diente im weiteren Verlauf als Zugang für Infusionen und Injektionen. Ein weiterer, flüssigkeitsgefüllter PE-Katheter wurde in die linke *Arteria carotis communis* eingeführt. Er wurde über einen Druckwandler (DTXPlus; DT-XX, Argon Medical Devices, Athens, Texas, USA) an einen Überwachungsmonitor (Modell 66S; Hawlett Packard, Palo Alto, CA, USA) angeschlossen.



Abbildung 5: Versuchsaufbau mit Druckwandler zur arteriellen Druckmessung, rektaler Temperatursonde (links im Bild) sowie eingebrachtem Tracheostoma, zentralvenösem Zugang (oben im Bild) und arteriellem Zugang (unten im Bild) (T. Mertke, Laboratorium der experimentellen Anästhesie, Uks Homburg, Saar).

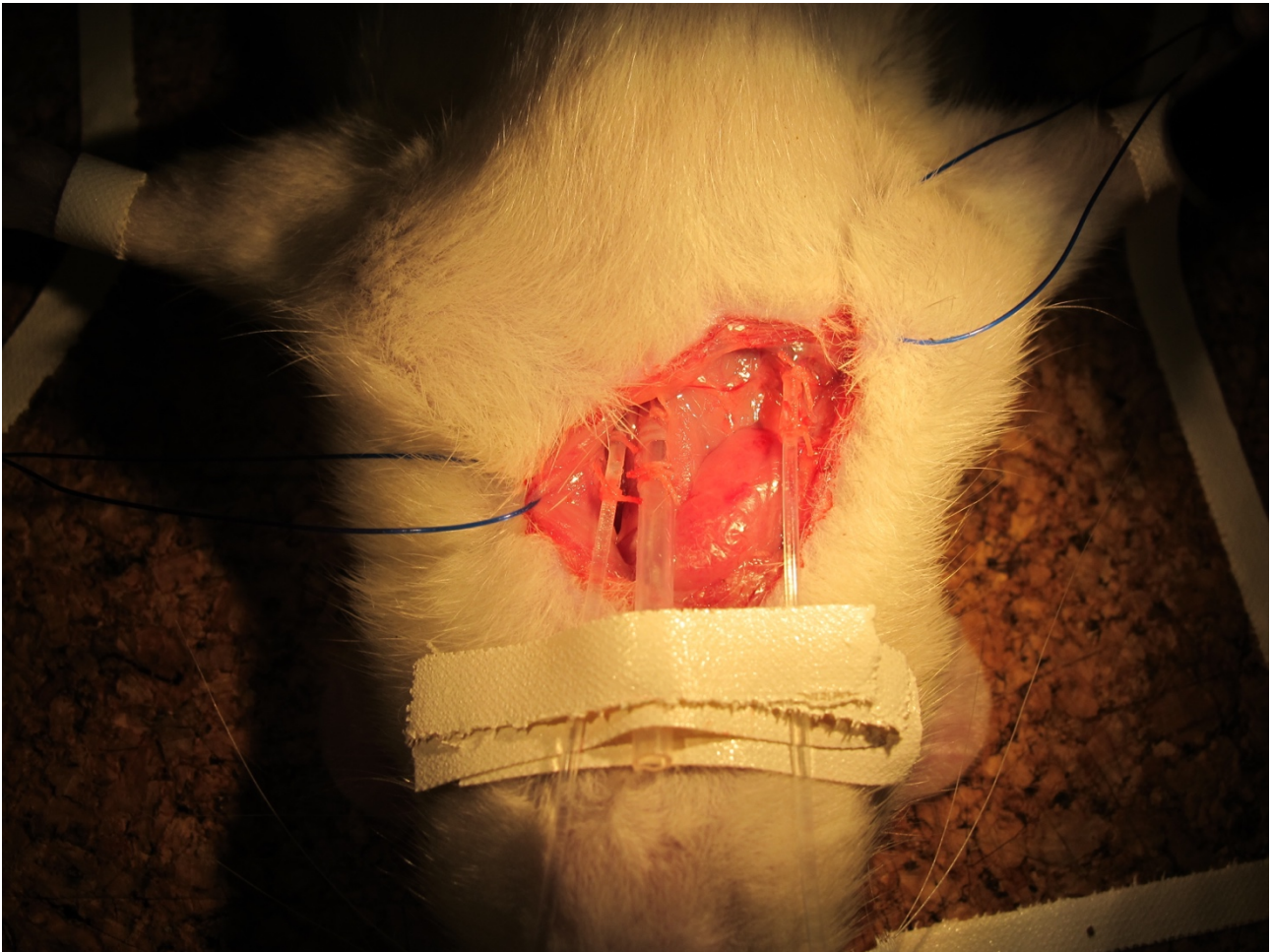


Abbildung 6: Darstellung des chirurgischen Eingriffs: Zentral zu sehen ist die tracheale Kanüle, rechts im Bild der Zugang zur rechten *Vena jugularis* sowie links im Bild die Kanülierung der *Arteria carotis*. Die Fixierung der Katheter in den Gefäßen und der *Trachea* erfolgte mittels Fäden, zur zusätzlichen Fixierung dienen Pflaster-Streifen (T. Mertke, Laboratorium der experimentellen Anästhesie, Uks Homburg, Saar)

### 3.5. Hämorrhagisches Schockmodell

Der hämorrhagische Schock erfolgte an einem, in unserem Labor bereits seit Jahrzehnten etablierten Modell. [64, 65] Druckgesteuert erfolgte die zügige Entnahme von Blut aus dem arteriellen Katheter. Der Zieldruck betrug  $35 \pm 5$  mm Quecksilbersäule (mmHg). Dieser wurde für eine Dauer von 90 Minuten durch wiederholte Blutentnahmen oder Gabe von isotoner Ringerlösung konstant gehalten. Das entnommene Blut wurde mit Hilfe von Citrat-Phosphat-Dextrose-Lösung antikoaguliert. Im Anschluss an den hämorrhagischen Schock erfolgte die Retransfusion von 60% des entnommenen Blutes innerhalb von fünf Minuten sowie die Reperfusion mit isotoner Elektrolytlösung (Sterofundin; B.Braun, Melsungen, Deutschland) in einer Dosierung von 200% des entnommenen Blutvolumens in der ersten Stunde nach Retransfusion und 100% des entnommenen

Blutvolumens in der zweiten Stunde nach Retransfusion. Zur weiteren Überprüfung des Schockzustandes wurden jeweils vor Schockinduktion, vor Retransfusion und nach Reperfusion Blutgasanalysen durchgeführt. Hierzu erfolgte die Entnahme von 0,2 ml Blut aus dem arteriellen Zugang. Das Blut wurde durch Zugabe von 0,05 ml Heparin-Natrium (B. Braun, Melsungen, Deutschland) entsprechend 250 I.E. Heparin antikoaguliert. Mittels Blutgasanalysegerät (Stat Profile pHox plus; Nova Biomedical, Rödermark, Deutschland) wurden jeweils die Hämoglobinkonzentration, der Base Excess sowie das Lactat bestimmt. Bei Tieren der Kontrollgruppen (Sham-Gruppen) erfolgte lediglich die Entnahme der Blutgasanalysen wie oben beschrieben. Sham-Tiere erhielten eine kontinuierliche Infusion mittels Ringerlösung in einer Dosierung von 10ml/kgKg.

Sham – Vehicle			IVM <u>or</u> PDR <sub>ICG</sub>
Sham – Resveratrol			IVM <u>or</u> PDR <sub>ICG</sub>
Sham – ICI			IVM <u>or</u> PDR <sub>ICG</sub>
Sham – Resveratrol + ICI			IVM <u>or</u> PDR <sub>ICG</sub>
Shock – Vehicle	MAP 35±5 mmHg (90 min)	reperfusion (120 min)	IVM <u>or</u> PDR <sub>ICG</sub>
Shock – Resveratrol	MAP 35±5 mmHg (90 min)	reperfusion (120 min)	IVM <u>or</u> PDR <sub>ICG</sub>
Shock – ICI	MAP 35±5 mmHg (90 min)	reperfusion (120 min)	IVM <u>or</u> PDR <sub>ICG</sub>
Shock – Resveratrol + ICI	MAP 35±5 mmHg (90 min)	reperfusion (120 min)	IVM <u>or</u> PDR <sub>ICG</sub>

Abbildung 7: schematischer Versuchsablauf

### 3.6. Versuchsprotokoll

Der Versuchsaufbau umfasste acht Gruppen von Versuchstieren. Tiere, welche den hämorrhagischen Schock durchliefen, und Sham-Tiere wurden jeweils mit Vehikellösung, Resveratrol, Resveratrol und ICI 182,780 oder ICI 182,780 als Einzelmedikation therapiert. Die Zuweisung zu den einzelnen Gruppen erfolgte zufällig. Im ersten Versuchsteil wurde im Anschluss an die Reperfusion mit Hilfe der Plasmaverschwinderate von Indocyaningrün (PDR<sub>ICG</sub>) (ICG-Pulsion; Pulsion Medical, München, Deutschland) die exkretorische Leberfunktion bestimmt. Die Gruppengröße dieses Versuchsteils betrug n=7 Tiere. Im zweiten Versuchsteil wurde mit Hilfe der

Intravitalmikroskopie die hepatische Mikrozirkulation, der Zellschaden sowie der Redoxstatus der Leber quantifiziert. Hierbei betrug die Gruppengröße n=5 Tiere.

### **3.7. Messung der Plasmaverschwinderate von Indocyaningrün**

Indocyaningrün (ICG) wurde mit einer Laufrate von 2,5 ml/h für 60 Minuten in der zweiten Stunde der Reperfusion verabreicht. Das Volumen der Infusion mit isotoner Ringerlösung wurde um die entsprechende Menge verringert. Die Gabe erfolgte kontinuierlich über eine Stunde mittels Spritzenpumpe (Perfusor segura FT; B. Braun, Melsungen, Deutschland), um einen stabilen Plasmaspiegel zu gewährleisten. Zur Verminderung des lichtinduzierten Zerfalls von ICG wurden Spritzen und Katheter mit Hilfe von Aluminiumfolie lichtdicht ummantelt. 15 Minuten vor Ende der Reperfusion wurde ein Bolus von 300 I.E. Heparin-Natrium verabreicht. Im Anschluss an die ICG Infusion erfolgte zu den Zeitpunkten 0, 2, 4, 6, 8, 10, 15 und 20 Minuten die Entnahme von jeweils 0,2 ml arteriellen Blutes. Dies wurde lichtgeschützt gelagert und direkt nach Abschluss der Entnahmen bei 5.000 g für 10 Minuten zentrifugiert. Die Messung der ICG Konzentration erfolgte spektrophotometrisch bei 800nm. Aus der gemessenen Absorption wurde die Plasmakonzentration und hieraus die Plasmaverschwinderate in Prozent pro Minute ( $\% \cdot \text{min}^{-1}$ ) berechnet.

### **3.8. Intravitalmikroskopie**

Die Intravitalmikroskopie wurde im Anschluss an den unter 3.5. genannten Versuchsaufbau durchgeführt. Zur Auslagerung der Leber wurde zunächst eine mediane Laparotomie durchgeführt. Nach Durchtrennung der hepatischen Bänder wurde das Tier in Linksseitenlage auf einem Objektträger aus Polymethylmethacrylat (Plexiglas®) gelagert, hierbei kam die Unterseite des linken Leberlappens auf dem Objektträger zu liegen. Die Leber wurde während dem gesamten Versuchsablauf mit angewärmter NaCl 0,9% Lösung gespült. Die Intravitalmikroskopie wurde mit einem Zeiss Axiotech Epifluoreszenz-Mikroskop durchgeführt (Axiotech Vario 135; Carl Zeiss Microimaging GmbH, Göttingen, Deutschland). Die Oberfläche der Leber wurde mit Hilfe einer 100 Watt Quecksilberlampe beleuchtet, die Analyse umfasste die Autofluoreszenzmessung von Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH) als Marker für den hepatozellulären Redox-Status, die Messung der hepatischen Mikrozirkulation mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Erythrozyten und die Messung der zellulären Integrität mit Hilfe von Propidiumiodid. Alle mikroskopischen Aufnahmen erfolgten mit Hilfe einer digitalen Videokamera (C 4742-; Mamamatsu Photonics, Hamamatsu City, Japan).

### **3.8.1. Autofluoreszenzmessung von Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH)**

Die Messung der NADPH-Autofluoreszenz erfolgte bei 50-facher Vergrößerung. Mit einem Anregungsfilter von 365 nm und einem Emissionsfilter von 420 nm wurden jeweils fünf Gesichtsfelder fotografiert. Die Auswertung erfolgte mittels Densitometrie bei standardisierten Kontrasteinstellungen, das Ergebnis ist als relativer Grauwert pro Leberazinus angegeben.

### **3.8.2. Messung der hepatischen Mikrozirkulation**

Zur Messung der hepatischen Mikrozirkulation wurden zunächst 0,1 mg/kg Körpergewicht Fluorescein-Natrium und direkt im Anschluss 0,3 ml Fluorescein-Isozyanat (FITC) markierte Erythrozyten (siehe 3.8.2.1.) intravenös verabreicht. Die Analyse der Leberoberfläche erfolgte bei 400-facher Vergrößerung mit einem 485 nm Anregungsfilter und einem 520 nm Emissionsfilter. Es wurden jeweils fünf Videosequenzen mit einer Dauer von je 10 Sekunden zur späteren Auswertung aufgenommen. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit Hilfe der Software SimplePCI (Version 5.3, Conpix Inc., Sewickley, Pa). Hierbei wurde die Anzahl perfundierter Sinusoide pro 200µm ( $S_p$ ), der sinusoidale Durchmesser ( $S_d$ ) und die Geschwindigkeit der Erythrozyten ( $V_{ery}$ ) bestimmt. Um die hepatische Perfusion ( $V_b$ ) abzuschätzen, erfolgte die Berechnung nach der Formel:

$$V_b = V_{ery} * \pi * (S_d/2)^2.$$

#### **3.8.2.1. Herstellung der Fluorescein-Isozyanat markierte Erythrozyten (FITC-Erythrozyten)**

5–6 ml Vollblut wurden in einer heparinisierten Spritze entnommen und direkt zentrifugiert. Im Anschluss wurde dreimal mit Alsevers Puffer gewaschen. Es folgte ein weiterer Waschgang mit Bicine Puffer und die Verdünnung, ebenfalls mit Bicine Puffer im Verhältnis 1:1. Dem so gewonnenen Erythrozytenkonzentrat wurden 4,0 mg/ml FITC beigemischt und die Lösung lichtgeschützt bei 25°C für 3 Stunden im Wasserbad inkubiert. Es folgte ein weiterer Waschgang mit Bicine Puffer sowie vier Waschgänge mit NaCl 0,9%. Die gewonnenen Erythrozyten wurden im Verhältnis 1:1 mit NaCl 0,9% verdünnt und der Lösung 0,14 ml Citrat-Phosphat-Dextrose-Puffer pro 1 ml Erythrozytenkonzentrat beigemischt. Die so gewonnenen Erythrozyten wurden lichtdicht im Kühlschrank gelagert und binnen einer Woche verbraucht.

### **3.8.3. Messung der hepatozellulären Integrität mittels Propidiumiodid**

Nach intravenöser Verabreichung von 0,5 mg/kg Körpergewicht Propidiumiodid (PI) folgte zunächst eine Inkubationszeit von 7 Minuten. Im Anschluss wurden bei 400-facher Vergrößerung fünf Gesichtsfelder fotografiert. Hierbei kamen ein 510–560 nm Anregungsfilter und ein 590 nm Emissionsfilter zum Einsatz. Die Auswertung erfolgte über die Zählung der PI-markierten Zellen als Marker für irreversiblen Zellschaden.

### **3.9. Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm Sigma Plot Version 12.0 (Systat Software GmbH, 40699 Erkrath, Deutschland). Die Darstellung erfolgt, soweit nicht anders angegeben, als Durchschnitt  $\pm$  Standardabweichung. Die Daten wurden mit Hilfe des Kolomogorov-Smirnov Tests auf Normalverteilung überprüft. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels Varianzanalyse (one-way ANOVA) und *post-hoc* Analyse mittels Student-Newman-Keuls Test. Ein p-Wert kleiner 0,05 wurde als signifikant erachtet.

## **4. Ergebnisse**

### **4.1. Hämodynamik**

Den Tieren der Schock-Gruppen wurden im Mittel  $43 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1}$  Blut entnommen (siehe Tabelle 1). Signifikante Unterschiede zwischen den Schock-Gruppen gab es hierbei nicht.

Durch die Blutentnahme fiel der arterielle Mitteldruck von seinem Ausgangswert von 100-120mmHg auf einen Mitteldruck von 30-40mmHg. Dieser Mitteldruck wurde für die gesamte Schockphase von 90 Minuten aufrechterhalten. In der Reperfusionphase kehrte der Mitteldruck auf sein Ausgangsniveau zurück (siehe Abbildung 8).

Die Herzfrequenz der Tiere sank in der Schockphase auf Werte um 350/min ab und kehrte in der Reperfusionphase auf seinen Ausgangswert von 450-500/min zurück (siehe Abbildung 9).

Die Tiere der Sham-Gruppen zeigten während des gesamten Versuchsablaufs stabile Vitalwerte.

Die Tiere der Schock-Gruppen zeigten einen signifikanten Abfall von Hämoglobin und Base Excess ( $p < 0,05$  zum Ausgangswert). Dies war nach Retranfusion in allen Gruppen reversibel ( $p < 0,05$  zum Ende der Untersuchung). Siehe hierzu auch Abbildung 10.

---

<b>Shed blood volume (mL kg<sup>-1</sup>)</b>			
Shock	Vehicle	42.62	±6.49
Shock	Res	43.43	±4.74
Shock	Res + ICI182,870	42.31	±2.78
Shock	ICI182,870	42.96	±4.54

---

Tabelle 1: Entnommenes Blutvolumen (Shed blood volume).

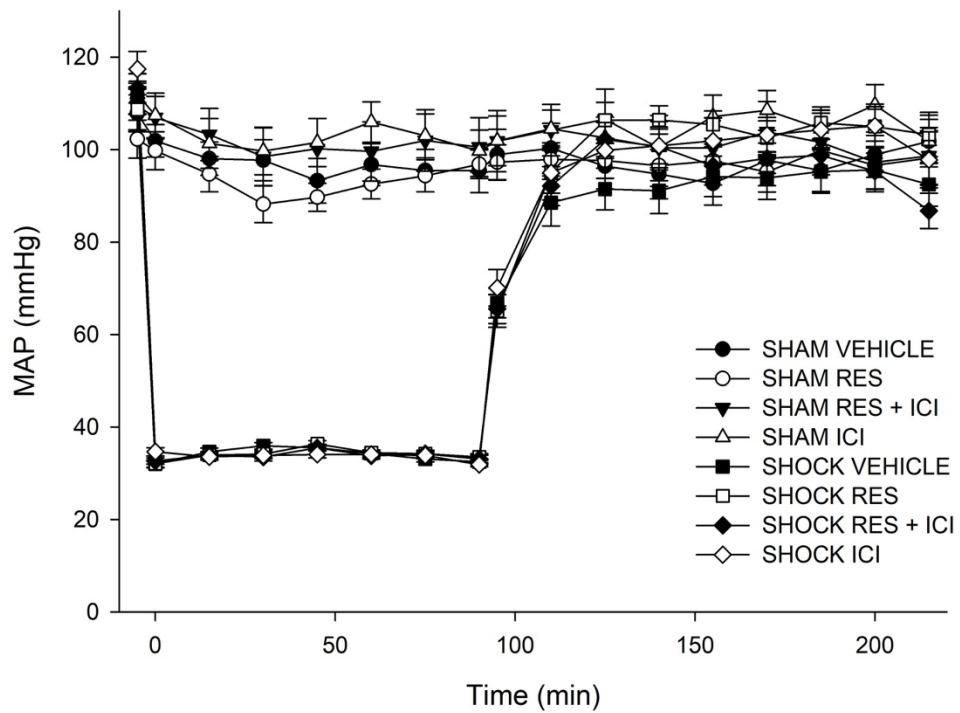


Abbildung 8: Verlauf des arteriellen Mitteldrucks.

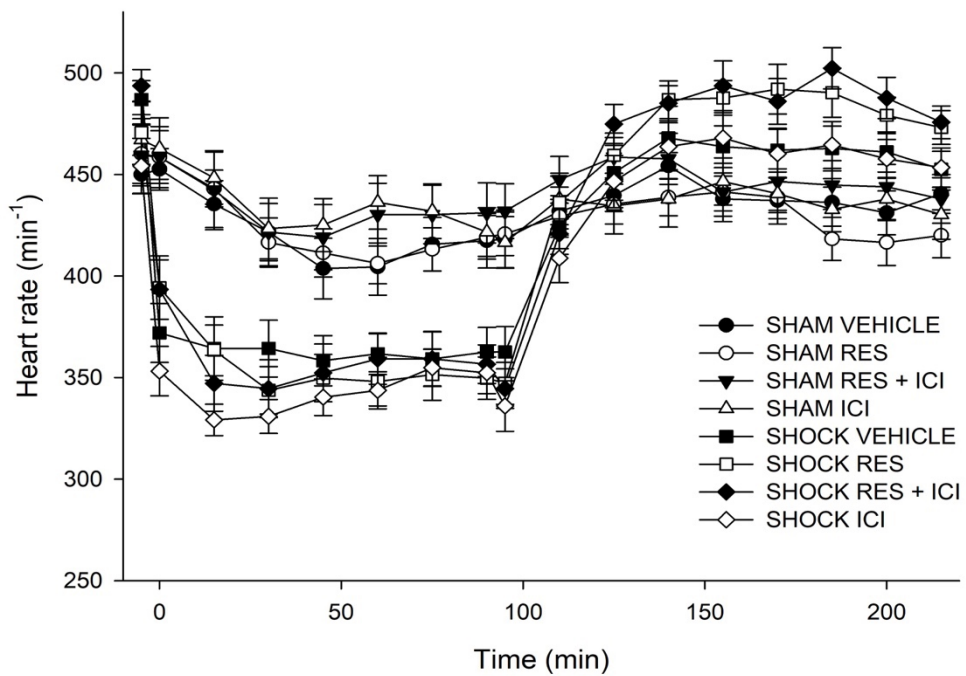


Abbildung 9: Verlauf der Herzfrequenz.

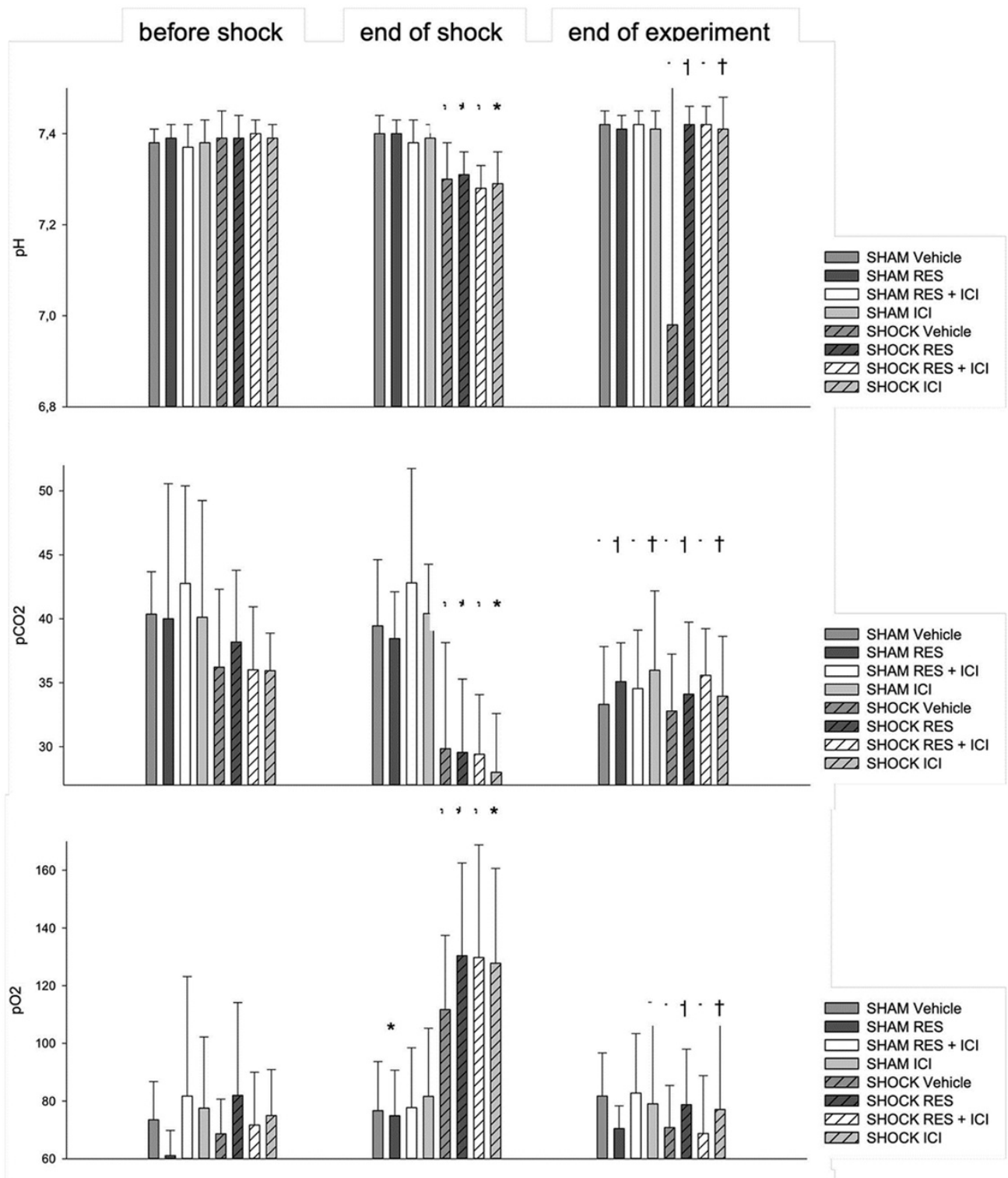


Abbildung 10: Werte der BGA's für pH, pCO<sub>2</sub> und pO<sub>2</sub>. \* = p < 0,05 vs Baseline, + = p < 0,05 gegenüber dem 90 Minuten Wert.

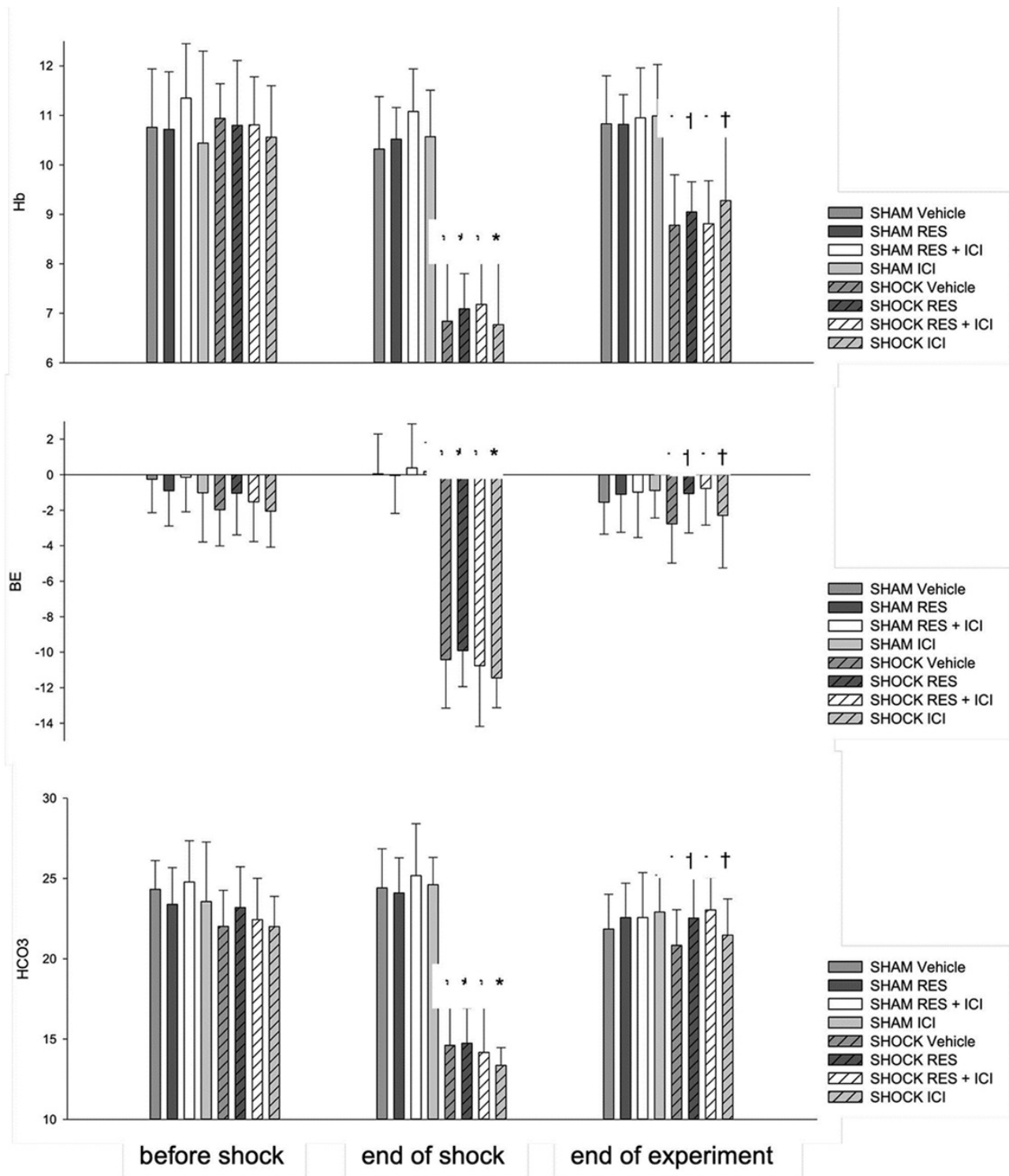


Abbildung 11: Werte der BGA's für Hb, Base Excess (BE) und HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>. \* = p < 0,05 vs Baseline, + = p < 0,05 gegenüber dem 90 Minuten Wert.

## 4.2. Plasmaverschwinderate von Indocyaningrün

Die Plasmaverschwinderate von Indocyaningrün ( $PDR_{ICG}$ ) innerhalb der scheinoperierten Tiere, den SHAM-Gruppen zeigte keine signifikanten Unterschiede.

Tiere, die einen hämorrhagischen Schock durchliefen, zeigten im Vergleich dazu eine signifikant geringere  $PDR_{ICG}$  (Gruppe Schock-Vehikel). Durch Gabe von Resveratrol kam es zu einer signifikant erhöhten  $PDR_{ICG}$ , verglichen mit den übrigen Schock-Gruppen. Die  $PDR_{ICG}$  kehrte auf ihr Ausgangsniveau zurück. Es waren keine signifikanten Unterschiede zu den scheinoperierten Tieren messbar (Gruppe Schock-Resveratrol). Dieser Effekt wurde aufgehoben durch die Zugabe des Östrogenrezeptor-Antagonisten ICI 182,780 (Gruppe Schock-Res + ICI).

Die Gabe von ICI 182,780 (Gruppe Schock-ICI) führte zu keiner relevanten Änderung der  $PDR_{ICG}$  verglichen mit den übrigen Schock-Gruppen (siehe Abbildung 12).

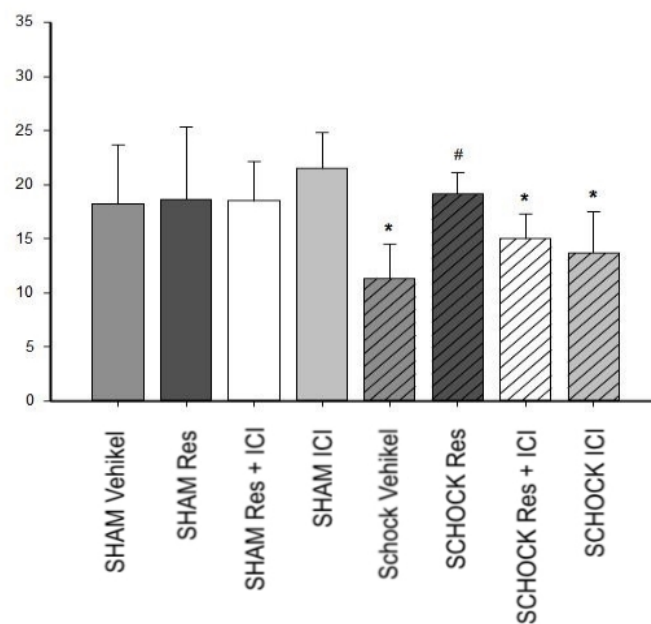


Abbildung 12: Plasmaverschwinderate von Indocyaningrün

\*  $p < 0,05$  vs. alle SHAM-Gruppen

#  $p < 0,05$  vs. Schock Vehikel, Schock RES + ICI, Schock ICI

### 4.3. Intravitalmikroskopie

#### 4.3.1. Autofluoreszenzmessung von Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH)

Bei den scheinoperierten Tieren zeigten sich keine Unterschiede in der NADPH-Autofluoreszenz. Ausnahme bildeten die Tiere, die eine Medikation mit Resveratrol und ICI 182,780 erhalten haben. Hier zeigte sich eine signifikant erhöhte Autofluoreszenz (siehe Abbildung 13 und Abbildung 14).

Bei den Tieren, die einen hämorrhagischen Schock durchliefen, zeigte sich eine signifikant erhöhte NADPH-Autofluoreszenz, verglichen mit den scheinoperierten Tieren. Dieser Effekt konnte durch Gabe von Resveratrol nicht beeinflusst werden. Auch die Kombination aus Resveratrol mit ICI 182,780 und ICI 182,780 hatten keinen signifikanten Einfluss auf die messbare Autofluoreszenz von NADPH.

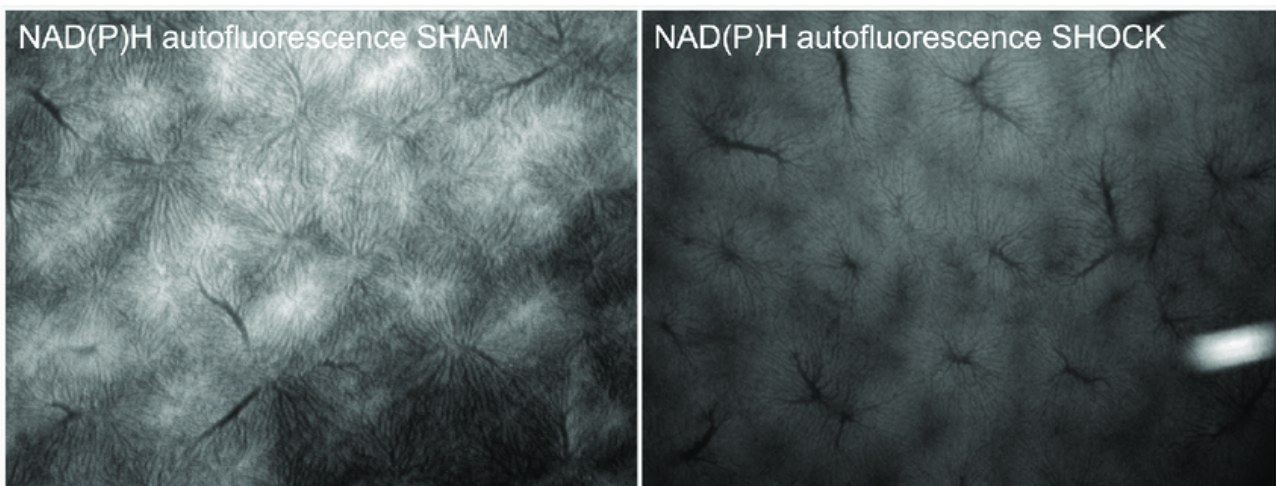


Abbildung 13: Darstellung der NAD(P)H-Autofluoreszenz, im Vergleich ein scheinoperiertes Tier (links) und ein Tier nach hämorrhagischem Schock (T. Mertke, Laboratorium der experimentellen Anästhesie, Uks Homburg, Saar)

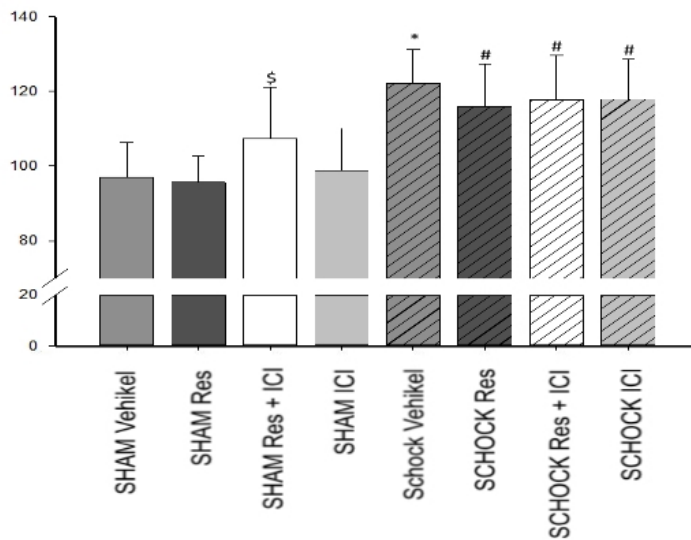


Abbildung 14: Messung der Autofluoreszenz von NADPH als Marker des zellulären Redox-Status:

\*  $p < 0,05$  vs. alle SHAM Gruppen

#  $p < 0,05$  vs. SHAM Vehikel, SHAM Res, SHAM ICI

\$  $p < 0,05$  vs. SHAM Res

#### 4.3.2. Messung der hepatischen Mikrozirkulation

Die hepatische Mikrozirkulation wurde mit Hilfe der Anzahl perfundierter Sinusoide, dem sinusoidalen Durchmesser und der erythrozytären Flussgeschwindigkeit evaluiert.

#### 4.3.2.1. Anzahl der perfundierten Sinusoide

Sowohl bei den scheinoperierten Tieren als auch bei den Tieren mit hämorrhagischem Schock konnten keine Unterschiede bei der Anzahl der perfundierten Sinusoide beobachtet werden. Auch die verabreichte Medikation hatte keinen Einfluss auf die Perfusion der Sinusoide (siehe Abbildung 15).

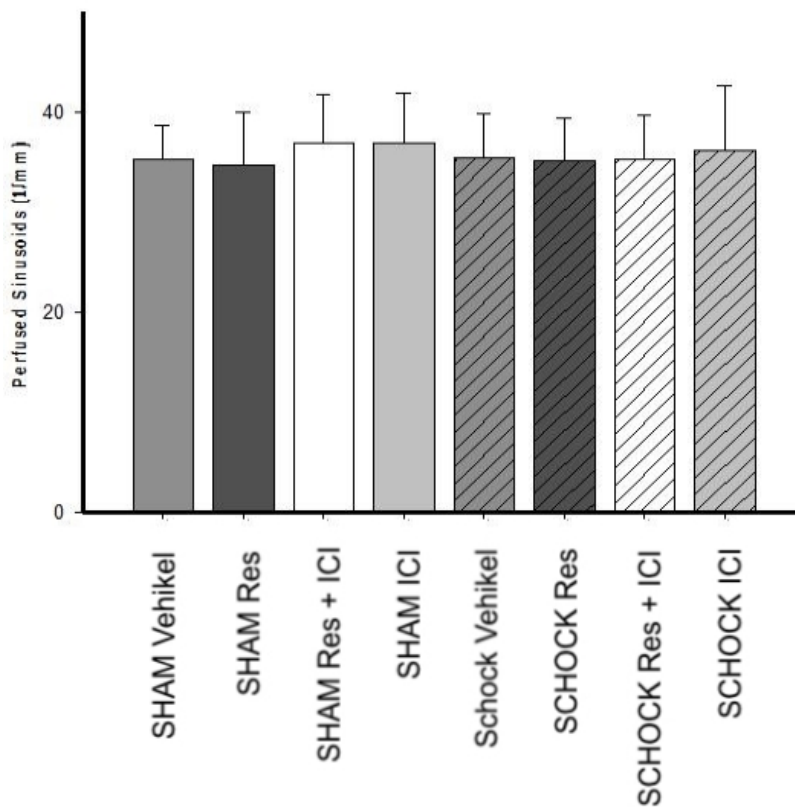


Abbildung 15: Anzahl der perfundierten Sinusoide pro Gesichtsfeld. Es sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen nachweisbar.

#### 4.3.2.2. Erythrozytäre Flussgeschwindigkeit

Die erythrozytäre Flussgeschwindigkeit in den Schock-Gruppen war tendenziell höher als bei den Tieren der Sham-Gruppen. Auch die Gabe der Medikation hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Flussgeschwindigkeit (Abbildung 16).

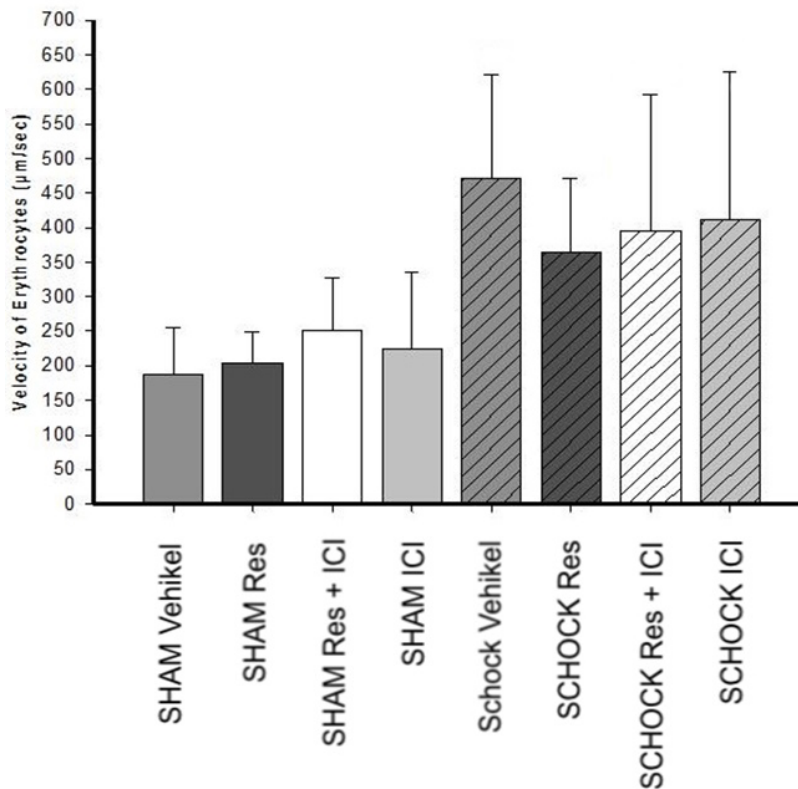


Abbildung 16: erythrozytäre Flussgeschwindigkeit: es zeigt sich eine Tendenz zu höheren Flussgeschwindigkeiten in den Schock-Gruppen ohne eine Signifikanz zu erreichen.

#### 4.3.2.3 Hepatischer Perfusionsindex

Auf die Berechnung des hepatischen Perfusionsindex wurde bei fehlenden Signifikanzen in den Basisdaten verzichtet.

### 4.3.3. Messung der hepatozellulären Integrität mittels Propidiumiodid

Propidiumiodid als Marker für frei liegende, doppelsträngige DNA ist ein Marker für terminal geschädigte Zellen. Hier war bei den scheinoperierten Untersuchungsgruppen kein signifikanter Leberzellschaden zu beobachten. Der hämorrhagische Schock führte zu einem signifikanten Anstieg terminal geschädigter Zellen. Durch die Gabe von Resveratrol konnte der Zellschaden signifikant reduziert werden. Die zusätzliche Gabe von ICI 182,780 konnte diese Wirkung teilweise aufheben. Trotzdem war auch hier noch signifikant weniger Zellschaden zu beobachten als bei Tieren, die eine Medikation mit Vehikel-Lösung erhalten haben. Der Zellschaden war bei Tieren, die nach hämorrhagischem Schock eine Medikation mit ICI 182,780 als alleinige Medikation erhielten, signifikant höher als bei allen anderen Tieren (Abbildung 17 und Abbildung 18).

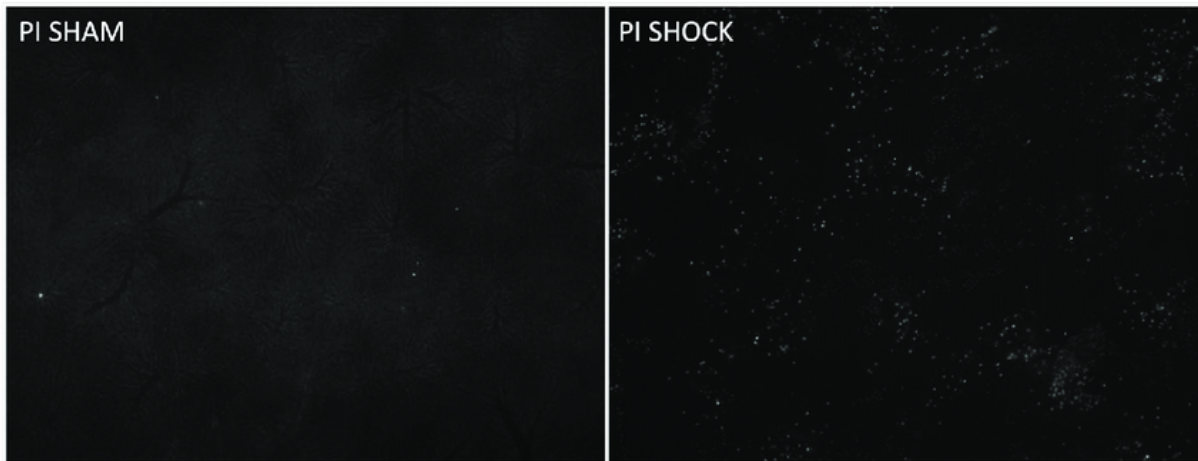


Abbildung 17: Beispiel für Propidiumiodid-markierte Zellen (T. Mertke, Laboratorium der experimentellen Anästhesie, Uks Homburg, Saar)

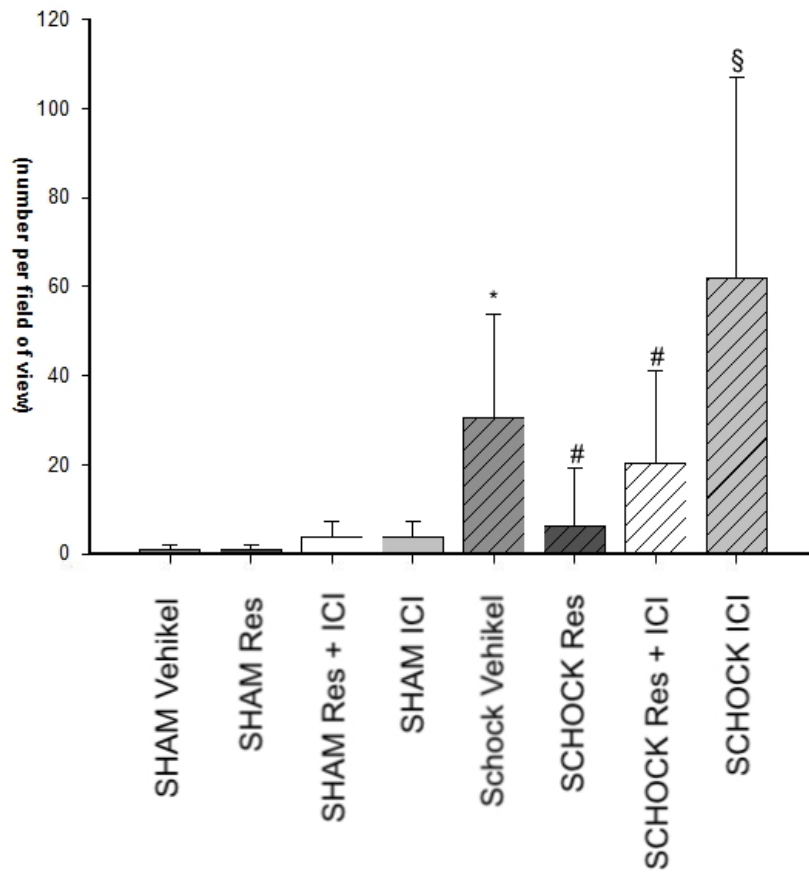


Abbildung 18: Anzahl Propidiumiodid markierter Zellen pro Gesichtsfeld

(\*  $p < 0,05$  vs. Alle Sham – Gruppen, #  $p < 0,05$  vs. SCHOCK – Vehikel,

§  $p < 0,05$  vs. alle anderen Gruppen)

## **5. Diskussion**

### **5.1. Zusammenfassung der Hauptergebnisse**

Die durchgeführte Studie untersucht die Auswirkungen von Resveratrol auf die exkretorische Leberfunktion sowie die Integrität der Leberzellen nach hämorrhagischem Schock *in vivo*. Weiterhin wurde der Redox-Status der Leber bestimmt. Im Rattenmodell wurden hierbei die Wirkung von Resveratrol im Vergleich zum Placebo gemessen. Um eine durch Östrogenrezeptoren vermittelte Wirkung zu evaluieren, wurde zusätzlich der unselektive Östrogenrezeptor Antagonist ICI 182,780 gegeben. Hierfür durchlief je eine Gruppe einen hämorrhagischen Schock, eine zweite Gruppe scheinoperierter Tiere diente als Kontrolle. Die Tiere wurden mit Vehikel-Lösung, Resveratrol, Resveratrol und ICI 182,780 oder ICI 182,780 behandelt.

Die exkretorische Leberfunktion wurde mittels  $PDR_{ICG}$  gemessen. Bei den Tieren der Schock-Vehikel Gruppe zeigte sich eine signifikante Verschlechterung der  $PDR_{ICG}$  verglichen mit den Gruppen, welche keinen Schock durchliefen. Durch die Medikation mit Resveratrol zeigte sich eine signifikante Verbesserung der  $PDR_{ICG}$  im Vergleich zu den Übrigen Schock-Gruppen. Sie war in dieser Gruppe nicht signifikant schlechter als in den Sham-Gruppen. Die positiven Effekte von Resveratrol auf die  $PDR_{ICG}$  konnten mittels des Östrogenrezeptor Antagonisten ICI 182,780 aufgehoben werden. In der Gruppe Schock-Resveratrol-ICI 182,780 gab es eine leichte Verbesserung im Vergleich zur Schock-Vehikel Gruppe, ohne dass hier ein Signifikanzniveau erreicht wurde.

Der Redox-Status der Leber wurde mit Hilfe der Autofluoreszenz von NADPH gemessen. Es zeigte sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Schockgruppen.

Zur Evaluation der hepatischen Mikrozirkulation wurden die Anzahl perfundierter Sinusoide evaluiert. Hier konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Tieren der Schock- und Shamgruppen festgestellt werden.

Auch bei der erythrozytären Flussgeschwindigkeit konnten keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden. Zwar zeigte sich eine erhöhte Flussgeschwindigkeit bei den Tieren der Schock-Gruppen. Innerhalb der Schock-Gruppen konnten die höchsten Flussgeschwindigkeiten bei den Tieren der Vehikel-Gruppe beobachtet werden, bei den Tieren der Resveratrol-Gruppe die geringsten. Auf eine Berechnung des hepatischen Perfusionsindex wurde aber auf Grund fehlender Signifikanzen in den Basisdaten verzichtet.

Als Marker für den hepatischen Zellschaden wurde Propidiumiodid eingesetzt. Bei den Tieren der Sham-Gruppen konnte kein signifikanter Zellschaden nachgewiesen werden. Bei den Tieren der

Gruppen Schock-Vehikel, Schock-Resveratrol und ICI 182,780 sowie der Gruppe Schock-ICI 182,780 konnte ein signifikant erhöhter Zellschaden nachgewiesen werden. Dieser Zellschaden konnte durch Gabe von Resveratrol reduziert werden. Es zeigte sich hier kein signifikant erhöhter Zellschaden im Vergleich zu den Sham-Gruppen. In den einzelnen Schock-Gruppen ist der Zellschaden am höchsten in der Gruppe Schock-ICI 182,780, gefolgt von der Gruppe Schock-Vehikel. In der Gruppe Schock-Resveratrol-ICI 182,780 wurde ein tendenziell geringerer Zellschaden, verglichen mit der Gruppe Schock-Vehikel, beobachtet. Diese Unterschiede erreichen jedoch nicht das Signifikanzniveau.

## **5.2. Diskussion der Methode**

Im Tierversuch werden drei Schockmodelle regelmäßig angewendet: das druckgesteuerte Schockmodell, das volumengesteuerte Schockmodell und das der unkontrollierten Blutung. Bei dem hier gewählten Modell handelt es sich um ein druckgesteuertes Modell nach Wiggers. [13, 101] Hierbei werden die Tiere unter Anästhesie katheterisiert, was eine direkte Kontrolle über Blutverlust und Blutdruck ermöglicht und so eine präzise Kontrolle des Schockzustandes erlaubt. Dies hat gegenüber den anderen Modellen den Vorteil, dass hier gut reproduzierbare und vergleichbare Daten erhoben werden. So kann ein gewählter Druckbereich zuverlässig für die gewählte Zeitdauer aufrecht gehalten werden. Die Reproduzierbarkeit ist ein Vorteil des Modells. Bei Modellen, die mit definierten Blutvolumen arbeiten, ist diese schwerer möglich, da sich beispielsweise der Quotient von Körpergewicht zu Blutvolumen in Abhängigkeit vom Körpergewicht der Tiere ändert. [34] Auch ein Modell der unkontrollierten Blutung lässt sich schwerer standardisieren, da Blutverlust und die Geschwindigkeit der Blutung nicht kontrolliert werden können. Gleichzeitig stellt das gewählte Modell physiologische Abläufe möglicherweise weniger genau dar, als es beispielsweise ein Modell der unkontrollierten Blutung vermag. Dennoch handelt es sich um ein weit verbreitetes Modell, zu welchem in unserer Arbeitsgruppe ein entsprechender Erfahrungsschatz vorhanden ist. Die zeitliche Abfolge konnte so gewählt werden, dass sie denen in der klinischen Realität nahekommt.

Als Versuchstier kamen männliche Sprague-Dawley-Ratten zum Einsatz. Die Wahl fiel auf männliche Tiere, um zyklusabhängige Einflüsse auf Östrogenrezeptoren auszuschließen. Ratten haben gegenüber Mäusen den Vorteil der leichteren operativen Präparation. Zusätzlich scheinen Ratten in immunologischen Reaktionen auf Blutungen dem Menschen zu ähneln. [44]

Erste mikroskopische Untersuchungen an lebenden Versuchstieren sind bereits vor fast 200 Jahren beschrieben worden. Bereits 1824 beobachtete Dutrochet das Verhalten von Leukozyten von Fröschen. [23] Der Begriff der intravitalen Fluoreszenz-Mikroskopie wurde 1929 und 1930 von Ellinger und Hirt geprägt. [24, 25] Sie machten sich hierbei die Beschreibungen von F. P. Fischer

zur Vitalfärbung des Auges zu Nutze. [28] Mit Hilfe der Fluoreszenz umgingen sie das Problem externer Lichtquellen, die durch Reflektion und Absorption im Gewebe nur sehr eingeschränkte Beobachtungen zuließen. Bereits 1953 veröffentlichten Irwin *et al.* erste intravitalmikroskopische Untersuchungen an der Leber von Mehrschweinchchen. [48] Seither hat sich die Intravitalmikroskopie in Kombination mit Fluoreszenzfarbstoffen zu einem wichtigen Werkzeug entwickelt, das einzigartige Einblicke in die Vorgänge lebender Organismen bietet.

Die beschriebene Prozedur der Intravitalmikroskopie stellt eine technisch anspruchsvolle Methode dar, die jedoch bei ihrer Beherrschung vergleichbare und reproduzierbare Ergebnisse liefert.

Mit Hilfe der Propidiumiodid-Anfärbung kann der Zellschaden anhand eines einfachen, klaren Markers bestimmt werden. Die Zählung terminal geschädigter Zellen pro Sichtfeld macht die Ergebnisse leicht nachvollziehbar und wenig fehleranfällig. Sie ermöglicht eine direkte, numerische Angabe des Zellschadens. Da die Zellmembran normalerweise für Propidiumiodid undurchlässig ist und nur bei toten und sterbenden Zellen durchlässig wird, können zuverlässig tote von lebenden Zellen differenziert werden.

Zur Messung des hepatischen Redox-Status wurde die Autofluoreszenz von NADPH gemessen. Die Messung der NADPH Autofluoreszenz stellt eine gut evaluierte Methode zur Beurteilung des zellulären Redox-Status dar. [6, 67] Die Belichtung mit dem Anregfilter wurde hierbei manuell gesteuert. Hierdurch können Fehler entstehen, da die jeweilige Reaktionszeit mit eingerechnet werden muss. Die Auswertung erfordert es, die Lebersinusoide manuell zu markieren. Auch hier können sich Ungenauigkeiten einschleichen. Da es sich hierbei, wenn überhaupt, um einen systematischen Fehler handelt, der über alle Gruppen gleichbleibend sein sollte, dürfte dies keinen Einfluss auf die Ergebnisse haben.

Ein weiterer Vorteil der Intravitalmikroskopie ist die Möglichkeit, dynamische Vorgänge wie die Perfusion der Sinusoide zu beobachten. Diese *in vivo* Messung ist so nur mittels Intravitalmikroskopie darstellbar. Gleichzeitig ist die Messung aber auch fehleranfällig. Strecken können unterschiedlich ausfallen, je nach dem, auf welcher Seite des Blutgefäßes die Strecke gemessen wird. Die Auflösung der Messung an sich ist begrenzt, da durch die Anzahl an aufgenommenen Bildern pro Sekunde eine Messungenauigkeit induziert wird. Dennoch sollten sich systematische Fehler ausgleichen, da die Auswertungen von derselben Person durchgeführt wurden. Auch wenn keine Unterschiede in der Perfusion messbar waren, wäre dieses Ergebnis mit anderen Untersuchungen so nicht darstellbar gewesen.

Die Untersuchungen dieser Studie wurden teilweise verblindet durchgeführt. Bei der Präparation der Tiere konnte keine Verblindung zwischen Schock- und Sham-Gruppen erzielt werden. Die Zugehörigkeit der Tiere zu den einzelnen Untergruppen und die daraus resultierende Medikation der Tiere wurde verblindet. So konnte eine Beeinflussung der Untersuchungsergebnisse durch den Präparator so weit wie möglich ausgeschlossen werden. Die Auswertung der

Untersuchungsergebnisse erfolgte ebenfalls verblindet. Die Zuordnung der Tiere zu den einzelnen Gruppen erfolgte erst bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

### **5.3. Diskussion der Ergebnisse**

Für Resveratrol sind bereits für mehrere Organe protektive Eigenschaften gezeigt worden. Auch die Leber wurde bereits in diesem Zusammenhang untersucht. [71, 81, 82] Wurden anfangs primär die antioxidativen Eigenschaften von Resveratrol für die Organ-protektiven Eigenschaften verantwortlich gemacht, [39] zeigt sich zunehmend die Wirkentfaltung über Östrogenrezeptoren. [109] Es konnte gezeigt werden, dass Resveratrol nicht nur antioxidative Wirkungen hat, sondern auch zu einer Sirtuin-vermittelten Reduktion der Inflammation [66] über die Regulation von beispielsweise TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1 (CINC-1) und CINC-2 führt. [109, 60] Auch eine Regulation von NOS, eine verbesserte NO-Bioverfügbarkeit und Reduktion von Superoxyd konnten gezeigt werden. [60] Die bisherigen Untersuchungen konzentrieren sich hierbei auf die Wirkung auf Krankheitsverläufe oder nach Ischämie und Reperfusion. Nur Wenige untersuchen die Wirkung nach hämorrhagischem Schock.

#### **5.3.1. PRD<sub>ICG</sub>**

Mit der ICG-Clearance (PRD<sub>ICG</sub>) wurde ein gut evaluierter Parameter zur Messung der exkretorischen Leberperfusion genutzt. Es zeigte sich eine signifikante Verbesserung der PRD<sub>ICG</sub> nach Gabe von Resveratrol gegenüber den anderen Schockgruppen. Die PRD<sub>ICG</sub> kehrte bei den Tieren der Resveratrol-Gruppe fast auf das Ausgangsniveau zurück. Aufgehoben wurde dieser Effekt durch die Zugabe von ICI 182,780.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass es sich bei der Wirkvermittlung von Resveratrol um einen Östrogenrezeptor vermittelten Signalweg handelt.

Für Resveratrol sind bereits verschiedene Östrogenrezeptor-vermittelte Wirkungen beschrieben, darunter immunmodulatorische Wirkungen, die Transkription von antioxidativen Genen und der Einfluss auf den zellulären Energiestoffwechsel. Diese Ergebnisse legen nahe, dass es sich hierbei um die für die Hepato-protektive Potenz von Resveratrol ausschlaggebende Wirkvermittlung handelt.

In ihren Untersuchungen konnten Yu *et al.* eine Östrogenrezeptor abhängige Organprotektion nachweisen. Hierbei konnten sie eine Reduktion von Entzündungsmediatoren bei Untersuchungen an der Rattenleber im hämorrhagischen Schock nachweisen. Dieser Effekt konnte durch die Gabe

von ICI 182,780 aufgehoben werden. [109] In einer weiteren Untersuchung zur endothelialen Dysfunktion an der Rattenaorta konnten sie nebenbefundlich eine deutliche Reduktion der Leberenzyme ASAT und ALAT nachweisen. [108]

Diese Ergebnisse ergänzen sich mit den hier erhobenen. Zusätzlich zeigt die Studie unserer Forschungsgruppe erstmalig eine Verbesserung der Leberfunktion *in vivo*.

Ein Nachteil der  $PRD_{ICG}$  besteht darin, dass die Plasmaverschwinderate abhängig von der hepatischen Perfusion ist. [42] So kann ein erhöhter hepatischer Blutfluss zu einer erhöhten  $PRD_{ICG}$  führen. Im Rahmen eines Schockgeschehens kann es zu signifikanten Änderungen in der hepatischen Mikrozirkulation kommen. [96] Da in unseren Versuchen keine signifikanten Unterschiede der Perfusion nachgewiesen werden konnten, ist davon auszugehen, dass dieser Effekt bei den vorliegenden Ergebnissen vernachlässigbar ist.

### **5.3.2. Propidiumiodid gefärbte Zellen**

Der Zellschaden wurde in unserer Studie durch Anfärbung mittels Propidiumiodid gemessen. Bei Propidiumiodid handelt es sich um einen Farbstoff, der sich an Doppelstrang-DNA anlagert. Bei intakter Zellmembran kann Propidiumiodid nicht in Zellen eindringen. Bei terminal geschädigten, also sterbenden oder toten Zellen wird die Membran für Propidiumiodid durchlässig und es kommt zu einer Anfärbung der entsprechenden Zellen. Hierbei spielt die Art des Zelltodes keine Rolle, es werden sowohl Zellen gefärbt, die in Rahmen der Apoptose absterben, als auch nekrotische Zellen. Propidiumiodid wird als Fluoreszenz-Farbstoff mit einer Wellenlänge von 400-600 nm angeregt und emittiert Licht mit einer Wellenlänge von 600-700 nm [19] Die Auswertung kann hierbei mittels Durchflusszytometrie erfolgen. [79] In dieser Studie erfolgte eine Auswertung mittels Zählung der geschädigten Zellen pro Gesichtsfeld. Hierdurch besteht möglicherweise ein Risiko für eine ungenaue Differenzierung der Zellen, so können eventuell zwei nahe beieinanderliegende Zellen als eine verstanden werden. Da es sich hierbei um einen systemischen Fehler handelt, der in allen Gruppen in ähnlicher Häufigkeit vorkommen sollte, ist davon auszugehen, dass der Einfluss auf die Ergebnisse vernachlässigbar ist.

In unseren Untersuchungen fanden wir einen signifikant höherer Zellschaden bei den Tieren der Schock-Vehikel-Gruppe. Eine deutliche Verringerung des Zellschadens konnte durch Resveratrol erzielt werden. Durch ICI 182,780 konnten die therapeutischen Effekte von Resveratrol aufgehoben werden.

Auch hier scheint die durch Östrogenrezeptoren vermittelte Wirkung von Resveratrol essenziell für die Organprotektion zu sein. Wie auch die Ergebnisse der  $PDR_{ICG}$  ergänzen sich die Ergebnisse mit

denen anderer Arbeitsgruppen, die eine Abhängigkeit der Wirkung von Östrogenrezeptoren zeigen konnten. [108, 109]

Die Ergebnisse aus den Untersuchungen zur  $PDR_{ICG}$  und der Quantifizierung des Zellschadens unterstreichen die Relevanz der Östrogenrezeptor vermittelten Wirkung für die Organ-protectiven Eigenschaften von Resveratrol. Dies passt auch zu den Untersuchungen von Buléon *et al.*, die zeigen konnten, dass eine Einzeldosis Östrogen das Überleben von Ratten im Schock verlängern konnten. [11]

Wang *et al.* konnten zeigen, dass Resveratrol die mitochondriale Funktion in der Niere nach hämorrhagischem Schock verbessert. [98] Sie postulieren hierfür eine Sirt-1 und PGC1- $\alpha$  vermittelte Erhöhung mitochondrialer Biogenese-Regulatoren. Zusätzlich wird über eine Steigerung der Aktivität von SOD2 und Catalase eine Reduktion des oxidativen Stresses diskutiert. Die Sirt-1 vermittelte Verbesserung der Mitochondrienfunktion durch Resveratrol konnte mit Hilfe von Sirt-1 Knockout Mäusen von Price *et al.* nachgewiesen werden. [76]

### **5.3.3. NADPH-Autofluoreszenz**

Zur Messung des Redox-Status der Leber wurde die NADPH gemessen. Es konnte eine signifikante Erhöhung der Autofluoreszenz in den Schock-Gruppen, verglichen mit den Sham-Gruppen, nachgewiesen werden. Eine signifikante Veränderung durch die Gabe von Resveratrol konnte nicht gezeigt werden. Zwar konnten leichte Unterschiede gemessen werden, diese reichten jedoch nicht aus, um das Signifikanzniveau zu erreichen.

Eine Erklärung hierfür kann sein, dass Resveratrol zwar ein Antioxidans ist, seine eigenen, antioxidativen Eigenschaften aber relativ schwach ausgeprägt sind. Leonard *et al.* haben die Reaktionsrate von Resveratrol mit  $\cdot OH$  auf  $9,45 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$  berechnet. Im Vergleich dazu fanden sie bei Ascorbinsäure eine Reaktionsrate von  $1,2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ . [57] Jia *et al.* konnten für die Superoxid-bindenden Eigenschaften von Resveratrol eine  $IC_{50}$  von  $458 \mu\text{M}$  bestimmen. Sie konnten ebenfalls zeigen, dass bei Konzentrationen von  $10\text{-}50 \mu\text{M}$  Resveratrol keine signifikanten radikalfangenden Eigenschaften bestehen. [49] So ist die antioxidative Wirkung von Resveratrol auf Grund der geringen Plasma- und Gewebekonzentrationen weniger auf die eigene, antioxidative Potenz zurückzuführen. [43] Vielmehr scheint die SIRT-1 vermittelte Verbesserung der mitochondrialen Funktion sowie verringerte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies der Grund für die antioxidative Wirkung von Resveratrol zu sein. [97 ,5]

Dennoch stellt sich die Frage, wieso in unserem Versuch kein Einfluss auf den Redoxstatus der Zellen nachgewiesen werden konnte. Tatsächlich zeigen die Ergebnisse einen Trend in Richtung verbessertem Redoxstatus, ohne hier Signifikanzen zu erreichen. Wenn man, wie oben

beschrieben, das relativ geringe antioxidative Potential von Resveratrol bedenkt, kann es durchaus sein, dass die gewählte Gruppengröße hier nicht gereicht hat, um Signifikanzen zu erzeugen.

Da in den anderen Untersuchungen der Studie signifikante Ergebnisse erzielt werden konnten, legt das Ergebnis nahe, dass die protektiven Eigenschaften von Resveratrol nur zu einem geringen Anteil auf seine antioxidativen Kapazitäten zurückzuführen sind. Die Beobachtung, dass die protektive Wirkung von Resveratrol regelmäßig durch die Gabe von ICI 182,780 aufgehoben werden konnte, unterstreicht diese Überlegung und stellt die durch Östrogenrezeptoren vermittelte Wirkung in den Vordergrund.

#### **5.3.4. Hepatische Mikrozirkulation**

Die hepatische Mikrozirkulation wurde mit Hilfe der Intravitalmikroskopie evaluiert. Es erfolgte die Zählung perfundierter Lebersinusoide; mit Hilfe FITS-angefärbter Erythrozyten wurde die Flussgeschwindigkeit bestimmt. Hierbei wurden keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl perfundierter Sinusoide gefunden. Zwar fanden sich tendenziell leicht erhöhte Flussgeschwindigkeiten in den Schock-Gruppen, Signifikanzen wurden aber auch hier nicht erreicht.

Im hämorrhagischen Schock kommt es zu einer Umverteilung des Blutflusses zu den akut lebenswichtigen Organen wie dem Gehirn. In diesem Rahmen kommt es zu einer Verringerung der hepatischen Perfusion.

Bereits in früheren Studien konnte gezeigt werden, dass die Anzahl perfundierter Lebersinusoide nach hämorrhagischem Schock nicht zwangsweise verändert ist. [64] Bei der erythrozytären Geschwindigkeit zeigte sich eine Tendenz zu erhöhten Flussgeschwindigkeiten. Dies widerspricht den Ergebnissen von Vollmar *et al.*, die eine signifikant verminderte Flussgeschwindigkeit nach hämorrhagischem Schock fanden. [96] Da Resveratrol die Bioverfügbarkeit von NOS und ähnlichen vasoaktiven Substanzen erhöht, [17] wäre eine Veränderung der Durchblutung durchaus im Rahmen des zu Erwartenden gewesen. Wang *et al.* konnten mit Hilfe von Polydatin, einem Glucosid von Resveratrol eine signifikante Verbesserung des mittleren, arteriellen Drucks erreichen. Dies führten sie auf eine verbesserte mitochondriale Funktion in glatten Muskelzellen zurück. [99] So kann es sein, dass auf Grund ähnlicher Effekte eine signifikante Veränderung der Mikroperfusion verhindert wird. Möglicherweise ist das Fehlen signifikanter Unterschiede in der Mikroperfusion auch Bestandteil der Organ-protektiven Wirkung von Resveratrol.

Gleichzeitig scheinen eventuelle Einflüsse auf die Durchblutung auch nicht zwingend für die Organ-protektive Wirkentfaltung von Resveratrol notwendig zu sein. Ayub *et al.* konnten zeigen, dass das Überleben von Ratten im hämorrhagischen Schock durch Resveratrol signifikant verlängert werden kann, auch ohne, dass eine Reperfusion erfolgt. [2] Es ist also anzunehmen, dass

Resveratrol auch bei eingeschränkter Blut- und damit Nährstoffversorgung einen Zell-protectiven Effekt hat.

Letztlich muss in den hier erhobenen Ergebnissen der Grund für die fehlenden Signifikanzen unbeantwortet bleiben. Eventuell hätte eine Berechnung des hepatischen Perfusionsindex Signifikanzen gezeigt. Bei fehlender Signifikanz in den zu Grunde liegenden Daten haben wir hierauf absichtlich verzichtet, um die Erzeugung künstlicher Signifikanzen zu verhindern.

### **5.3.5. Stärken und Grenzen der Studie**

Als Schwäche der Studie sticht das Fehlen von Signifikanzen bei der hepatischen Mikrozirkulation ins Auge. Zwar ist eine Veränderung perfundierter Sinusoide nach einem Schockereignis nicht zwingend, [64] Veränderungen der Perfusion wären dennoch zu erwarten gewesen. Resveratrol sorgt für eine erhöhte Bioverfügbarkeit von NOS, wodurch es zu einer Dilatation der Gefäße kommt. Somit sind Änderungen von Durchmesser und Perfusion wahrscheinlich. [106] Letztlich ist aus den gesammelten Daten nicht ersichtlich, weshalb es nicht zu signifikanten Veränderungen kam.

Auch wenn es sich bei der Intravitalmikroskopie der Rattenleber um eine technisch anspruchsvolle Prozedur handelt, besteht in der Arbeitsgruppe eine große Expertise mit der Materie. So hat die Vergangenheit gezeigt, dass die gewählte Gruppengröße normalerweise ausreichend ist, um signifikante Ergebnisse zu bekommen.

Gleichzeitig hat die Studie auch besondere Stärken:

Das gewählte Modell des druckgesteuerten, hämorrhagischen Schocks stellt realitätsnahe und vergleichbare Abläufe nach. Hierzu gehört auch die intravenöse Gabe der Medikation nach dem Ereignis. Bereits in der Vergangenheit konnten Studien Organ-protective Effekte von Resveratrol nachweisen. Hierbei wurde jedoch meist mit einer oralen Medikation oder Präkonditionierung gearbeitet. Auch Untersuchungen zu Ischämie und Reperfusion gibt es bereits, jedoch kaum Publikationen zum hämorrhagischen Schock.

Erstmals konnten wir anhand dynamischer Parameter *in vivo* die Hepato-protective Wirkung von Resveratrol zeigen. Mittels Intravitalmikroskopie konnten direkte Einblicke in die Folgen des hämorrhagischen Schocks für die Leber gewonnen werden. Mittels  $PDR_{ICG}$  wurde ein sensitiver Parameter für die Leberfunktion überprüft.

Vor allem aber konnten wir erstmals zeigen, dass die durch Östrogenrezeptoren vermittelte Wirkung von Resveratrol nicht nur Zell-protective Wirkungen vermittelt, sondern auch die Funktion der Leber verbessert.

## **5.6. Schlussfolgerung**

Unsere Studie konnte erstmals *in vivo* zeigen, dass die Therapie mit Resveratrol nach hämorrhagischem Schock sowohl die exkretorische Leberfunktion, gemessen mit Hilfe der  $PRD_{ICG}$ , verbessert, als auch den hepatozellulären Schaden, gemessen mit Hilfe einer Propidiumiodid-Färbung, reduziert. Diese Effekte konnten mit Hilfe des Östrogenrezeptor Antagonisten ICI 182,780 aufgehoben werden. Dies zeigt, dass die gemessenen Effekte zu einem signifikanten Teil über Östrogenrezeptoren vermittelt sind.

Unterschiede in der hepatischen Mikrozirkulation sowie im Redox-Status konnten nicht nachgewiesen werden. Eine Begründung dafür kann aus den erhobenen Daten nicht sicher abgeleitet werden und verbleibt Teil zukünftiger Forschung.

Das von uns untersuchte Versuchsmodell orientiert sich nahe an der notfallmedizinischen Realität, bestehend aus einem auslösenden Ereignis, einer präklinischen Phase sowie der klinischen Behandlungsphase. Auch die Auswahl der gemessenen Parameter orientiert sich an klinisch relevanten Parametern. Durch diese Auswahl konnten Ergebnisse produziert werden, die eine Übertragung auf die klinische Realität möglich erscheinen lassen. Zumindest öffnen sie die Tür für weitere Untersuchungen, die eines Tages in einer verbesserten Versorgung von hämorrhagischen Schockereignissen oder auch ähnlichen Ischämie / Reperfusionereignissen münden können.

Die Ergebnisse bestätigen die oben aufgestellte Hypothese, dass die Therapie mit Resveratrol zu einem reduzierten Leberschaden nach hämorrhagischem Schock führt. Dieses Ergebnis ergibt sich aus der *in vivo* Messung der Plasmaverschwinderate von ICG ( $PDG_{ICG}$ ), sowie aus der Intravitalmikroskopie der Leber.

## **6. Literaturverzeichnis**

1. Ahmadian, M., Abbott, M. J., Tang, T., Hudak, C. S., Kim, Y., Bruss, M., Hellerstein, M. K., Lee, H. Y., Samuel, V. T., Shulman, G. I., Wang, Y., Duncan, R. E., Kang, C., Sul, H. S. (2011) Desnutrin/ATGL is regulated by AMPK and is required for a brown adipose phenotype. *Cell metabolism* 13: 739-748.
2. Ayub, A., Poulouse, N., Raju, R. (2015) Resveratrol Improves Survival and Prolongs Life Following Hemorrhagic Shock. *Molecular medicine* 21: 305-312.
3. Bando, H., Atsumi, T., Nishio, T., Niwa, H., Mishima, S., Shimizu, C., Yoshioka, N., Bucala, R., Koike, T. (2005) Phosphorylation of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase/PFKFB3 family of glycolytic regulators in human cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 11: 5784-5792.
4. Bergeron, R., Ren, J. M., Cadman, K. S., Moore, I. K., Perret, P., Pypaert, M., Young, L. H., Semenkovich, C. F., Shulman, G. I. (2001) Chronic activation of AMP kinase results in NRF-1 activation and mitochondrial biogenesis. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 281: 1340-1346.
5. Biel, T. G., Lee, S., Flores-Toro, J. A., Dean, J. W., Go, K. L., Lee, M. H., Law, B. K., Law, M. E., Dunn, W. A., Jr, Zendejas, I., Behrns, K. E., Kim, J. S. (2016) Sirtuin 1 suppresses mitochondrial dysfunction of ischemic mouse livers in a mitofusin 2-dependent manner. *Cell death and differentiation* 23: 279-290.
6. Blacker, T. S., Duchon, M. R. (2016) Investigating mitochondrial redox state using NADH and NADPH autofluorescence. *Free radical biology & medicine* 100: 53-65.
7. Borrás, C., Gambini, J., Gómez-Cabrera, M. C., Sastre, J., Pallardó, F. V., Mann, G. E., Viña, J. (2005) 17beta-oestradiol up-regulates longevity-related, antioxidant enzyme expression via the ERK1 and ERK2[MAPK]/NFkappaB cascade. *Aging cell* 4: 113-118.
8. Bowers, J. L., Tyulmenkov, V. V., Jernigan, S. C., Klinge, C. M. (2000) Resveratrol acts as a mixed agonist/antagonist for estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 141: 3657-3667.
9. Breuss, J. M., Atanasov, A. G., Uhrin, P. (2019) Resveratrol and Its Effects on the Vascular System. *International journal of molecular sciences* 20: 1523.

10. Bujak, A. L., Crane, J. D., Lally, J. S., Ford, R. J., Kang, S. J., Rebalka, I. A., Green, A. E., Kemp, B. E., Hawke, T. J., Schertzer, J. D., Steinberg, G. R. (2015) AMPK activation of muscle autophagy prevents fasting-induced hypoglycemia and myopathy during aging. *Cell metabolism* 21: 883-890.
11. Buléon, M., Cuny, M., Grellier, J., Charles, P. Y., Belliere, J., Casemayou, A., Arnal, J. F., Schanstra, J. P., Tack, I. (2020) A single dose of estrogen during hemorrhagic shock protects against Kidney Injury whereas estrogen restoration in ovariectomized mice is ineffective. *Scientific reports* 10: 17240.
12. Cao, W., Carney, J. M., Duchon, A., Floyd, R. A., Chevion, M. (1988) Oxygen free radical involvement in ischemia and reperfusion injury to brain. *Neuroscience letters*, 88: 233-238.
13. Carl J. Wiggers (1942), The present status of the shock problem. *Physiological Reviews* 22: 74-123.
14. Carling, D., Zammit, V. A., Hardie, D. G. (1987) A common bicyclic protein kinase cascade inactivates the regulatory enzymes of fatty acid and cholesterol biosynthesis. *FEBS letters* 223: 217-222.
15. Catalgol, B., Batirel, S., Taga, Y., Ozer, N. K. (2012) Resveratrol: French paradox revisited. *Frontiers in pharmacology* 3: 141.
16. Cecconi, M., De Backer, D., Antonelli, M., Beale, R., Bakker, J., Hofer, C., Jaeschke, R., Mebazaa, A., Pinsky, M. R., Teboul, J. L., Vincent, J. L., Rhodes, A. (2014) Consensus on circulatory shock and hemodynamic monitoring. Task force of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive care medicine*, 40: 1795-1815
17. Chander, V., Chopra, K. (2006) Protective effect of nitric oxide pathway in resveratrol renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Archives of medical research* 37: 19-26.
18. Cowled, P., Fitridge, R. (2011). Pathophysiology of Reperfusion Injury. In R. Fitridge (Eds.) et. al., *Mechanisms of Vascular Disease: A Reference Book for Vascular Specialists*. University of Adelaide Press.
19. Crowley, L. C., Scott, A. P., Marfell, B. J., Boughaba, J. A., Chojnowski, G., Waterhouse, N. J. (2016) *Measuring Cell Death by Propidium Iodide Uptake and Flow Cytometry*. Cold Spring Harbor protocols, 2016
20. Deng, Z.Y.; Hu, M.M.; Xin, Y.F.; Gang, C. Resveratrol alleviates vascular inflammatory injury by inhibiting inflammasome activation in rats with hypercholesterolemia and vitamin D2 treatment. *Inflammation Research* 64: 321-332

21. Dernek, S., Ikizler, M., Erkasap, N., Ergun, B., Koken, T., Yilmaz, K., Sevin, B., Kaygisiz, Z., Kural, T. (2004) Cardioprotection with resveratrol pretreatment: improved beneficial effects over standard treatment in rat hearts after global ischemia. *Scandinavian cardiovascular journal* 38: 245-254
22. Drolz, A., Horvatits, T., Roedl, K., Fuhrmann, V. (2014) Schockleber und Cholestase beim kritisch Kranken [Shock liver and cholestatic liver in critically ill patients]. *Medizinische Klinik, Intensivmedizin und Notfallmedizin*, 109: 228-234
23. Du Trochet, Henri. Recherches anatomiques et physiologiques sur la structure intime des animaux et des végétaux, et sur leur motilité. J. B. Baillière, 1824,
24. Ellinger P, Hirt A. (1929) Mikroskopische Untersuchungen an lebenden Organen I. Mitteilung. Methodik: Intravitalmikroskopie. *Zeitschrift für Anatomie und Entwicklungsgeschichte* 90: 791-802.
25. Ellinger P, Hirt A. (1930) *Handbuch der Biologischen Arbeitsmethoden*. Urban and Schwarzenberg; Berlin and Vienna.
26. Eltzschig, H. K., Eckle, T. (2011) Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. *Nature medicine* 17: 1391-1401.
27. Ferrero, M. E., Bertelli, A. E., Fulgenzi, A., Pellegatta, F., Corsi, M. M., Bonfrate, M., Ferrara, F., De Caterina, R., Giovannini, L., Bertelli, A. (1998) Activity in vitro of resveratrol on granulocyte and monocyte adhesion to endothelium. *The American journal of clinical nutrition*, 68: 1208-1214.
28. Fischer, F. P. (1929) Über die Permeabilität der Hornhaut und über Vitalfärbung des vorderen Bulbusabschnitts mit Bemerkung über die Vitalfärbung des Plexus choroideus. *Archiv für Augenheilkunde* 100/101: 480.
29. Frink, M., Pape, H. C., van Griensven, M., Krettek, C., Chaudry, I. H., & Hildebrand, F. (2007). Influence of sex and age on mods and cytokines after multiple injuries. *Shock* 27: 151-156.
30. Fu, S.; Lv, R.; Wang, L.; Hou, H.; Liu, H.; Shao, S. (2018) Resveratrol, an antioxidant, protects spinal cord injury in rats by suppressing MAPK pathway. *Saudi Journal of Biological Science* 25: 259-266.
31. Fuggetta, M. P., Bordignon, V., Cottarelli, A., Macchi, B., Frezza, C., Cordiali-Fei, P., Ensoli, F., Ciafrè, S., Marino-Merlo, F., Mastino, A., Ravagnan, G. (2016). Downregulation of proinflammatory cytokines in HTLV-1-infected T cells by Resveratrol. *Journal of experimental & clinical cancer research* 35: 118.

32. Fuhrmann, V., Jäger, B., Zubkova, A., Drolz, A. (2010). Hypoxic hepatitis - epidemiology, pathophysiology and clinical management. *Wiener klinische Wochenschrift* 122: 129-139.
33. Fuhrmann, V., Madl, C., Mueller, C., Holzinger, U., Kitzberger, R., Funk, G. C., Schenk, P. (2006). Hepatopulmonary syndrome in patients with hypoxic hepatitis. *Gastroenterology* 131: 69-75.
34. Gainer, J. L., Lipa, M. J., Ficenec, M. C. (1995) Hemorrhagic shock in rats. *Laboratory animal science* 45: 169-172.
35. Gambini, J., Inglés, M., Olaso, G., Lopez-Grueso, R., Bonet-Costa, V., Gimeno-Mallench, L., Mas-Bargues, C., Abdelaziz, K. M., Gomez-Cabrera, M. C., Vina, J., Borrás, C. (2015) Properties of Resveratrol: In Vitro and In Vivo Studies about Metabolism, Bioavailability, and Biological Effects in Animal Models and Humans. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2015: 837042.
36. Gao, X., Xu, Y. X., Janakiraman, N., Chapman, R. A., Gautam, S. C. (2001) Immunomodulatory activity of resveratrol: suppression of lymphocyte proliferation, development of cell-mediated cytotoxicity, and cytokine production. *Biochemical pharmacology* 62: 1299-1308.
37. Gatson, J. W., Liu, M. M., Abdelfattah, K., Wigginton, J. G., Smith, S., Wolf, S., Minei, J. P. (2013) Resveratrol decreases inflammation in the brain of mice with mild traumatic brain injury. *The journal of trauma and acute care surgery* 74: 470-475.
38. Gehm, B. D., McAndrews, J. M., Chien, P. Y., Jameson, J. L. (1997) Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 14138-14143.
39. Gedik, E., Girgin, S., Ozturk, H., Obay, B. D., Ozturk, H., Buyukbayram, H. (2008) Resveratrol attenuates oxidative stress and histological alterations induced by liver ischemia/reperfusion in rats. *World journal of gastroenterology* 14: 7101-7106.
40. Giovannini, L., Migliori, M., Longoni, B. M., Das, D. K., Bertelli, A. A., Panichi, V., Filippi, C., Bertelli, A. (2001) Resveratrol, a polyphenol found in wine, reduces ischemia reperfusion injury in rat kidneys. *Journal of cardiovascular pharmacology* 37: 262-270.
41. Gomes, B. A. Q., Silva, J. P. B., Romeiro, C. F. R., Dos Santos, S. M., Rodrigues, C. A., Gonçalves, P. R., Sakai, J. T., Mendes, P. F. S., Varela, E. L. P., Monteiro, M. C. (2018)

Neuroprotective Mechanisms of Resveratrol in Alzheimer's Disease: Role of SIRT1. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2018: 8152373.

42. Halle, B. M., Poulsen, T. D., Pedersen, H. P. (2014) Indocyanine green plasma disappearance rate as dynamic liver function test in critically ill patients. *Acta anaesthesiologica Scandinavica* 58: 1214-1219.
43. Halliwell B. (2007) Dietary polyphenols: good, bad, or indifferent for your health?. *Cardiovascular research* 73: 341-347.
44. Hauser C. J. (2005) Preclinical models of traumatic, hemorrhagic shock. *Shock* 24 Suppl 1: 24-32.
45. Horvatits, T., Trauner, M., Fuhrmann, V. (2013) Hypoxic liver injury and cholestasis in critically ill patients. *Current opinion in critical care* 19: 128-132.
46. Huang, T.; Chen, C.; Liu, H.; Lee, T.; Shieh, S. (2017) Resveratrol pretreatment attenuates concanavalin A-induced hepatitis through reverse of aberration in the immune response and regenerative capacity in aged mice. *Scientific Reports* 7: 2705.
47. Inglés, M., Gambini, J., Miguel, M. G., Bonet-Costa, V., Abdelaziz, K. M., El Alami, M., Viña, J., Borrás, C. (2014). PTEN mediates the antioxidant effect of resveratrol at nutritionally relevant concentrations. *BioMed research international* 2015: 580852.
48. Irwin JW, MacDonald J, 3rd (1953). Microscopic observations of the intrahepatic circulation of living guinea pigs. *The Anatomical record* 117: 1-15.
49. Jia, Z., Zhu, H., Misra, B. R., Mahaney, J. E., Li, Y., Misra, H. P. (2008) EPR studies on the superoxide-scavenging capacity of the nutraceutical resveratrol. *Molecular and cellular biochemistry*, 313: 187-194.
50. Jian, B., Yang, S., Chaudry, I. H., Raju, R. (2012) Resveratrol improves cardiac contractility following trauma-hemorrhage by modulating Sirt1. *Molecular medicine* 18: 209-214.
51. Jornayvaz, F. R., Shulman, G. I. (2010) Regulation of mitochondrial biogenesis. *Essays in biochemistry* 47: 69-84.
52. Kan, Z., Madoff, D. C. (2008) Liver anatomy: microcirculation of the liver. *Seminars in interventional radiology* 25: 77-85.

53. Karalis, F., Soubasi, V., Georgiou, T., Nakas, C. T., Simeonidou, C., Guiba-Tziampiri, O., Spandou, E. (2011) Resveratrol ameliorates hypoxia/ischemia-induced behavioral deficits and brain injury in the neonatal rat brain. *Brain research* 1425: 98-110.
54. Kim, J. H., Park, J. M., Yea, K., Kim, H. W., Suh, P. G., Ryu, S. H. (2010) Phospholipase D1 mediates AMP-activated protein kinase signaling for glucose uptake. *PloS one*, 5: e9600.
55. Ko, J. H., Sethi, G., Um, J. Y., Shanmugam, M. K., Arfuso, F., Kumar, A. P., Bishayee, A., Ahn, K. S. (2017) The Role of Resveratrol in Cancer Therapy. *International journal of molecular sciences* 18: 2589.
56. Kong, F., Zhang, R., Zhao, X., Zheng, G., Wang, Z., Wang, P. (2017) Resveratrol raises *in vitro* anticancer effects of paclitaxel in NSCLC cell line A549 through COX-2 expression. *The Korean journal of physiology & pharmacology : official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology* 21: 465-474.
57. Leonard, S. S., Xia, C., Jiang, B. H., Stinefelt, B., Klandorf, H., Harris, G. K., Shi, X. (2003) Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses. *Biochemical and biophysical research communications* 309: 1017-1026.
58. Li S., Zlia G., Chen L., Ding Y., Lian J., Hong G., Lu Z. (2016) Resveratrol protects mice from paraquat-induced lung injury: The important role of SIRT1 and NRF2 antioxidant pathways. *Molecular Medicine Reports* 13:1833-1838.
59. Lin, C., Crawford, D. R., Lin, S., Hwang, J., Sebuyira, A., Meng, R., Westfall, J. E., Tang, H. Y., Lin, S., Yu, P. Y., Davis, P. J., Lin, H. Y. (2011) Inducible COX-2-dependent apoptosis in human ovarian cancer cells. *Carcinogenesis*, 32: 19-26.
60. Liu, F. C., Tsai, H. I., Yu, H. P. (2015) Organ-Protective Effects of Red Wine Extract, Resveratrol, in Oxidative Stress-Mediated Reperfusion Injury. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2015: 568634.
61. Ma, C., Wang, Y., Dong, L., Li, M., Cai, W. (2015) Anti-inflammatory effect of resveratrol through the suppression of NF- $\kappa$ B and JAK/STAT signaling pathways. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 47: 207-213.
62. Manna SK, Mukhopadhyay A, Aggarwal BB. (2000) Resveratrol suppresses TNF-induced activation of nuclear transcription factors NF-kappa B, activator protein-1, and apoptosis: potential role of reactive oxygen intermediates and lipid peroxidation. *Journal of Immunology* 164: 6509-19.

63. Marsin, A. S., Bertrand, L., Rider, M. H., Deprez, J., Beauloye, C., Vincent, M. F., Van den Berghe, G., Carling, D., Hue, L. (2000) Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia. *Current biology* 10: 1247-1255.
64. Mathes, A. M., Kubulus, D., Pradarutti, S., Bentley, A., Weiler, J., Wolf, B., Ziegeler, S., Bauer, I., Rensing, H. (2008) Melatonin pretreatment improves liver function and hepatic perfusion after hemorrhagic shock. *Shock* 29: 112-118.
65. Mathes, A. M., Kubulus, D., Weiler, J., Bentley, A., Waibel, L., Wolf, B., Bauer, I., Rensing, H. (2008) Melatonin receptors mediate improvements of liver function but not of hepatic perfusion and integrity after hemorrhagic shock in rats. *Critical care medicine*, 36: 24-29.
66. Maugeri, A., Barchitta, M., Mazzone, M. G., Giuliano, F., Basile, G., Agodi, A. (2018) Resveratrol Modulates SIRT1 and DNMT Functions and Restores LINE-1 Methylation Levels in ARPE-19 Cells under Oxidative Stress and Inflammation. *International journal of molecular sciences* 19: 2118.
67. Mayevsky, A., Rogatsky, G. G. (2007) Mitochondrial function in vivo evaluated by NADH fluorescence: from animal models to human studies. *American journal of Physiology - Cell physiology* 292: 615-640.
68. Mihaylova, M. M., Vasquez, D. S., Ravnskjaer, K., Denechaud, P. D., Yu, R. T., Alvarez, J. G., Downes, M., Evans, R. M., Montminy, M., Shaw, R. J. (2011) Class IIa histone deacetylases are hormone-activated regulators of FOXO and mammalian glucose homeostasis. *Cell* 145: 607-621.
69. Movahed A, Yu L, Thandapilly SJ, Louis XL, Netticadan T. (2012) Resveratrol protects adult cardiomyocytes against oxidative stress mediated cell injury. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 527: 74-80.
70. Munday, M. R., Campbell, D. G., Carling, D., Hardie, D. G. (1988) Identification by amino acid sequencing of three major regulatory phosphorylation sites on rat acetyl-CoA carboxylase. *European journal of biochemistry* 175: 331-338.
71. Nah, H. Y., Lee, W. S., Joo, Y. E., Kim, H. S., Choi, S. K., Rew, J. S., Kim, S. J., Jung, Y. D., Ahn, B. W., Park, J. S., Shin, B. A. (2005) Resveratrol Protects HepG2 and Chang Liver Cells from Oxidative Stress. *Chonnam Medical Journal* 41: 243-252.
72. Pezzuto J. M. (2019) Resveratrol: Twenty Years of Growth, Development and Controversy. *Biomolecules & Therapeutics* 27: 1-14.

73. Pezzuto J. M. (2011) The phenomenon of resveratrol: redefining the virtues of promiscuity. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1215: 123-130.
74. Pineda-Ramírez, N., Alquisiras-Burgos, I., Ortiz-Plata, A., Ruiz-Tachiquín, M. E., Espinoza-Rojo, M., Aguilera, P. (2020) Resveratrol Activates Neuronal Autophagy Through AMPK in the Ischemic Brain. *Molecular neurobiology* 57: 1055-1069.
75. Plow, E. F., Haas, T. A., Zhang, L., Loftus, J., Smith, J. W. (2000) Ligand binding to integrins. *The Journal of biological chemistry* 275: 21785-21788.
76. Price, N. L., Gomes, A. P., Ling, A. J., Duarte, F. V., Martin-Montalvo, A., North, B. J., Agarwal, B., Ye, L., Ramadori, G., Teodoro, J. S., Hubbard, B. P., Varela, A. T., Davis, J. G., Varamini, B., Hafner, A., Moaddel, R., Rolo, A. P., Coppari, R., Palmeira, C. M., de Cabo, R., Sinclair, D. A. (2012) SIRT1 is required for AMPK activation and the beneficial effects of resveratrol on mitochondrial function. *Cell metabolism* 15: 675-690.
77. Rauf, A., Imran, M., Butt, M. S., Nadeem, M., Peters, D. G., Mubarak, M. S. (2018) Resveratrol as an anti-cancer agent: A review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 58: 1428-1447.
78. Ren, J., Fan, C., Chen, N., Huang, J., Yang, Q. (2011) Resveratrol pretreatment attenuates cerebral ischemic injury by upregulating expression of transcription factor Nrf2 and HO-1 in rats. *Neurochemical research* 36: 2352-2362.
79. Riccardi, C., Nicoletti, I. (2006) Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nature protocols*, 1: 1458-1461.
80. Roy SK, Chen Q, Fu J, Shankar S, Srivastava RK. (2011) Resveratrol inhibits growth of orthotopic pancreatic tumors through activation of FOXO transcription factors. *PLoS One* 6: e25166
81. Rubiolo, J. A., Mithieux, G., Vega, F. V. (2008) Resveratrol protects primary rat hepatocytes against oxidative stress damage: activation of the Nrf2 transcription factor and augmented activities of antioxidant enzymes. *European journal of pharmacology* 591: 66-72.
82. Rubiolo, J. A., Vega, F. V. (2008) Resveratrol protects primary rat hepatocytes against necrosis induced by reactive oxygen species. *Biomedicine & pharmacotherapy* 62: 606-612.
83. Rutter K, Horvatiits T, Drolz A, Roedl K, Siedler S, Kluge S, Fuhrmann V. (2018) Akutes Leberversagen [Acute liver failure]. *Medizinische Klinik – Intensivmedizin und Notfallmedizin* 113: 174-183.

84. Sadeghi, A.; Ebrahimi, S.S.S.; Golestani, A.; Meshkani, R. (2017) Resveratrol ameliorates palmitate-induced Inflammation in skeletal muscle cells by attenuating oxidative stress and JNK/NF- $\kappa$ B pathway in a SIRT1-independent mechanism. *Journal of Cellular Biochemistry* 118: 2654-2663.
85. Sawda, C., Moussa, C., Turner, R. S. (2017) Resveratrol for Alzheimer's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1403: 142-149.
86. Shin, J. A., Oh, S., Ahn, J. H., Park, E. M. (2015). Estrogen receptor-mediated resveratrol actions on blood-brain barrier of ovariectomized mice. *Neurobiology of aging* 36: 993-1006.
87. Soares, R. O. S., Losada, D. M., Jordani, M. C., Évora, P., Castro-E-Silva, O. (2019) Ischemia/Reperfusion Injury Revisited: An Overview of the Latest Pharmacological Strategies. *International journal of molecular sciences* 20: 5034.
88. Song, J., Huang, Y., Zheng, W., Yan, J., Cheng, M., Zhao, R., Chen, L., Hu, C., Jia, W. (2018) Resveratrol reduces intracellular reactive oxygen species levels by inducing autophagy through the AMPK-mTOR pathway. *Frontiers of medicine*, 12: 697-706.
89. Subbaramaiah K, Chung WJ, Michaluart P, et al. (1998) Resveratrol inhibits cyclooxygenase-2 transcription and activity in phorbol ester-treated human mammary epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry* 273: 21875-21882.
90. Tang, H. Y., Shih, A., Cao, H. J., Davis, F. B., Davis, P. J., Lin, H. Y. (2006) Resveratrol-induced cyclooxygenase-2 facilitates p53-dependent apoptosis in human breast cancer cells. *Molecular cancer therapeutics* 5: 2034-2042.
91. Takaoka M. (1939) Resveratrol, a New Phenolic Compound, from *Veratrum grandiflorum*. *Journal of the Chemical Society of Japan*
92. Thiel G, Rössler OG. (2014) Resveratrol stimulates AP-1-regulated gene transcription. *Molecular Nutrition and Food Research* 58: 1402-1413.
93. Tsai, Y. F., Liu, F. C., Lau, Y. T., Yu, H. P. (2012) Role of Akt-dependent pathway in resveratrol-mediated cardioprotection after trauma-hemorrhage. *The Journal of surgical research* 176: 171-177.
94. Turner, R. T., Evans, G. L., Zhang, M., Maran, A., Sibonga, J. D. (1999) Is resveratrol an estrogen agonist in growing rats? *Endocrinology* 140: 50-54.
95. Vervandier-Fasseur, D., Latruffe, N. (2019) The Potential Use of Resveratrol for Cancer Prevention. *Molecules* 24: 4506.

96. Vollmar, B., Lang, G., Post, S., Menger, M. D., Messmer, K. (1993) Die Mikrozirkulation der Leber im hämorrhagischen Schock der Ratte und ihre Bedeutung für Energiestoffwechsel und Funktion [Microcirculation of the liver in hemorrhagic shock in the rat and its significance for energy metabolism and function]. *Zentralblatt für Chirurgie* 118: 218-225.
97. Wang, H., Guan, Y., Widlund, A. L., Becker, L. B., Baur, J. A., Reilly, P. M., Sims, C. A. (2014) Resveratrol ameliorates mitochondrial dysfunction but increases the risk of hypoglycemia following hemorrhagic shock. *The journal of trauma and acute care surgery* 77: 926-933.
98. Wang, H., Guan, Y., Karamercan, M. A., Ye, L., Bhatti, T., Becker, L. B., Baur, J. A., Sims, C. A. (2015) Resveratrol Rescues Kidney Mitochondrial Function Following Hemorrhagic Shock. *Shock* 44: 173-180.
99. Wang, X., Song, R., Bian, H. N., Brunk, U. T., Zhao, M., Zhao, K. S. (2012) Polydatin, a natural polyphenol, protects arterial smooth muscle cells against mitochondrial dysfunction and lysosomal destabilization following hemorrhagic shock. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 302: 805-814.
100. Watt, M. J., Holmes, A. G., Pinnamaneni, S. K., Garnham, A. P., Steinberg, G. R., Kemp, B. E., Febbraio, M. A. (2006) Regulation of HSL serine phosphorylation in skeletal muscle and adipose tissue. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 290: 500-508.
101. Wiggers, C. J., Werle, J. M. (1942) Exploration of a Method for Standardizing Hemorrhagic Shock. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 49: 604-606.
102. Wu, C. T., Yu, H. P., Chung, C. Y., Lau, Y. T., Liao, S. K. (2008) Attenuation of lung inflammation and pro-inflammatory cytokine production by resveratrol following trauma-hemorrhage. *The Chinese journal of physiology* 51: 363-368.
103. Wu, M. Y., Yiang, G. T., Liao, W. T., Tsai, A. P., Cheng, Y. L., Cheng, P. W., Li, C. Y., Li, C. J. (2018) Current Mechanistic Concepts in Ischemia and Reperfusion Injury. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 46: 1650-1667.
104. Wu, N., Zheng, B., Shaywitz, A., Dagon, Y., Tower, C., Bellinger, G., Shen, C. H., Wen, J., Asara, J., McGraw, T. E., Kahn, B. B., Cantley, L. C. (2013) AMPK-dependent degradation of TXNIP upon energy stress leads to enhanced glucose uptake via GLUT1. *Molecular cell*, 49: 1167-1175.
105. Xia, N., Daiber, A., Förstermann, U., Li, H. (2017) Antioxidant effects of resveratrol in the cardiovascular system. *British journal of pharmacology* 174: 1633-1646.

106. Xia, N., Förstermann, U., Li, H. (2014) Resveratrol and endothelial nitric oxide. *Molecules* 19: 16102-16121
107. Yu, H. P., Yang, S. C., Lau, Y. T., Hwang, T. L. (2010) Role of Akt-dependent up-regulation of hemeoxygenase-1 in resveratrol-mediated attenuation of hepatic injury after trauma hemorrhage. *Surgery* 148: 103-109.
108. Yu, H. P., Hwang, T. L., Hwang, T. L., Yen, C. H., Lau, Y. T. (2010) Resveratrol prevents endothelial dysfunction and aortic superoxide production after trauma hemorrhage through estrogen receptor-dependent hemeoxygenase-1 pathway. *Critical care medicine* 38: 1147-1154.
109. Yu, H. P., Hsu, J. C., Hwang, T. L., Yen, C. H., Lau, Y. T. (2008) Resveratrol attenuates hepatic injury after trauma-hemorrhage via estrogen receptor-related pathway. *Shock* 30: 324-328.
110. Yun H, Park S, Kim MJ, et al. (2014) AMP-activated protein kinase mediates the antioxidant effects of resveratrol through regulation of the transcription factor FoxO1. *FEBS Journal* 281: 4421-4438.
111. Zhang, F., Liu, J., Shi, J. S. (2010) Anti-inflammatory activities of resveratrol in the brain: role of resveratrol in microglial activation. *European journal of pharmacology*, 636: 1-7.
112. Zhou, X. M., Zhou, M. L., Zhang, X. S., Zhuang, Z., Li, T., Shi, J. X., Zhang, X. (2014) Resveratrol prevents neuronal apoptosis in an early brain injury model. *The Journal of surgical research*, 189: 159-165.
113. Zhou, Z. X., Mou, S. F., Chen, X. Q., Gong, L. L., Ge, W. S. (2018) Anti-inflammatory activity of resveratrol prevents inflammation by inhibiting NF- $\kappa$ B in animal models of acute pharyngitis. *Molecular medicine reports* 17: 1269-1274.
114. Zhou X., Yang J., Zhou M., Zhang Y., Liu Y., Hou P., Zeng X., Yi L., Mi M. (2019) Resveratrol attenuates endothelial oxidative injury by inducing autophagy via the activation of transcription factor EB. *Nutrition & Metabolism* 16: 42.
115. Zini, R., Morin, C., Bertelli, A., Bertelli, A. A., Tillement, J. P. (1999) Effects of resveratrol on the rat brain respiratory chain. *Drugs under experimental and clinical research* 25: 87-97.

## **7. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen**

### **7.1. Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Zentralvenenläppchen (1: Vena Centralis, 2: A. Hepatica, V.Portae), Schweineleber  
Taschenatlas Histologie, 13te Auflage, Wolfgang Kühnel, Thieme 2014

Abbildung 2: Periportalfeld und Lebersinusoide zwischen Leberzellbalken, Kurzlehrbuch  
Histologie, Norbert Ulfig, Thieme 2005

Abbildung 3: Struktur von Resveratrol, die häufigere trans – Konfiguration oben, die instabilere cis  
– Konfiguration unten

Abbildung 4: antioxidative Wirkmechanismen von Resveratrol

Abbildung 5: Versuchsaufbau mit Druckwandler zur arteriellen Druckmessung, rektaler  
Temperatursonde (links im Bild) sowie eingebrachtem Tracheostoma,  
zentralvenösem Zugang (oben im Bild) und arteriellem Zugang (unten im Bild)

Abbildung 6: Darstellung des Chirurgischen Eingriffs: zentral zu sehen ist die tracheale Kanüle,  
rechts im Bild der Zugang zur rechten Vena jugularis sowie links im Bild die  
Kanülierung der Arteria carotis. Die Fixierung der Katheter in den Gefäßen und der  
Trachea erfolgte mittels Fäden, zur zusätzlichen Fixierung dienen Pflaster-Streifen

Abbildung 7: schematischer Versuchsablauf

Abbildung 8: Verlauf des arteriellen Mitteldrucks

Abbildung 9: Verlauf der Herzfrequenz

Abbildung 10: Werte der BGA's für pH, pCO<sub>2</sub> und pO<sub>2</sub>. \* = p < 0,05 vs Baseline, + = p < 0,05  
gegenüber dem 90 Minuten Wert.

Abbildung 11: Werte der BGA's für Hb, Base Excess (BE) und HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>. \* = p < 0,05 vs Baseline, + =  
p < 0,05 gegenüber dem 90 Minuten Wert.

Abbildung 12: Plasmaverschwinderate von Indocyaningrün

\* p < 0,05 vs. alle SHAM Gruppem

# p < 0,05 vs. Schock Vehikel, Schock RES + ICI, Schock ICI

Abbildung 13: Darstellung der NAD(P)H-Autofluoreszenz, im Vergleich ein scheinoperiertes Tier (links) und ein Tier nach hämorrhagischem Schock

Abbildung 14: Messung der Autofluoreszenz von NADPH als Marker des zellulären Redox-Status:

\*  $p < 0,05$  vs. alle SHAM Gruppen

#  $p < 0,05$  vs. SHAM Vehikel, SHAM Res, SHAM ICI

\$  $p < 0,05$  vs. SHAM Res

Abbildung 15: Anzahl der perfundierten Sinusoide pro Gesichtsfeld. Es sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen nachweisbar.

Abbildung 16: erythrozytäre Flussgeschwindigkeit: es zeigt sich eine Tendenz zu höheren Flussgeschwindigkeiten in den Schock-Gruppen ohne eine Signifikanz zu erreichen.

Abbildung 17: Beispiel für Propidiumiodid-markierte Zellen.

Abbildung 18: Anzahl Propidiumiodid markierter Zellen pro Gesichtsfeld

(\*  $p < 0,05$  vs. Alle Sham – Gruppen, #  $p < 0,05$  vs. SCHOCK – Vehikel,

§  $p < 0,05$  vs. alle anderen Gruppen

## 7.2. Tabellen

Tabelle 1: Entnommenes Blutvolumen (Shed blood volumen)

## **8. Abkürzungsverzeichnis**

### **A**

A:	Arteria
Aa:	Arteriae
ADP:	Adenosin-Diphosphat
AKT:	Gene, welche für Proteinkinasen B kodieren
ALAT:	Alanin-Aminotransferase (früher GPT)
AMP:	Adenosin-Monophosphat
AMPK:	AMP-activated protein Kinase
ARDS:	acute respiratory distress Syndrome
ARE:	antioxidant response Element
AP-1:	Aktivator-Protein-1
ASAT:	Aspartat-Aminotransferase (früher GOT)
ATP:	Adenosin-Triphosphat

### **B**

BGA:	Blutgasanalyse
------	----------------

### **C**

COX-2:	Cyclooxygenase-2
--------	------------------

## **D**

D<sub>O2</sub>: Sauerstoffangebot

## **E**

E1: Östrogenrezeptor 1

E2: Östrogenrezeptor 2

ERK 1: Extracellular-signal Regulated Kinases 1

ERK 2: Extracellular-signal Regulated Kinases 2

EtOH: Ethanol

## **F**

FoxOs: Forxhead boy protein Os

## **G**

GOT: Glutamat-Oxalacetat-Transaminase

GPT: Glutamat-Pyrovat-Transaminase

## **H**

HTLV-1: Humanes T-Lymphotrophes Virus

HZV: Herz-Zeit-Volumen

## I

ICG:	Indocyaningrün
IFN- $\gamma$ :	Interferon- $\gamma$
IL-1:	Interleukin-1
IL-1 $\beta$ :	Interleukin-1 $\beta$
IL-2:	Interleukin-2
IL-6:	Interleukin-6
IL-8:	Interleukin-8
IL-10:	Interleukin-10
IL-19:	Interleukin-19
INR:	internationally normalized Ratio

## K

Keap1:	Kelch-like ECH-associated protein 1
--------	-------------------------------------

## M

MAPK:	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
ml:	Milliliter
mm:	Millimeter
mmHg:	Millimeter Quecksilber Seele

## **N**

NADPH:	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NF- $\kappa$ B :	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
nm:	Nanometer
NrF2:	nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2

## **P**

PDR <sub>ICG</sub> :	Plasmaverschwinderate von Indocyaningrün
PE:	Polyethylen
PGC-1 $\alpha$ :	peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 $\alpha$
PGD2:	Prostaglandin D2
PGE2:	Prostaglandin E2
PGI2:	Prostaglandin I2
pS <sub>O2</sub> :	perihpere Sauerstoffsättigung
P <sub>O2</sub> :	Sauerstoffpartialdruck
PTEN:	Phosphatase und Tensin Homologon

## **R**

ROS:	reactive oxygen Species
------	-------------------------

## **S**

SIRS: Systemic inflammatory response Syndrome

SIRT1: Sirtuin-1

SUMO-1: Small Ubiquitin-Related Modifier-1

## **T**

TFEB: transcription factor EB

TLR-4: Toll-like-Rezeptor-4

TNF- $\alpha$ : Tumormekrosefaktor Alpha

## **V**

V.: Vena

Vv.: Venae

## **9. Publikationen & Danksagung**

### **8.1. Publikationen**

Abstract: Resveratrol improves liver function after hemorrhagic shock in rat: Wolf A, Kleber A, Mertke T, Fink T, Volk T, Mathes A. 12AP3-6. European Journal of Anaesthesiology. June 2012;29():181.

Paper: Resveratrol therapy improves liver function via estrogen-receptors after hemorrhagic shock in rats. Wolf A, Fink T, Hinkelbein J, Mertke T, Volk T, Mathes A. PLoS One. 2022 Oct 13;17(10):s0275632. doi: 10.1371/journal.pone.0275632. PMID: 36227865; PMCID: PMC9560221.

## **8.2. Danksagungen**

Ich danke Herrn Professor Dr. T. Volk für die Möglichkeit zur Durchführung dieser Arbeit in den Laboratorien der Abteilung für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie des Universitätsklinikums des Saarlandes, Homburg

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. A. Mathes, aktuell tätig an der Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin der Uniklinik Köln für die geduldige Unterstützung und Betreuung beim Verfassen dieser Arbeit, ihrer Korrektur und Fertigstellung, die sonst so nicht möglich gewesen wäre.

Herrn Dr. med. A. Wolf, aktuell tätig am Universitätsklinikum Knappschaftskrankenhaus Bochum für die Unterstützung bei der Durchführung der Versuche, der Datenerhebung und ihrer Auswertung.

Frau Beate Wolf danke ich für die stets freundliche und kompetente Unterstützung bei den laborchemischen Teilen der Versuche.

Meiner Mutter, Dorothee Schabert, meiner Schwester Karla Mertke sowie meiner lieben Kollegin Dr. Julia Schulze-Berge für die freundliche und geduldige Korrektur meiner Arbeit.

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht

Tag der Promotion: 02.06.2025

Dekan: Professor Dr. med. dent. M.Hannig

Berichterstatter: Professor Dr. med. A. Mathes  
Professor Dr. med. J. Schattenberg