

**Aus der
Klinik für Anästhesiologie
des Universitätsklinikums der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

sowie der

**Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie
des Klinikums der
Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. Kai Zacharowski, FRCA**

**Die Rolle der Häm-Oxygenase 1
in der
Endotoxin vermittelten Leberprotektion**

Dissertation

**zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin des Fachbereichs
Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main**

**vorgelegt von
Christian Fricke
geb. in Düren**

Frankfurt am Main, 2009

Tag der mündlichen Prüfung:	16.03.2010
Dekan:	Prof. Dr. J. Pfeilschifter
Vorsitzender:	Prof. Dr. Dr. R.A. Sader
Referent:	Prof. Dr. Dr. K. Zacharowski
Korreferent:	Prof. Dr. S. Frank
Weiterer Prüfer:	Prof. Dr. V. Kempf

Inhaltsverzeichnis:

1: Einleitung und Fragestellung	Seite 3
1.1 Sepsis	Seite 5
1.2 Lipopolysaccharide	Seite 11
1.3 Die Rolle der Leber in der Immunreaktion	Seite 17
1.4 Häm-Oxygenase 1	Seite 19
2: Ergebnisse	Seite 21
3: Diskussion	Seite 27
4: Zusammenfassung	Seite 36
5: Anhang	
5.1 Abkürzungsverzeichnis	Seite 39
5.2 Materialien und Methoden	Seite 41
5.3 Danksagung	Seite 57
5.4 Literatur	Seite 58

1 Einleitung und Fragestellung

Die Sepsis stellt ein komplexes Krankheitsbild dar, welches trotz moderner Behandlungsmethoden mit einer erheblichen Morbidität und Mortalität behaftet ist [2,3]. Beim Übertritt von Erregern oder deren pathogenen Bestandteilen in die Blutbahn kommt es zu einer Aktivierung des angeborenen Immunsystems, unter anderem über die so genannten "Toll-Like-Rezeptoren" (TLR), welche in praktisch allen Organen und auf verschiedenen Blutzellen vorkommen [1,4-6]. Die dadurch ausgelöste Immunantwort dient der Bekämpfung der auslösenden Keime, kann allerdings auch in einer überschießenden Form wesentlich zu Organschäden, dem Funktionsverlust von Organen und schließlich nicht selten zum Tod im Verlauf einer Sepsis beitragen [4,7,8].

Obwohl seit den späten 80er Jahren die Mehrzahl der Sepsisfälle von gram-positiven Keimen verursacht wird, spielen gram-negative Bakterien weiterhin eine wichtige Rolle in der Epidemiologie der Sepsis [3]. Im Zuge der gram-negativen Sepsis wird ein Großteil der Immunreaktionen durch den gram-negativen Zellwandbestandteil Lipopolysaccharid (LPS) ausgelöst [4,7,9,10]. Ein wirksamer Schutz vor den schädigenden Effekten von LPS würde daher einen wichtigen Schritt in der Therapie der gram-negativen Sepsis darstellen.

Es hat sich nun herausgestellt, dass die Gabe von geringen Mengen LPS das Immunsystem in einer Weise aktiviert, welche die Reaktion auf eine in einem gewissen Zeitintervall folgende große Menge an LPS moduliert und die schädigenden Effekte verringert. Dieser Effekt wird als LPS-Toleranz bezeichnet und hat sich in verschiedenen Modellen bestätigt, wobei die genauen Mechanismen durch welche die Protektion vermittelt wird weiterhin unbekannt sind [11,12].

Während der Immunantwort und der Elimination von LPS aus dem Organismus spielt die Leber eine zentrale Rolle [13-15] und im Verlauf einer Sepsis stellt die Leber eines der Organe dar, die besonderen Belastungen ausgesetzt sind [4,16]. Eine Verringerung der Schäden, die im Verlauf einer Sepsis innerhalb der Leber auftreten, könnte daher die Prognose entscheidend verbessern. Auch erscheint das Organ aufgrund seiner Schlüsselposition in der Immunantwort gegen LPS gut geeignet mögliche Mechanismen der LPS-Toleranz weiter zu untersuchen.

In den letzten Jahren ist die induzierbare Isoform der Häm-Oxygenase (HO)-1 in den Fokus verschiedener Untersuchungen geraten, da sie durch unterschiedliche Stimuli induziert werden kann und eine wichtige Rolle im Schutz des Organismus gegen oxidativen Stress zu spielen scheint [17-22]. Möglicherweise spielt die HO-1 auch eine Rolle in der durch LPS-Vorbehandlung vermittelten LPS-Toleranz.

In der vorliegenden Arbeit soll nun untersucht werden, ob die Vorbehandlung mit niedrig dosiertem LPS die Leber vor den Folgen eines nachfolgenden LPS-Schocks, als Modell einer gram-negativen Sepsis, schützt. Weiterhin wird in diesem Zusammenhang eine mögliche Rolle von HO-1 im Zuge dieser Protektion überprüft. Bei den zugrunde liegenden Versuchen wurde ein Tiermodell an der Ratte verwendet.

Folgende Fragen sollen hierbei geklärt werden:

- 1: Hat die Gabe von niedrig dosiertem LPS einen Einfluss auf die Expression von HO-1 in der Leber?

- 2: Ist durch die Gabe von niedrig dosiertem LPS (LPS-Vorbehandlung) vor dem Auslösen eines LPS-Schocks eine
 - 2.1: Verbesserung der Kreislaufparameter
 - 2.2: Verringerung der Leberschädenim Verlauf eines nachgeschalteten LPS-Schocks zu erreichen? (LPS-Toleranz)

- 3: Ist durch eine LPS-Vorbehandlung eine Veränderung in der Expression von HO-1 in der Leber nach durchgemachtem LPS-Schock zu erreichen und wenn ja, besteht eine Korrelation mit einer möglichen Protektion?

1.1 Sepsis

Die schwere Sepsis stellt trotz moderner Therapiemethoden ein schwerwiegendes Problem dar. Angus et al. schätzen die Inzidenz der schweren Sepsis in den USA zu Beginn des 21ten Jahrhunderts auf etwa 750.000/Jahr und gehen davon aus, dass in den nächsten 10-15 Jahren diese Zahl auf über 1 Million/Jahr ansteigen wird. In Deutschland wird die Zahl der Sepsisfälle auf ca. 150.000/Jahr geschätzt und mit etwa 60.000 Todesfällen/Jahr rangieren septische Erkrankungen auf Rang 3 hinter KHK und akutem Myokardinfarkt [23].

Obwohl aber die Zahl von Sepsisfällen in den letzten Jahrzehnten deutlich angestiegen ist, ist die Mortalität rückläufig. Lag sie in den Jahren 1979–1985 noch bei etwa 28%, so war sie im Zeitraum 1995-2001 bereits auf durchschnittlich 18% gesunken [2,3]. Hier muss allerdings angefügt werden, dass die Mortalität deutlich mit der Anzahl der versagenden Organe korreliert, so liegt die Sterblichkeit bei schwerer Sepsis mit dem Versagen von 3 oder mehr Organsystemen weiterhin bei über 70%. Die am häufigsten betroffenen Organsysteme sind dabei Lunge (18%), Niere (15%), Herz-Kreislauf System (7%) und Leber (6%) [3].

Wurde bis zum Jahr 1987 noch die Mehrzahl der Sepsisfälle durch gram-negative Keime verursacht, so sind im Jahr 2000 ca. 52% aller Fälle durch gram-positive Keime verursacht und nur noch ca. 37% durch gram-negative Keime. Auch die Zahl der durch Pilze hervorgerufenen Sepsisfälle hat sich in den letzten Jahrzehnten deutlich gesteigert und liegt im Jahr 2000 bei ca. 5%. Die restlichen Fälle werden durch Mischinfektionen oder Anaerobier hervorgerufen [3,24,25].

Mögliche Ursachen für die weiterhin ansteigende Zahl der Sepsisfälle sind in verschiedenen Bereichen zu suchen. So werden immer umfangreichere Eingriffe zunehmend auch bei immer älteren Patienten durchgeführt, die zudem häufig mit einer Vielzahl von erschwerenden Begleiterkrankungen wie COPD, Diabetes mellitus, Adipositas, Herz-Kreislauf Erkrankungen oder Niereninsuffizienz vorbelastet sind. Durch neuere Therapieverfahren kann eine immer höhere Lebenserwartung auch bei schweren, z.B. neoplastischen Erkrankungen erreicht werden, diese Patienten sind dann allerdings oft durch die Folgen von Chemotherapie oder Immunsuppression belastet und dadurch einem deutlich höheren Sepsisrisiko ausgesetzt. Auch hat in den letzten Jahren die Häufigkeit der Durchführung invasiver Maßnahmen vor allem im Bereich der Intensivmedizin deutlich zugenommen, durch

welche ein Eindringen von pathogenen Mikroorganismen erleichtert werden kann [4,26].

Trotz einer ausgiebigen Beschreibung der Entität der Sepsis, stellt die genaue Definition auch heute noch viele Mediziner vor erhebliche Probleme. Im Jahr 1991 erfolgte durch die *Society of Critical Care Medicine (SCCM)* und das *American College of Chest Physicians (ACCP)* die Definition von Sepsis und SIRS (*systemic inflammatory response syndrom*). Beide Erkrankungsbilder zeigen dieselben Symptome (siehe Tabelle 1), beim SIRS fehlt jedoch der Nachweis von Bakterien in der Blutkultur. Voraussetzung für die Bezeichnung SIRS sind zwei oder mehr der folgenden Befunde [27]:

Tab. 1: Kriterien des SIRS (nach SCCM und ACCP 1991)

Körpertemperatur über 38°C oder unter 36°C
Herzfrequenz über 90 Schläge / min
Hyperventilation mit Atemfrequenz über 20 / min oder pCO ₂ unter 32 mmHg
Leukozyten unter 4.000 / µl oder über 12.000 / µl oder unreife Formen im peripheren Blutaussstrich

Bone et al. definierten zu diesem Zeitpunkt Sepsis als SIRS in Kombination mit Infektion, schwere Sepsis als Sepsis mit Organschäden, Hypoperfusion und Hypotension und septischen Schock als Sepsis mit arterieller Hypotension trotz adäquater Volumensubstitution [28]. Mögliche Ursachen für die genannten Krankheitsbilder sind lokale oder generalisierte Infektionen, Traumata, Verbrennungen oder auch sterile Entzündungen wie die akute Pankreatitis.

Trotz dieser Definition von 1991 gibt es im klinischen Alltag immer noch Probleme mit der Definition der Sepsis, wie eine Studie der *European Society of Intensive Care Medicine (ESICM)* zeigte, in der 71% der befragten Ärzte keine allgemein gebräuchliche Definition der Sepsis verwenden [29].

Die aus diesem Grunde 2001 einberufene *International Sepsis Definition Conference* erkannte, dass klinische Parameter der Sepsis wechselhaft sind und biochemische Marker als konstantere Merkmale wünschenswert wären. Es konnte demonstriert werden, dass bei Patienten, die die Bedingungen der schweren Sepsis erfüllen, unter anderem Interleukin(IL)-10 [30], Adrenomedullin [31], löslicher CD-14 Rezeptor [32], Phospholipase A2 [33], C-reaktives Protein (CRP) [34] und Procalcitonin (PCT) [35]

erhöht sind. Obwohl diese laborchemischen Marker teilweise die Entscheidung über das Vorliegen und auch die Schwere einer Sepsis erleichtern, hat die klassische Sepsisdefinition, basierend auf klinischen Symptomen und klinisch-chemischen Parametern, weiterhin Bestand.

Sepsis wird somit bis heute als SIRS in Kombination mit Infektion definiert, wobei Infektion als die Besiedelung von normalerweise sterilem Gewebe bzw. steriler Körperflüssigkeiten durch pathogene Mikroorganismen beschrieben wird. Diese Definition stellt sich jedoch weiterhin als unzureichend dar, da es Infektionen des Darms gibt, der auch unter physiologischen Bedingungen niemals steril ist und manche Erkrankungen durch bakterielle Toxine und nicht durch eine Besiedelung selbst hervorgerufen werden [27].

Aufgrund der weiterhin bestehenden Schwierigkeiten in Bezug auf die Sepsisdefinition wurde eine Liste von Symptomen erstellt (siehe Tab. 2), welche zwar nicht spezifisch sind für die Sepsis, aber welche in der Kombination ihres Auftretens eine Sepsis sehr wahrscheinlich machen, sofern keine andere Ursache der jeweiligen Symptome gefunden werden kann [36].

Tab. 2: Kriterien der *International Sepsis Definition Conference (2001)*

Allgemeine Parameter

Fieber	Körperkerntemperatur > 38,3 °C
Hypothermie	Körperkerntemperatur < 36,0 °C
Tachykardie	Herzfrequenz > 90 / min oder > 2 SD über Normalwert/Alter
Tachypnoe	Atemfrequenz > 30 / min
Vigilanzstörungen	Eintrüben, Verwirrtheit, etc.
Ödeme oder pos. Flüssigkeitsbilanz	Signifikante Ödeme oder > 20 ml / kg KG Flüssigkeitszufuhr über einen Zeitraum von 24h
Hyperglykämie	Plasma Glukose > 7,7 mM / l (~140 mg / dl), ohne Diabetes

Entzündungsparameter

Leukozytose	Leukozyten > 12.000 / μ l
Leukozytopenie	Leukozyten < 4.000 / μ l
Linksverschiebung	> 10% unreife Leukozyten
CRP-Erhöhung	Plasma CRP > 2 SD über Normalwert
Procalcitonin-Erhöhung	Plasma Procalcitonin > 2 SD über Normalwert

Hämodynamische Parameter

Arterielle Hypotension	Systolischer BD < 90 mmHg, MABD < 70 mmHg oder BD Abfall > 40 mmHg bzw. > 2 SD unter Normalwert
Venöse Sättigung	Gemischtvenöse O ₂ Sättigung > 70% (nicht bei Kindern verwertbar)
Herzindex	Herzindex > 3,5 l / min / m ²

Organschäden

Art. Hypoxämie	PaO ₂ / FIO ₂ < 300
Oligurie/Anurie	Urinmenge < 0,5 ml / kg / h oder < 45 ml für > 2h Kreatininanstieg > 0,5 mg / dl
Gerinnungsstörungen	INR > 1,5 oder aPTT > 60s
Ileus	Vollständiges Fehlen von Darmgeräuschen
Thrombozytopenie	Thrombozyten < 100.000 / µl
Hyperbilirubinämie	Bilirubin > 4 mg / dl bzw. 70 µmol / l

Gewebeparusionsparameter

Hyperlactatämie	Lactat > 3 mmol / l
Perfusion	Verringerte kapilläre Wiederauffüllung

Während einer Sepsis werden durch bakteriellen Zerfall sowie Zellteilung in großen Mengen bakterielle Zellwandbestandteile frei. Diese Zellwandbestandteile führen zur weiteren Aktivierung des Immunsystems und so zur Freisetzung verschiedener Mediatoren, wie Zytokinen, Chemokinen, Prostaglandinen, Lipid-Mediatoren und reaktiven Sauerstoffradikalen. Die oben genannten Mediatoren führen zur Vasodilatation, einer Induktion der Synthese von Adhäsionsmolekülen, sowie einer verstärkten Diapedese und Aktivierung von Leukozyten [7,9,37,38]. Über verschiedene Mechanismen können die Keime und ihre Zellwandbestandteile außerdem zu einer Aktivierung des Gerinnungssystems, mit folgender disseminierter intravasaler Gerinnung (DIG) führen, welche zu schweren Blutungen und Mikrothromben mit den Folgen einer Hypoperfusion und Hypoxie und schließlich im Zusammenspiel mit intra- und extravasalen phagozytotischen Zellen zu Organschäden führt [39,40]. Die entstehenden Organschäden führen oft zum

tödlichen Verlauf der schweren Sepsis mit Multiorganversagen, wobei Lunge, im Sinne eines *acute respiratory distress syndrom* (ARDS), Leber und Niere besonders früh und häufig betroffen sind [4,7,8].

Bei der Prognose des Sepsisverlaufs spielt eine genetische Prädisposition vermutlich eine entscheidende Rolle [27,41]. Hinzu kommen der allgemeine Gesundheitszustand und bestehende Vorerkrankungen [27], denn trotz der Tatsache, dass bei der Sepsis das übermäßig aktivierte Immunsystem eines der Hauptprobleme darstellt, sind Personen mit geschwächtem Immunsystem stärker gefährdet eine Sepsis mit kompliziertem Verlauf zu entwickeln [42].

Die häufigsten Ursachen der Sepsis in den USA sind Infektionen von Lunge (ca. 40%), Abdomen, Urogenitaltrakt und Weichteilgewebe (je ca. 10%) [2]. Die Therapie stellt trotz verbesserter Behandlungskonzepte weiterhin ein großes Problem dar. Im Vordergrund steht die kausale Therapie, welche je nach Ursache der Sepsis in einer chirurgischen Sanierung des Fokus oder in einer gezielten antibiotischen Therapie der auslösenden Keime besteht [43].

Besonders wichtig ist in diesem Zusammenhang der möglichst schnelle Beginn der Therapie, wobei häufig der Begriff der "Goldenen Stunde(n)" verwendet wird, da ein konsequenter Therapiebeginn in diesem Zeitraum den größten Effekt auf das Überleben des Patienten hat. Neben der kausalen Therapie hat sich dabei das Konzept der "*Early goal-directed therapy*" durchgesetzt, bei der durch die Kombination verschiedener Maßnahmen, wie aggressivem Flüssigkeitsmanagement, dem Einsatz von positiv inotropen Medikamenten und eventuellen Transfusionen die Aufrechterhaltung einer adäquaten Organperfusion und -oxygenierung angestrebt wird [43,44].

Ein weiterer Baustein in der Therapie der Sepsis ist die konsequente Einstellung des Blutzuckers. Die Effekte der intensiven Insulintherapie bei Patienten mit Sepsis waren in den letzten Jahren oft Gegenstand der Diskussion, wobei aktuell angenommen wird, dass ein Erfolg dieses Therapiekonzeptes sowohl von der Genauigkeit der Blutzuckereinstellung, als auch von der Dauer der Erkrankung abhängt. Je länger eine septische Episode andauert, umso deutlicher profitieren Patienten von einer strengen Blutzuckereinstellung [45].

Als wichtig in der Behandlung von Patienten im Rahmen einer Sepsis hat sich außerdem ein lungenprotektives Beatmungsregime erwiesen. Selbst bei Patienten, die nicht primär wegen eines respiratorischen Versagens intubiert und beatmet

werden, zeigt sich im Verlauf der Beatmung häufig ein ARDS, welches zumindest zu einem Teil durch die bei der mechanischen Beatmung entstehenden Scherkräfte mitverursacht wird. Im Rahmen dieser mechanischen Belastung der Lunge kommt es außerdem zu einer Ausschüttung verschiedener Zytokine, die dann wiederum an anderen Organsystemen zu Schädigungen führen können. Im Rahmen einer lungenprotektiven Beatmung mit geringeren Tidalvolumina können die entstehenden Scherkräfte minimiert und die Prognose der Patienten entscheidend verbessert werden [43,46].

Theoretische Überlegungen und tierexperimentelle Studien führten in den späten 70er und frühen 80er Jahren zum Einsatz von hochdosierten Kortikosteroiden im Rahmen der Sepsistherapie. In der Mitte der 80er Jahre durchgeführte Studien zeigten jedoch, dass dieses Konzept keine eindeutigen Vorteile erbringt und die Kortikosteroidtherapie im Rahmen der Sepsis wurde wieder verlassen.

Eine von Annane et. al. durchgeführte Studie zeigte dann im Jahr 2002, dass vor allem bei Patienten mit einer Nebenniereninsuffizienz (Nichtansprechen auf ACTH-Gabe) im Rahmen der schweren Sepsis ein deutlicher Benefit durch die Zufuhr von moderaten Dosen von Kortikoiden (200-300 mg Hydrokortison / Tag) zu erreichen ist [47].

Die 2008 veröffentlichte CORTICUS Studie zeigte jedoch keinen Unterschied im Überleben bei einer Gruppe von Patienten die mit 50 mg Hydrokortison / Tag im Vergleich zu einer Placebo Gruppe behandelt wurden. Auch konnte kein signifikanter Unterschied in den Untergruppen mit fehlendem Ansprechen auf ACTH-Gabe beobachtet werden, weder in der Placebo Gruppe, noch in der Gruppe mit Hydrokortison-Therapie [48]. Mögliche Gründe für die unterschiedlichen Ergebnisse, könnten in den Einschlusskriterien, der Hydrokortisondosis und der Dauer der Applikation gesehen werden.

Als mögliche Ursache der fehlenden Wirksamkeit von Hydrokortison im Rahmen der Sepsis wird unter anderem eine erhöhte Rate von Superinfektionen mit danach folgenden erneuten septischen Episoden diskutiert.

Somit ist der Einsatz von Kortikosteroiden in der Therapie der Sepsis weiterhin Gegenstand intensiver Diskussion und bis heute nicht eindeutig geklärt, kann jedoch zumindest aktuell nicht uneingeschränkt für ein bestimmtes Patientenkollektiv empfohlen werden.

Eine Neuheit in der Therapie der Sepsis war die Entwicklung von rekombinantem aPC (aktiviertes Protein C). Obwohl die Therapie mit aPC in Studien zu einer signifikanten Reduktion der Mortalität führte, wurde sie seit ihrer Einführung kontrovers diskutiert. Ein Grund dafür ist sicherlich in den enormen Kosten zu sehen, die durch die Verwendung von aPC verursacht werden. Außerdem zeigte sich eine Reduktion der Sterblichkeit nur in einer Untergruppe der Patienten mit schwerer Sepsis.

Da die Verwendung von aPC aber zu einer erheblichen Steigerung des Blutungsrisikos führt, sollte nach aktuellen Empfehlungen eine Therapie nur ab einem APACHE II Score von > 25 durchgeführt werden, daher nur bei Patienten mit schwerer Sepsis. Trotzdem sollte an dieser Stelle angefügt werden, dass aPC bisher die einzige zugelassene Pharmakotherapie der Sepsis darstellt, wenn man von der kausalen Therapie mit Antibiotika absieht [49].

Allgemein zeigt sich also, dass die Therapie der Sepsis weiterhin schwierig ist und dass ein tieferes Verständnis der pathophysiologischen Vorgänge im Rahmen der Sepsis unabdingbar ist, um zielgerichtete Therapieverfahren zu entwickeln.

1.2 Lipopolysaccharide

Im Jahre 1892 entdeckte Richard Pfeiffer, ein Schüler Robert Kochs, ein hitzestabiles Endotoxin bei *Vibrio Cholerae* und setzte damit einen Meilenstein für das Verständnis der pathophysiologischen Vorgänge beim Kontakt mit gram-negativen Bakterien [50]. Lipopolysaccharide (LPS) sind die wesentlichen Wandbestandteile von gram-negativen Bakterien und unerlässlich für ihre Stabilität und ihr Wachstum. LPS gehört hierbei in die Gruppe der sogenannten *pathogen-associated-molecular-pattern* (PAMPs), die als Träger von spezifischen Molekularoberflächen von Rezeptoren des Immunsystems, den *pathogen-recognition receptors* (PRR), als körperfremd erkannt werden können [51].

Das LPS Molekül ist nicht toxisch, solange es sich im Verband der Zellwand befindet. Daraus gelöst führt der toxische Bestandteil Lipid A jedoch zu einer starken Immunantwort bei Kontakt mit Immunzellen. Freigesetzt wird LPS bei jeder Zellteilung, sowie bei Lyse oder Zelltod der Keime [10,52,53].

LPS besteht aus 4 Komponenten, von denen das Lipid A durch die Vermittlung der toxischen Wirkung die zentrale Rolle einnimmt [54]. Die Testung von synthetischen Derivaten von Lipid A zeigte nur etwa 1/10 bis 1/1000 der Wirkung von natürlichem Lipid A [55,56]. Die weiteren Bestandteile des LPS-Moleküls werden gebildet von äußerem und innerem Kern, sowie dem O Antigen. Die einfachste aktive Form von LPS besteht hierbei aus Lipid A und dem inneren Kern. Das O Antigen ist an einen endständigen Zucker des äußeren Kerns angehängt, ragt aus der äußeren Bakterienwand heraus und ist hochgradig immunogen (s. Abb. 1, Abb. 2) [56,57]. LPS kann durch Behandlungen mit Phenol, Chloroform und/oder Petroleum-Äther aufgereinigt werden. Trotzdem ist eine Verunreinigung mit unterschiedlichen Mengen von Proteinen, Phospholipiden, kovalenten Anionen und/oder DNA häufig nachweisbar [58], welche die Bindungseigenschaften und Endotoxizität des LPS verändern [59,60].

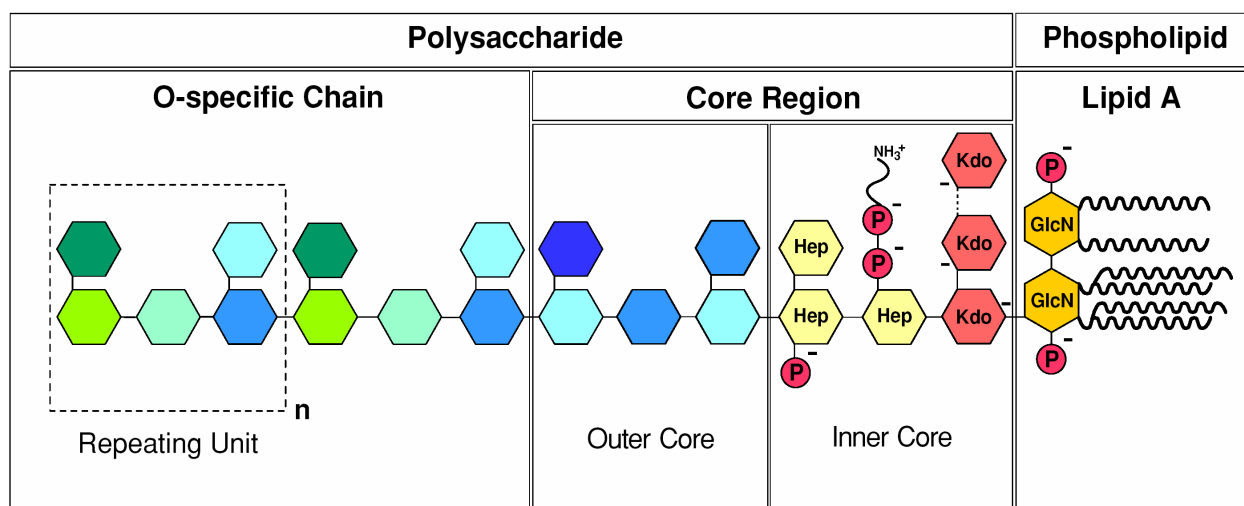


Abb. 1: 4-Komponenten-Aufbau von LPS.

Der aktiven Komponente Lipid A folgen der innere Kern (*inner core*) und der äußere Kern (*outer core*), sowie das O-Antigen (*o-specific chain*)

Abbildung aus [57] übernommen

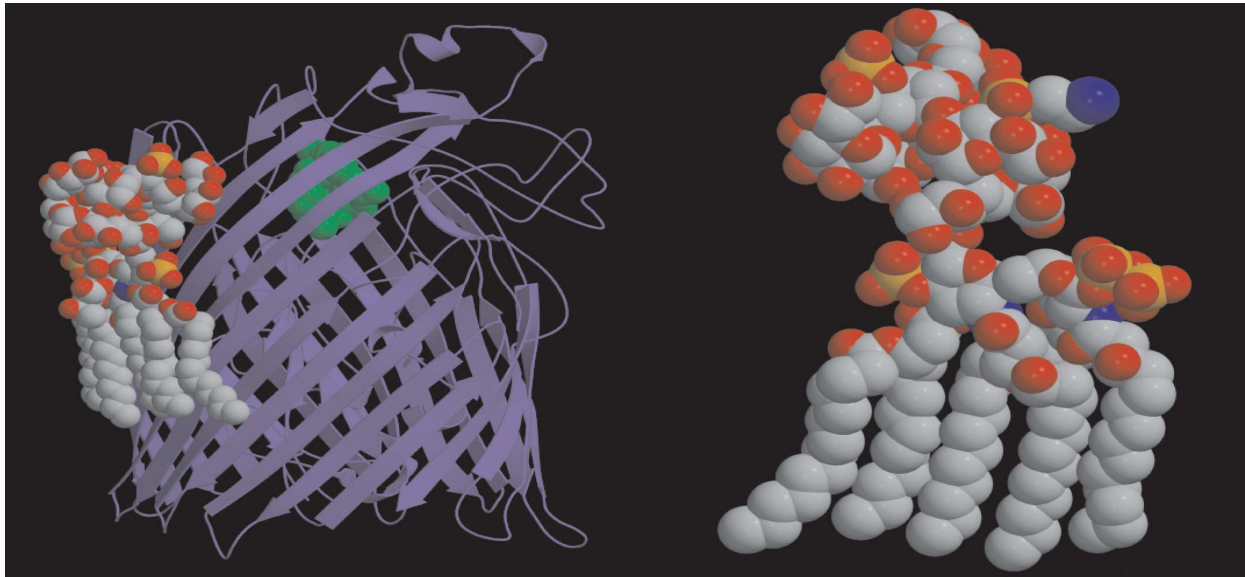


Abb. 2: Röntgenkristallographie von LPS aus E.coli.

Links: die oberflächenassoziierte Bindung von LPS in der Bakterienwand

Rechts: atomare 3-D Struktur von LPS: blau: Stickstoff, gelb: Phosphor, rot: Sauerstoff,
weiß: Kohlenstoff

Abbildung aus [57] übernommen

Beim Eindringen gram-negativer Keime in den Organismus wird, wie oben bereits erwähnt, durch Zellteilung und Zerstörung der Keime LPS freigesetzt, welches dann durch die PRR des Immunsystems erkannt wird und zur Freisetzung von pro-inflammatorischen Mediatoren und zu vaskulären und physiologischen Veränderungen, sowie zur Rekrutierung von Immunzellen führt. Die für die Bindung von LPS verantwortlichen PRR sind die sogenannten Toll-like Rezeptoren (TLR), welche häufig auch als "*First line of defense*" bezeichnet werden. Diese Bezeichnung rührt daher, dass diese relativ kleine Gruppe von TLR in der Lage ist, die verschiedensten eindringenden pathogenen Mikroorganismen sofort unspezifisch zu binden und für eine folgende Aktivierung des spezifischen Immunsystems zu sorgen [1,6].

Tab. 3
TLR und von ihnen erkannte Mikroorganismen bzw. Strukturkomponenten

TLR	Mikroorganismus	Strukturkomponente
TLR-1	Neisseria meningitidis	Triacyllipopeptid
	Mykobakterien	
TLR-2	Gram-positive Bakterien	Lipoteichonsäure, Lipopeptide
	Cytomegalie Virus	Glykoprotein gB und gH
	Leptospira interrogans	Atypische Lipopolysaccharide
	Porphyromonas gingivalis	Atypische Lipopolysaccharide
	Hefe	Zyosan
	Masern	Hämagglutinin
	Herpes Simplex Virus	Nicht bekannt
	Varizella Zoster Virus	Nicht bekannt
TLR-3	Verschiedene Viren	Doppelstrang-RNA
TLR-4	Gram-negative Bakterien	Lipopolysaccharide
	Respiratorisches Synzytial	
TLR-5	Motile Bakterien	Flagellin
TLR-6	Mykoplasmen	Diacyl Lipopeptide
	Gram-positive Bakterien	Lipoteichonsäure
	Hefe	Zyosan
TLR-7	Influenza-A	Einzelstrang-RNA mit Uridin und Ribose
	HIV	
	Varizella Stomatitis Virus	
TLR-8	HIV	Einzelstrang-RNA
TLR-9	Verschiedene Viren und Bakterien	CpG-enthaltende DNA

Tabelle aus [1] übernommen

Tab. 3 zeigt die unterschiedlichen Mikroorganismen bzw. ihre Strukturkomponenten, welche von den verschiedenen TLR gebunden werden. Wie oben dargestellt, werden gram-negative Bakterien bzw. ihr Wandbestandteil Lipopolysaccharid insbesondere von TLR-4 gebunden [1,6,61,62]. So zeigten Untersuchungen, dass bei Versuchstieren mit genetischem TLR-4 Defekt eine verminderte Immunantwort auf die Gabe von LPS erfolgt und eine erhöhte Infektanfälligkeit gegen gram-negative Keime besteht [5]. Voraussetzung, oder zumindest verantwortlich für eine hohe Verstärkung der Bindung von LPS an TLR-4, ist die Bindung von CD-14 bzw. sCD-14 an das LPS [63].

Es scheint aber auch andere Wege der LPS Erkennung und Vernichtung durch das Immunsystem zu geben, da Haziot et al. zeigen konnten, dass CD-14 und TLR-4 knock-out Mäuse eine effiziente Immunantwort gegen E.coli LPS im Peritoneum ausbilden [64]. Auch bestehen Kreuzreaktionen zwischen den einzelnen Rezeptoren und ihren aktivierenden Strukturkomponenten. Abb. 3 gibt einen Überblick über die durch TLR Bindung ausgelösten intrazellulären Abläufe [1].

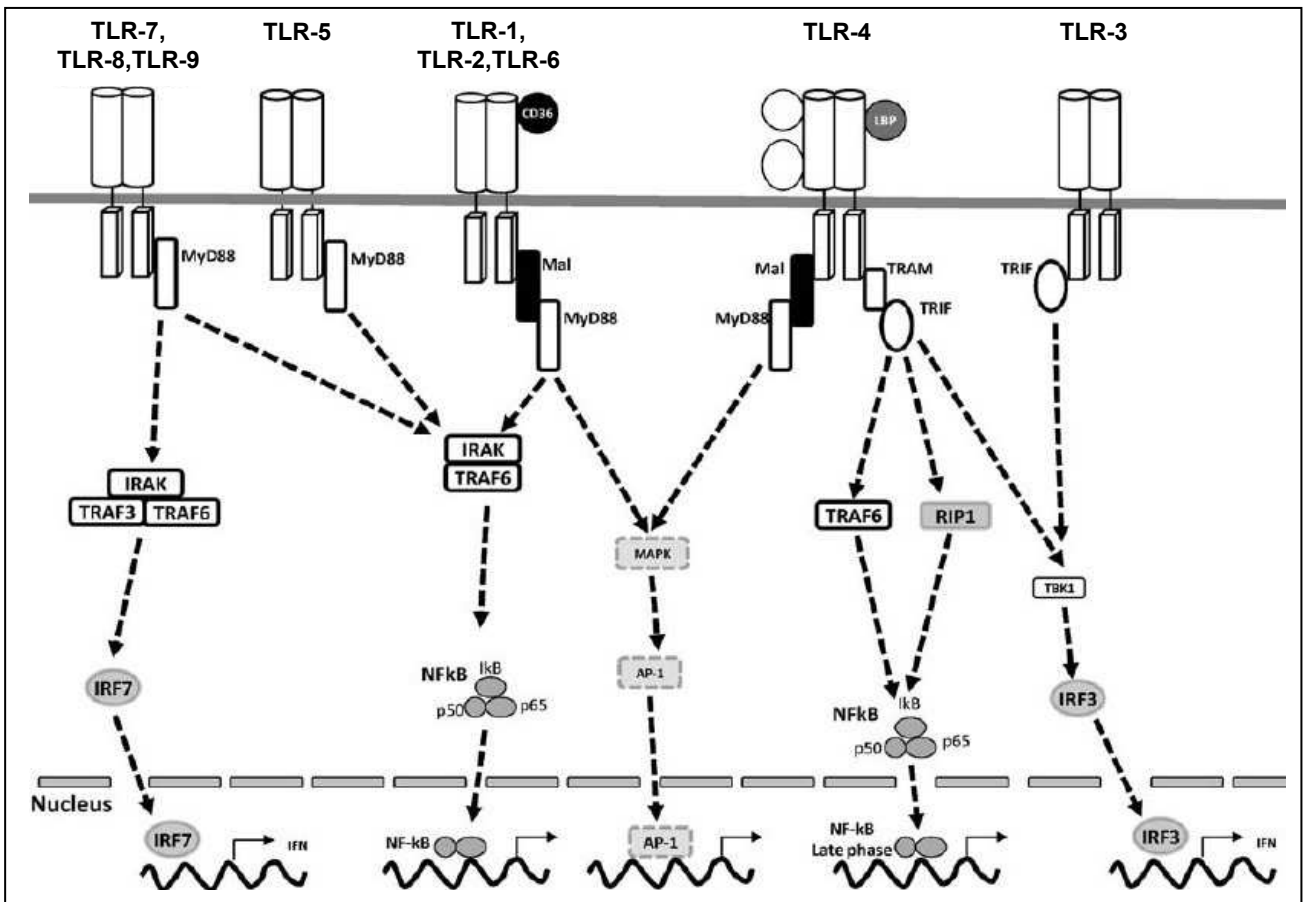


Abb. 3 Darstellung der intrazellulären Abläufe nach TLR-Aktivierung

Ap-1: activator protein 1; CD: cluster differentiation molecule; κ B: I kappa B; IRAK: interleukin receptor associated kinase; LBP: lipopolysaccharide binding protein; Mal: MyD88 adaptor like; MyD88: myeloid differentiation factor 88; NF- κ B: nuklear factor kappa B; RIP: receptor interacting protein; TBK: TANK binding kinase; TLR: toll like receptor; TRAF: tumor necrosis factor receptor associated factor; TRAM: translocating associating membrane protein; TRIF: TIR domain-containing adaptor inducing interferon β

Abbildung aus [1] übernommen

Die durch die LPS Bindung ausgelösten Effekte sind mannigfaltig, so kommt es unter anderem zur Freisetzung von Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)-Alpha, IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 und PAF (*platelet activating factor*) [65,66]. Dies hat Auswirkungen auf das umliegende Gewebe. Polymorphnukleäre Neutrophile (PMN) wandern in das Gewebe ein und werden aktiviert [67,68]. Die aktivierten PMN sind nun in der Lage LPS und komplette Bakterien zu erkennen und durch verschiedene antibakterielle Lysozyme, Proteine und freie Radikale zu vernichten [69]. Außerdem produzieren sie eine Reihe von Mediatoren, um die Abwehrreaktion weiter zu verstärken [70]. Auch konnte gezeigt werden, dass durch TLR-Aktivierung über das Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-System eine endokrine Stressantwort ausgelöst wird, die einen wichtigen Teil der systemischen Inflammation darstellt und z.B. bei TLR-2 defizienten Mäusen deutlich vermindert ist [5].

Allerdings wird auch ein Teil des Endothelschadens, der im Verlauf einer schweren Sepsis beobachtet wird, durch die von PMN freigesetzten Mediatoren verursacht [4]. Die aktivierten Immunzellen und die von ihnen erzeugten Zytokine, Lipidmediatoren und reaktiven Sauerstoffspezies sind außerdem für Effekte wie Fieber, periphere Vasodilatation und Dysregulationen im Gerinnungssystem verantwortlich und tragen somit wesentlich zu Organversagen, Schock und schließlich dem möglichen Tod in der schweren Sepsis bei [4].

Allgemein ist also festzuhalten, dass der bakterielle Zellwandbestandteil LPS und insbesondere sein Bestandteil Lipid A, vor allem via Bindung an die TLRs, ein starker Induktor des angeborenen Immunsystems ist und zu einer ausgeprägten pro-inflammatorischen Reaktion führt. Diese dient zum einen der Bekämpfung der auslösenden Keime, ist aber auf der anderen Seite auch für eine Vielzahl von Organschädigungen verantwortlich, welche im Laufe einer schweren Sepsis auftreten.

Interessanterweise sind unter physiologischen Bedingungen die Immunzellen des Körpers kontinuierlich niedrigen Mengen von LPS ausgesetzt, welches aus Bakterien stammt, die durch den Gastrointestinaltrakt und die Portalvene in den Körper gelangt sind [42]. Es konnte gezeigt werden, dass das Immunsystem durch die Gabe von bakteriellen Wandbestandteilen unspezifisch aktiviert werden kann und es ist denkbar, dass die kontinuierliche Aktivierung des Immunsystems durch LPS notwendig ist, um ein gewisses Aktivitätslevel aufrecht zu erhalten. So sind auch in

gesunden Individuen geringe Mengen von LPS nachweisbar, ohne Schäden zu verursachen [71].

Im Verlauf der weiteren Erforschung der pathophysiologischen Auswirkungen des LPS stellte sich nun heraus, dass geringe Dosen von LPS auch einen protektiven Effekt auf den Organismus ausüben können. Zuckerman et al. konnten zeigen, dass Ratten durch eine LPS Vorbehandlung in die Lage versetzt werden, eine LPS Dosis zu überleben, die für nicht-vorbehandelte Ratten zu 100% tödlich ist [12].

Dieser Effekt wird in verschiedenen Veröffentlichungen mit einer ganzen Reihe von Begrifflichkeiten belegt, die aber das gleiche Phänomen beschreiben. *“Endotoxin tolerance”* [72], *“LPS reprogramming”* [73] oder *“Discordant adaption”* [74] stehen somit als gleichwertige Begriffe zur Verfügung. Auch für die Vorbehandlung mit LPS (*“Preexposure”* oder *“Pretreatment”*) und den nachfolgenden Stimulus mit einer potentiell tödlichen LPS Dosierung (*“Activation”*, *“Stimulation”* oder *“Rechallenge”*) ist keine einheitliche Nomenklatur verfügbar [72-74]. In der vorliegenden Arbeit werden die Begriffe *“LPS Vorbehandlung”*, sowie darauf folgend der Begriff *“LPS Schock”* verwendet.

1.3 Die Rolle der Leber in der Immunreaktion

Die Leber ist das größte solide Organ im Körper und macht etwa 2-5% des Körpergewichts des Erwachsenen aus. Über die Portalvene wird die Leber aus dem Gastrointestinaltrakt mit Nährstoffen versorgt und ist für deren Metabolisierung, Speicherung und Verteilung im Körper zuständig. Daneben ist die Leber außerdem von zentraler Bedeutung für die Immunabwehr von Bakterien und potentiell schädlichen Makromolekülen [13,16]. Im Parenchym der Leber werden 5 unterschiedliche ortsständige Zelltypen beschrieben: Hepatozyten, Endothelzellen, Ito-Zellen, Pit-Zellen (ortsständige Lymphozyten) und Kupffer Zellen, wobei die Hepatozyten etwa 60% aller Leberzellen ausmachen [16]. Zu den wichtigsten Funktionen der Hepatozyten gehören unter anderem die Harnstoff- und Gallensäureproduktion, sowie die hormonell gesteuerte Glukoneogenese bzw. Glykogenolyse und die Metabolisierung potentiell schädlicher Substanzen, um deren Ausscheidung über die Galle zu ermöglichen [16]. Weiterhin sind die Hepatozyten die wichtigsten Produzenten von Plasma Proteinen, wie z.B. Albumin, aber auch von akute Phase Proteinen. So wird während einer Infektion das Leberparenchym durch

TNF-Alpha, IL-1 und IL-6 zur Produktion von CRP, Serum Amyloid A und P, *Lipopolysaccharid-binding-protein* (LBP), Haptoglobin, verschiedener Proteinase Inhibitoren u. A. angeregt. Dabei kann die Expression, z.B. im Falle des CRP, auf das bis zu 1000-fache gesteigert werden [15,16,75].

Endothelzellen machen etwa 19% aller Leberzellen aus. Sie besitzen schlanke und fenestrierte Fortsätze, welche ihnen einen engen Kontakt zum die Leber durchströmenden Blut erlauben. Sie sind als Bestandteil des retikuloendothelialen Systems in der Lage, lösliche Plasmakomponenten zu endozytieren und exprimieren während einer Immunreaktion vermehrt Zytokine [14].

Fettspeicherzellen (Ito-Zellen) enthalten Vitamin A-reiche Fettvakuolen in ihrem Zytoplasma und sind unter anderem auch für die Synthese von extrazellulären Matrixproteinen verantwortlich [16].

Pit-Zellen sind in den Lebersinusoiden zu finden und steuern die Aktivität der natürlichen Killerzellen [16].

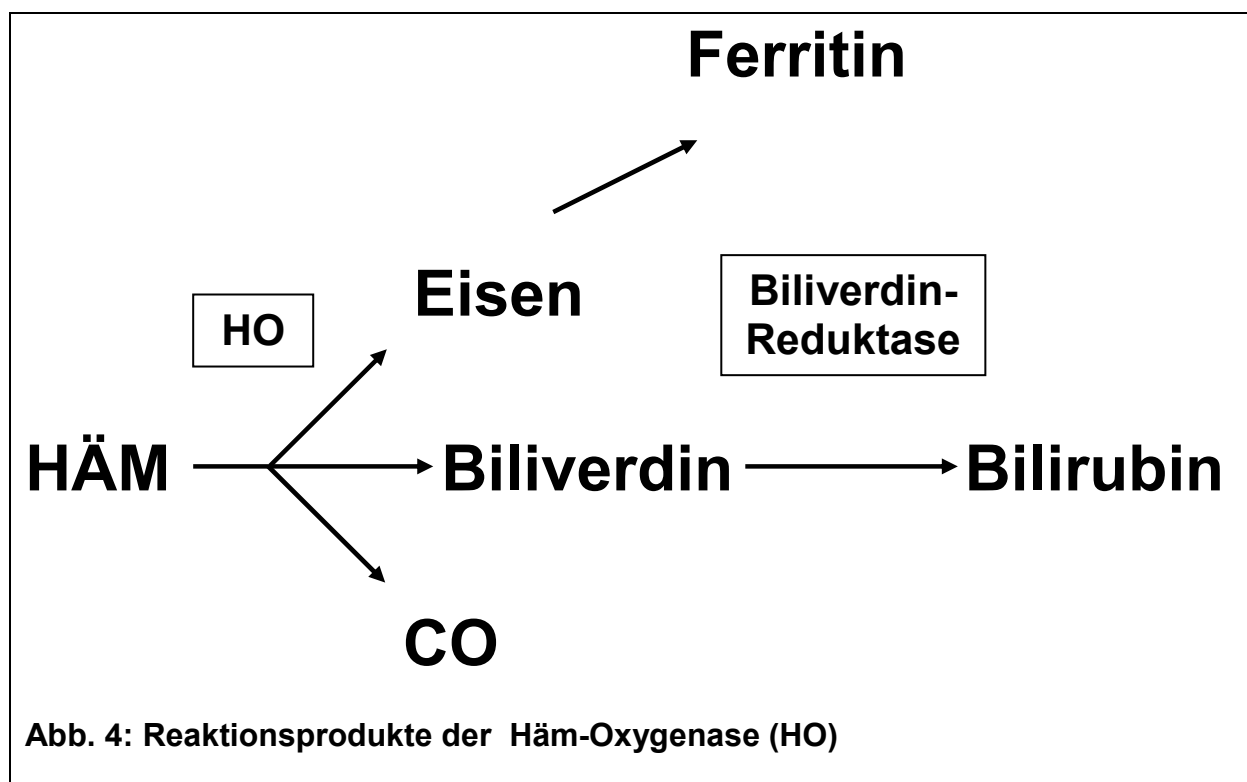
Kupffer Zellen sind die ortständigen Makrophagen der Leber und machen etwa 15% aller Leberzellen aus. Sie entfernen jegliche Art von nicht mehr für den Stoffwechsel notwendigem Material aus dem Blutkreislauf (Immunkomplexe, alte Erythrozyten, Tumorzellen usw.) und spielen eine wichtige Rolle in der Immunabwehr. So können sie zum einen gram-negative Bakterien und ihre Zellwandbestandteile (LPS) aus dem Blut entfernen und zum anderen im Zuge der Immunantwort pro-inflammatorische Mediatoren produzieren [13,15]. Klein et. al. konnten durch Versuche mit radioaktiv markiertem LPS zeigen, dass 5 Minuten nach Injektion in die V. femoralis von Ratten 80% des LPS bereits von Leberzellen aufgenommen worden war. Der Rest fand sich in Lungen, Nieren und dem Blut [13]. Das LPS wird in der Leber von Kupffer-Zellen aufgenommen und verarbeitet, wobei verschiedene Untersucher herausgefunden haben, dass eine Präferenz von nativem LPS zu Kupffer Zellen und von durch Kupffer Zellen verändertem LPS zu Leberparenchymzellen besteht [76,77].

Beachtet man die Tatsache, dass tagtäglich Bakterien und ihre Wandbestandteile über die Darmmukosa in den portalvenösen Kreislauf eindringen, so erscheint es logisch, dass die Leber unter anderem aufgrund ihrer Lage im Blutkreislauf eine wichtige Clearingfunktion gegenüber LPS einnimmt [78,79]. In der Tat haben Untersuchungen gezeigt, dass LPS und LPS-Metabolite sowohl in der Galle als auch im Stuhl zu finden sind [80,81].

Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass die Leber eine wichtige Rolle in der Immunantwort auf eindringende Mikroorganismen und ihre Metabolite einnimmt und außerdem einen großen Anteil an der Produktion von akute Phase Proteinen hat.

1.4 Häm-Oxygenase-1

Die Häm-Oxygenase (HO / Hsp-32) katalysiert den geschwindigkeits-bestimmenden Schritt des Abbaus von Häm, wobei Biliverdin, Eisen und CO freigesetzt werden. Biliverdin wird sofort durch die Biliverdin-Reduktase zu Bilirubin umgesetzt und Eisen wird umgehend durch Ferritin aufgenommen [82], so dass letztendlich durch die Funktion der Häm-Oxygenase vermehrt Bilirubin, Ferritin und CO entstehen. Bilirubin [22], Ferritin [17] und CO [19] besitzen antioxidative Eigenschaften und sind in der Lage, Gewebe vor Schäden durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) zu schützen.



Bis heute sind drei Isoenzyme (HO-1, -2 und -3) beschrieben, die von jeweils verschiedenen Genen kodiert werden [83]. HO-2 und HO-3 werden konstitutiv exprimiert, wohingegen HO-1 neben seinem natürlichen Substrat Häm durch verschiedene Auslöser wie Glutathionmangel [84], Ischämie-Reperfusion [85], Hypoxie [86], Endotoxämie [87] und verschiedene andere induzierbar ist.

Die Häm-Oxygenase wurde zum ersten Mal im Jahr 1964 beschrieben, als Wise et. al. den in vitro Abbau von Häm zu Biliverdin zeigten [88]. Bis in die späten 80er Jahre war das Protein relativ wenig beachtet, dann aber wurde die induzierbare Form der HO entdeckt (=HO-1) [89]. Kurze Zeit später konnte gezeigt werden, dass HO-1 identisch ist mit dem Hitzeschock Protein 32 (Hsp32), welches bereits im Hitzeschockmodell an der Ratte beschrieben wurde [90].

In der Leber der Ratte wird HO-2 in allen Leberzellen konsekutiv exprimiert, wohingegen HO-1 im Ruhezustand auf die Kupffer Zellen beschränkt zu sein scheint, unter Stress hingegen wird auch von Leberparenchymzellen HO-1 exprimiert [91].

Die basale Expression von HO-1 ist in den Makrophagen der Leber und der Milz höher als in den Monozyten der peripheren Zirkulation. Dieses deutet auf die besondere Rolle der ortsständigen Makrophagen dieser beiden Organe in der Entfernung von überalterten Erythrozyten und immunogenem Material hin [92].

Versuche mit HO-1 defizienten Mäusen demonstrierten, dass bei diesen Tieren eine erhöhte Anfälligkeit gegen oxidativen Stress besteht [20]. Umgekehrt zeigte sich nach Gentransfer von HO-1 Genen in Endothelzellen eine erhöhte Resistenz gegen oxidativen Stress [21].

Allgemein scheint also die induzierbare HO-1, bzw. durch sie entstehend Bilirubin, Ferritin und CO, eine wichtige Rolle im Schutz des Organismus vor oxidativem Stress zu spielen.

2 Ergebnisse

Teil 1: HO-1 Expression im Zeitverlauf nach LPS Gabe

Abb. 5 zeigt die densitometrische Auswertung der mittels Western Blot bestimmten Menge an HO-1 in den Lebern der Versuchstiere, jeweils zu einem definierten Zeitpunkt nach Applikation von 1 mg / kg KG LPS. Um eine bessere Vergleichbarkeit der Messwerte zu erhalten, wurde ein Abgleich mit der in den Proben enthaltenen Menge an β -Aktin durchgeführt.

Es ist ein deutlicher Anstieg der HO-1 Proteinmenge im 24h Zeitverlauf zu beobachten.

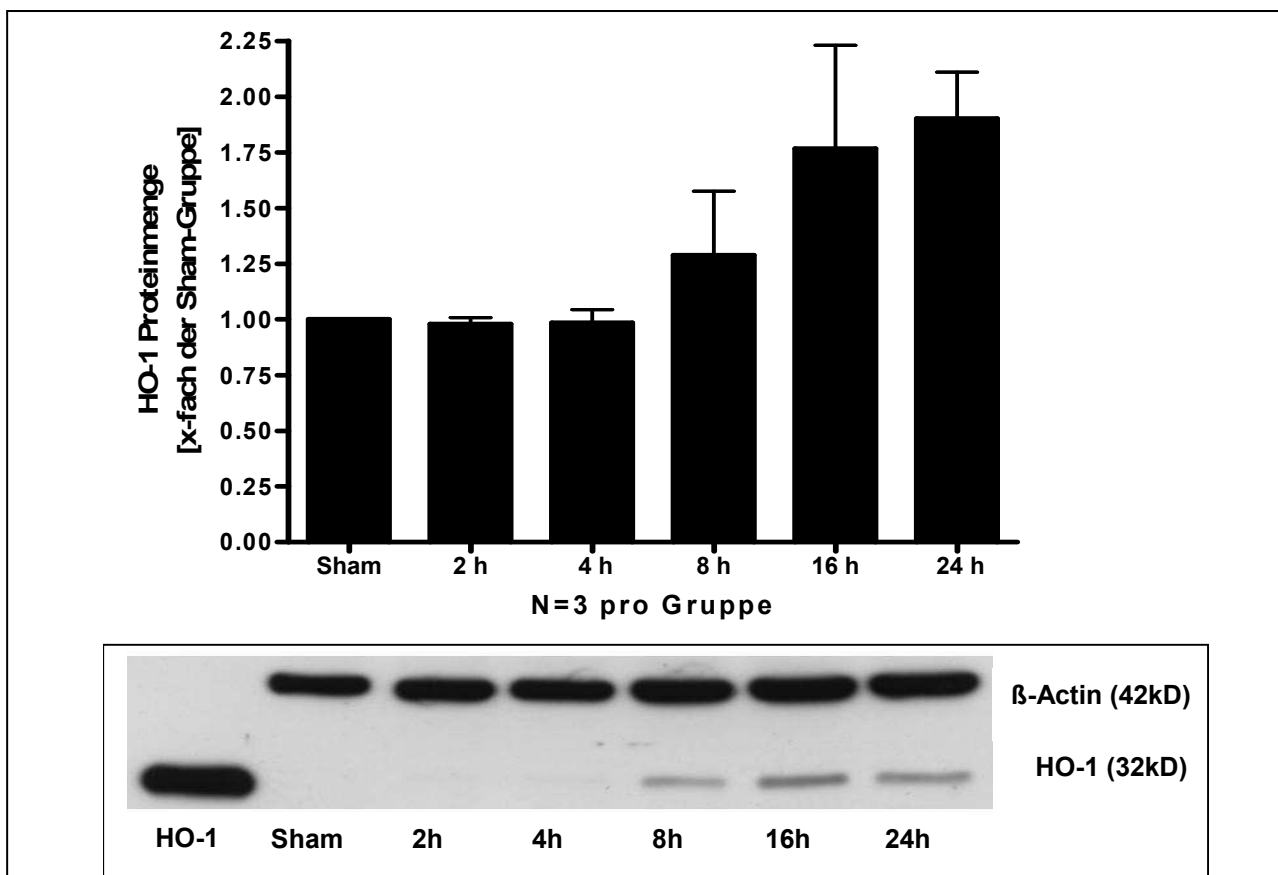


Abb. 5: HO-1 Proteinmenge in der Leber im 24 Stunden Zeitverlauf

Oben im Bild findet sich die densitometrisch bestimmte Menge an HO-1 in den Lebern der Versuchstiere zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten, jeweils dargestellt als x-faches der Menge an HO-1 in der Sham Gruppe. Es zeigt sich ein deutlicher Anstieg der HO-1 Menge im 24h Zeitverlauf. Unten im Bild findet sich ein Ausschnitt aus einem repräsentativen Western Blot mit den Banden für β -Aktin und HO-1 der Versuchstiere, sowie einem HO-1 Standard zur sicheren Identifizierung der HO-1 Banden.

Teil 2: Vorbehandlung und LPS-Schock

Mittlerer arterieller Blutdruck während des LPS-Schocks

Im weiteren Verlauf der Untersuchungen folgten die Versuche zur LPS-Toleranz. Die genauen Versuchsabläufe sind auf Seite 48 ff. beschrieben. Abb. 6 zeigt die mittleren arteriellen Blutdruckwerte der verschiedenen Versuchsgruppen im Verlauf des 6 Stunden dauernden LPS-Schocks. Es zeigt sich in allen betrachteten Gruppen ein initialer Abfall des mittleren arteriellen Blutdrucks, auf dessen Gründe an anderer Stelle genauer eingegangen wird. Obwohl der mittlere arterielle Blutdruck in allen Gruppen absinkt, ist erkennbar, dass in der lediglich mit Kochsalzlösung vorbehandelten Gruppe (NaCl_LPS) ein signifikant stärkerer Abfall zu verzeichnen ist, als in den anderen Gruppen.

Nach einer kurzen Phase der Erholung, in der keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen erkennbar sind, kommt es ab der dritten Stunde des Versuchsablaufs zu einer kontinuierlichen und signifikanten Verschlechterung des mittleren arteriellen Blutdrucks in der mit Kochsalzlösung vorbehandelten Gruppe (NaCl_LPS) im Vergleich zur Kontrollgruppe (NaCl) und der Gruppe mit LPS Vorbehandlung (LPS_LPS).

Die mit LPS vorbehandelte Gruppe weicht mit ihrem mittleren arteriellen Blutdruck zu keinem Zeitpunkt des Versuches signifikant von der Kontrollgruppe ab.

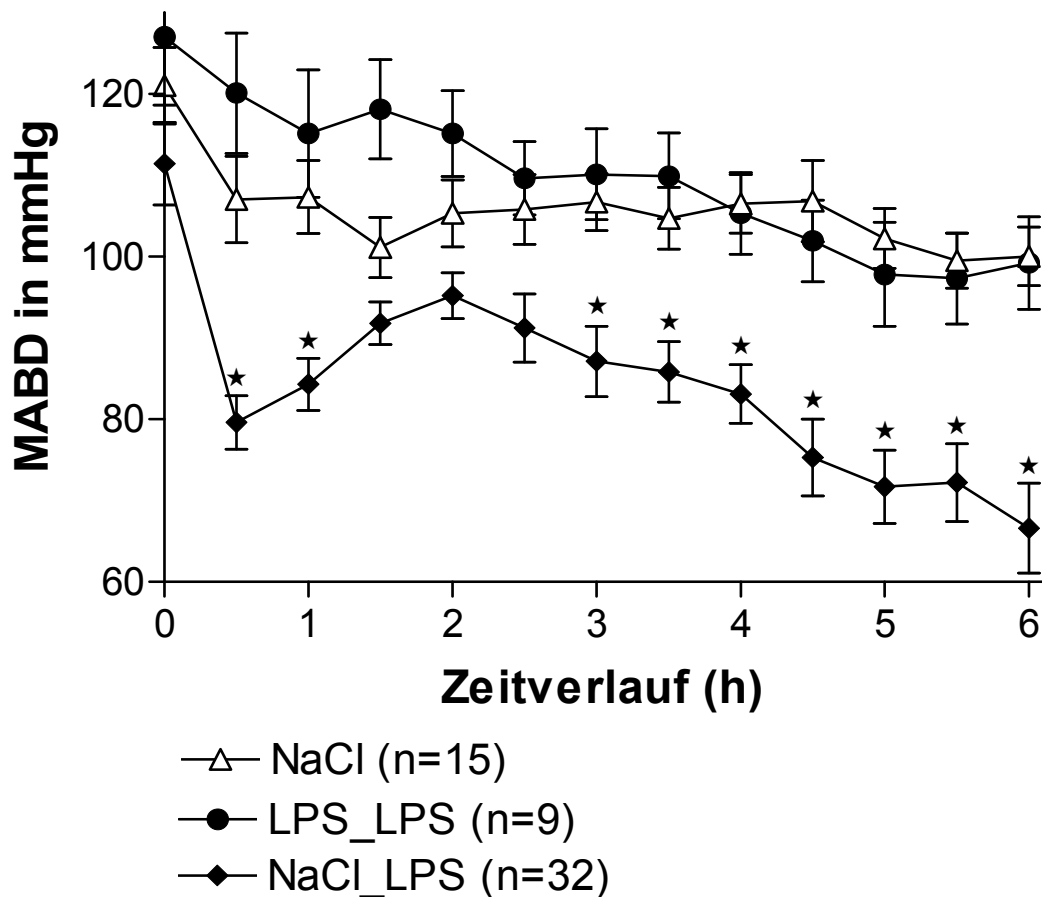


Abb. 6: Mittlerer arterieller Blutdruck im Zeitverlauf des LPS-Schocks

Dargestellt sind die kontinuierlich aufgezeichneten mittleren arteriellen Blutdruckwerte der Versuchstiere während des 6-stündigen LPS-Schocks. Zu erkennen sind sowohl ein initialer Abfall des mittleren arteriellen Blutdrucks in allen 3 Gruppen, der in der nur mit Kochsalzlösung vorbehandelten Gruppe (NaCl_LPS) signifikant deutlicher ausfällt als in den beiden anderen Gruppen, als auch ein signifikantes Absinken des mittleren arteriellen Blutdrucks in dieser Gruppe (NaCl_LPS) ab der dritten Stunde des Schockverlaufes im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen. Zwischen der mit LPS vorbehandelten Gruppe (LPS_LPS) und der Kontrollgruppe (NaCl) gibt es keinen signifikanten Unterschied.

Bei der Sham-Gruppe wurde wie in der Versuchsanordnung beschrieben keine kontinuierliche Blutdruckmessung durchgeführt, es erfolgte 24 Stunden nach der Vorbehandlung mit NaCl eine unmittelbare Blut- und Organentnahme.

Die unterschiedlichen Gruppengrößen lassen sich unter anderem durch während der Vorbereitung verstorbene Tiere und Probleme im Rahmen der Kanülierung bzw. der kontinuierlichen Blutdruckaufzeichnung während der 6 Stunden Schockphase erklären.

★ = $p < 0,05$ vs. NaCl und LPS_LPS (jeweils gleiche Messzeitpunkte)

Transaminasenkonzentration nach Ablauf des LPS-Schocks

Nach Ablauf der 6 Stunden dauernden Schockphase wurde das Blut der Tiere entnommen und es wurden die Transaminasen (ALT + AST) im Serum bestimmt (Abb.7 + Abb.8).

Es zeigt sich eine signifikante Erhöhung der Transaminasen im Serum der Tiere, die einem LPS Schock ausgesetzt waren (NaCl_LPS + LPS_LPS). Diese Erhöhung zeigt sich sowohl im Vergleich zu reinen Kontrolltieren, die keinerlei Eingriffen ausgesetzt waren (Sham), als auch im Vergleich zu Tieren, die exakt der gleichen Instrumentierung unterworfen waren wie die Schock-Tiere, mit dem Unterschied, dass lediglich Kochsalz appliziert wurde (NaCl).

Vergleicht man die beiden Gruppen, die einem LPS-Schock ausgesetzt waren, so zeigt sich, dass in der Gruppe der mit LPS vorbehandelten Tiere (LPS_LPS) eine signifikante Reduktion des Transaminasenanstieges zu verzeichnen ist, im Vergleich zu der Gruppe die Kochsalzlösung als Vorbehandlung erhielt (NaCl_LPS).

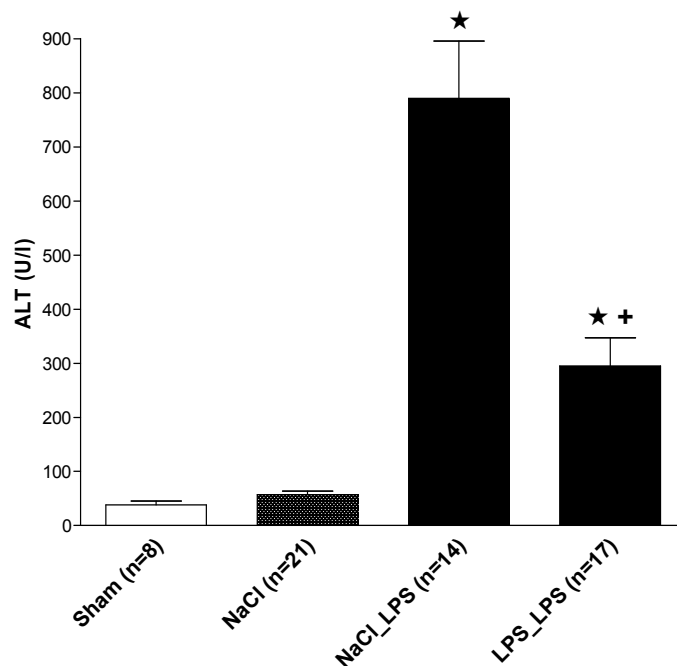


Abb. 7: ALT (GPT) Konzentration nach Ablauf des LPS-Schocks

Dargestellt ist die ALT (GPT) Konzentration der Versuchstiere nach der 6-stündigen Schockphase. Die ALT-Konzentration im Blut der Tiere, die einem LPS-Schock ausgesetzt waren (NaCl_LPS + LPS_LPS) ist signifikant höher als die der Kontrollgruppen. Im Vergleich der beiden LPS-Schock Gruppen ist jedoch in der mit LPS vorbehandelten Gruppe (LPS_LPS) eine signifikante Reduktion des Anstieges zu beobachten. ★ = $p < 0,05$ vs. NaCl + Sham, + = $p < 0,05$ vs. NaCl_LPS

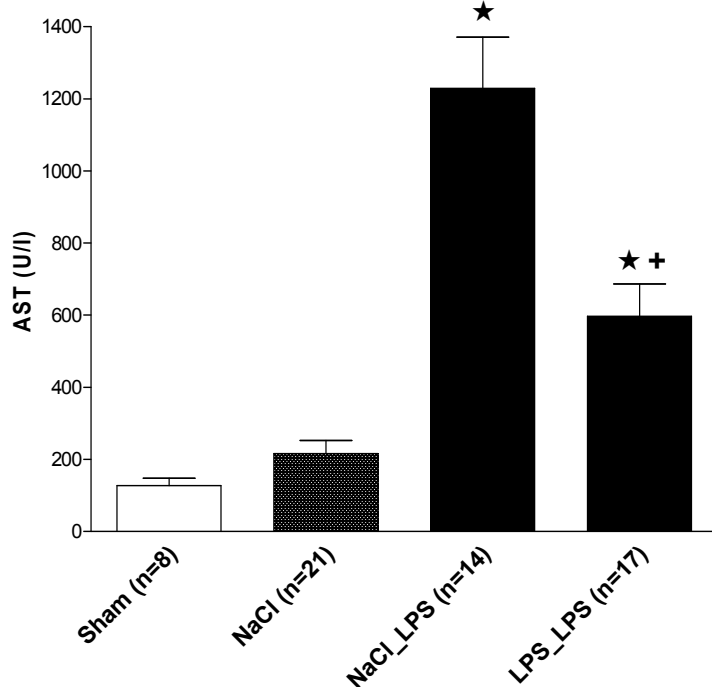


Abb. 8: AST (GOT) im Serum nach LPS-Schock mit/ohne LPS Vorbehandlung

Es zeigen sich analoge Ergebnisse zu den ALT Messungen, mit signifikant geringerer AST Erhöhung in der mit LPS vorbehandelten Gruppe (LPS_LPS).

★ = $p < 0,05$ vs. NaCl + Sham, + = $p < 0,05$ vs. NaCl_LPS

Unterschiede der Gruppengröße der Abbildungen 7 + 8 im Vergleich zu Abb. 6 beruhen auf Problemen im Rahmen von Kanülierung und Blutdruckaufzeichnung bzw. der dann folgenden Blutentnahme (z.B. Hämolyse).

HO-1 Proteinmenge nach LPS-Schock

Abb. 9 zeigt die densitometrische Auswertung der mittels Western Blot bestimmten Menge an HO-1 Protein in den Lebern der Versuchstiere, die dem auf Seite 48 ff. beschriebenen Modell eines LPS-Schocks ausgesetzt wurden, im Vergleich zu einer Kochsalz-Kontrollgruppe. Es zeigt sich eine signifikante Erhöhung der HO-1 Proteinmenge in der mit LPS vorbehandelten Gruppe (LPS_LPS) im Vergleich zur Kontrollgruppe (NaCl) und im Vergleich zu der Gruppe, die nur mit Kochsalzlösung vorbehandelt wurde (NaCl_LPS). Die beiden letztgenannten Gruppen zeigen keine signifikanten Unterschiede. Insgesamt ist also festzuhalten, dass eine Vorbehandlung mit 1 mg / kg KG LPS 24h vor einem 6 Stunden dauernden LPS-Schock zu einer signifikanten Erhöhung der HO-1 Proteinmenge in der Leber führt.

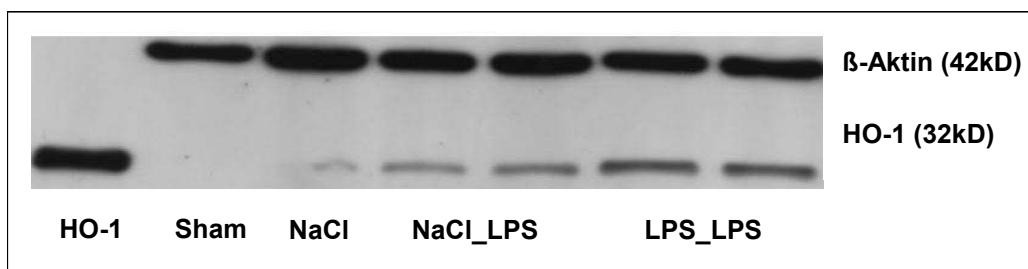
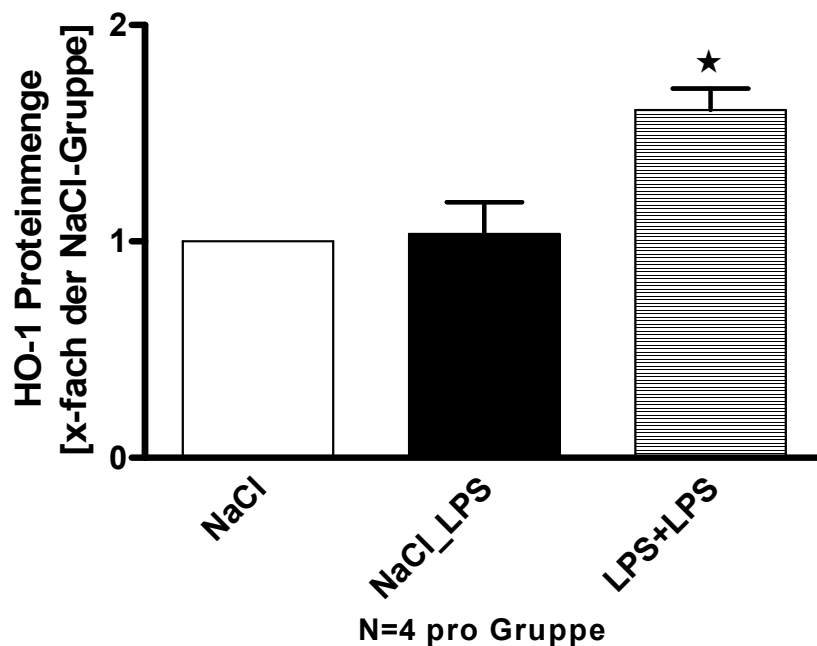


Abb. 9:

HO-1 Proteinmenge der Leber nach LPS-Schock mit/ohne LPS Vorbehandlung

Oben im Bild findet sich die densitometrisch bestimmte HO-1 Proteinmenge in den Lebern der Versuchstiere nach Ablauf einer 6-stündigen LPS-Schockphase, in diesem Fall dargestellt als x-faches der Menge an HO-1 in der NaCl Gruppe, da sich in den Lebern der Tiere der Sham-Gruppe lediglich minimalste HO-1 Mengen detektieren ließen und somit auch kleinste Verunreinigungen signifikanten Einfluß auf das Ergebnis nehmen könnten.

Die Lebern der Tiere in der mit LPS vorbehandelten Gruppe (LPS_LPS) enthalten eine signifikant größere Menge HO-1 als diejenigen der Kontrollgruppe (NaCl) und der nur mit Kochsalzlösung vorbehandelten Gruppe (NaCl_LPS), welche sich in ihrer HO-1 Menge nicht signifikant unterscheiden. Unten im Bild findet sich ein Ausschnitt aus einem repräsentativen Western Blot mit den Banden für β-Aktin und HO-1 der Versuchstiere, sowie einem HO-1 Standard zur sicheren Identifizierung der HO-1 Banden.

★ = $p < 0,05$ vs. NaCl + NaCl_LPS

3 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Vorbehandlung mit einer subletalen LPS Dosis die Leber vor den Folgen eines nachgeschalteten Schocks durch hochdosierte Gabe von LPS schützt. Außerdem finden sich Hinweise darauf, dass die HO-1 eine Rolle in dieser durch LPS Vorbehandlung vermittelten Organprotektion der Leber spielen könnte.

Bevor die Versuche zur LPS-Toleranz und einer möglichen Rolle der HO-1 durchgeführt wurden, erfolgte die Untersuchung der HO-1 Expression in der Leber in einem Zeitfenster von 24 Stunden nach Gabe von niedrig dosiertem LPS. Ziel war es, den Zeitpunkt für eine mögliche maximale Protektion durch HO-1, ablesbar an der maximalen Enzymexpression, zu ermitteln. Dieser Zeitpunkt (24h nach Vorbehandlung) wurde daraufhin gewählt, um den nachgeschalteten gram-negativen Schock auszulösen.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse dieses Versuchsteils zeigt sich eine klar ablesbare Tendenz im Anstieg der HO-1 Proteinmenge, signifikante Ergebnisse konnten allerdings nicht nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung für dieses Resultat kann in der kleinen Gruppengröße (n=3 Tiere/Gruppe) gesehen werden.

In der Literatur finden sich verschiedene Arbeiten, die in ähnlicher Weise die Veränderung der HO-1 Expression in der Leber untersuchen und zu vergleichbaren Ergebnissen bezüglich der zeitlich-dynamischen Darstellung von Proteinsynthese und -freisetzung kommen. Yong Song et al. konnten an C57/BL6 Mäusen, die mit 0,5 mg / kg KG LPS behandelt wurden, eine signifikante Erhöhung der HO-1 Proteinmenge in der Leber 24 Stunden nach LPS Gabe beobachten [93]. In einer Arbeit von Bauer et al. konnte außerdem in der Leber von Ratten nach Applikation von 1 mg / kg KG LPS eine signifikante Erhöhung sowohl der HO-1 mRNA als auch der HO-1 Proteinmenge zu den Messzeitpunkten 6 Stunden und 12 Stunden beobachtet werden, wobei keine Daten über spätere Zeitpunkte vorliegen [94].

Die oben dargestellten Ergebnisse unserer Vorversuche führten im Kontext mit den Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen dazu, dass der Zeitpunkt der LPS Vorbehandlung 24 Stunden vor Einleitung eines LPS vermittelten Schocks gewählt wurde, um eine maximale Expression der HO-1 für eine mögliche Protektion ausnutzen zu können.

Bei den folgenden Versuchen sollte nun untersucht werden, ob durch LPS-Vorbehandlung eine Stabilisierung der Kreislauffunktion, gemessen am mittleren arteriellen Blutdruck und eine Organprotektion der Leber, gemessen an ALT und AST im Serum, bei Auslösen eines LPS-Schocks zu erreichen ist und welche Rolle die HO-1 in diesem Modell spielen könnte.

Es wurde daher eine LPS-Vorbehandlung mit 1 mg / kg KG 24 Stunden vor Auslösen eines LPS-Schocks durchgeführt. Bei der Auswertung der kontinuierlich aufgezeichneten Kreislaufdaten der Tiere zeigte sich, dass durch diese Vorbehandlung eine signifikante Verbesserung der Kreislauffunktion im Verlauf des LPS-Schocks, gemessen am mittleren arteriellen Blutdruck der Tiere, zu erreichen ist. Die vorbehandelten Tiere weichen in ihrem mittleren arteriellen Blutdruck im Schockverlauf nicht signifikant von der Kontrollgruppe ab, wohingegen es in der nicht vorbehandelten Gruppe zu einem signifikanten Abfall des mittleren arteriellen Blutdrucks gegenüber den anderen Gruppen kommt.

Bei der Auswertung ist außerdem ein starker initialer Abfall des mittleren arteriellen Blutdrucks in allen drei Versuchsgruppen zu erkennen. Eine mögliche Erklärung dafür wäre eine direkte Wirkung des LPS an der endothelialen NO-Synthetase (eNOS) welche zu einer Ausschüttung von vasodilatatorisch wirksamem NO führt. Ein ähnlicher Effekt der schnellen Vasodilatation durch direkte Bindung an die eNOS wird z.B. von Cowels et al. im Zuge der anaphylaktischen Reaktion beschrieben [95] und könnte in vergleichbarer Art und Weise auch im Zuge der LPS Applikation stattfinden. Auch dieser initiale Abfall des mittleren arteriellen Blutdrucks fällt in der vorbehandelten Gruppe signifikant geringer aus, als in der nicht vorbehandelten Gruppe.

Die hier vorgestellten Untersuchungen zeigen also, dass die Vorbehandlung mit 1 mg / kg KG LPS einen Abfall des mittleren arteriellen Blutdrucks im Verlauf eines durch Gabe von hochdosiertem LPS ausgelösten Schocks verhindern kann, wohingegen Tiere die unvorbereitet einem solchen Schock unterworfen werden einen signifikanten Abfall des mittleren arteriellen Blutdrucks erleiden.

Um die Leberschädigung der Tiere durch den LPS-Schock zu quantifizieren, wurden die Transaminasen ALT und AST im Serum der Tiere bestimmt, ein Verfahren, das auch in zahlreichen anderen Tiermodellen zur Beantwortung ähnlicher Fragestellungen breite Anwendung findet [96,97]. In unserer Untersuchung konnte gezeigt werden, dass eine Vorbehandlung mit 1 mg / kg KG LPS, 24 Stunden vor

einem LPS-Schock, zu einer Protektion der Leber führt, erkennbar an einem signifikant geringeren Anstieg der Transaminasen ALT und AST im Serum.

Dieses Prinzip der Organprotektion durch LPS Vorbehandlung ist hierbei nicht neu. So haben Zuckerman et al. gezeigt, dass Ratten durch eine LPS Vorbehandlung eine potentiell tödliche LPS Dosis überleben [12].

Die genauen Mechanismen dieser durch LPS Vorbehandlung vermittelten Protektion waren in den letzten Jahren Gegenstand intensiver Forschung, sind aber bis heute nur in Teilen aufgeschlüsselt.

Einen möglichen Erklärungsansatz für die beobachtete Protektion bietet die Modulation der Zytokinfreisetzung von TNF- α , die heute als zumindest mitverantwortlich für die protektiven Effekte der LPS-Vorbehandlung angesehen wird [12]. Dies erscheint plausibel, da die Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen wie TNF- α zu einer Hochregulation der Immunantwort mit peripherer Vasodilatation, Fieber, Gerinnungsstörungen und Organschäden durch Aktivierung von PMN führen kann [4,67,68]. Eine Reduktion dieser entzündungsfördernden Faktoren erscheint daher geeignet, einen protektiven Effekt zu vermitteln. Allerdings ist es unwahrscheinlich, dass allein die Reduktion der Zytokinliberation den Effekt der Endotoxin-Toleranz verantwortet. So kommt es zwar zu einer Reduktion von TNF- α , allerdings gleichzeitig auch zu einer Steigerung von anderen pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-1 β [12]. Des Weiteren konnten Lehner et al. zeigen, dass trotz einer verminderten Zytokinantwort nach LPS Vorbehandlung die Resistenz gegen Infektionen durch gram-negative Keime paradoxerweise erhöht war [11]. Auch in vitro Versuche an Phagozyten zeigten eine erhöhte Produktion von Superoxid-Anionen und eine verbesserte Phagozytose nach Vorbehandlung mit LPS, trotz erniedrigter TNF- α Expression [98].

Interessanterweise wird das Phänomen einer Immun-Toleranz nicht ausschließlich durch eine Vorbehandlung mit niedrig dosiertem LPS ausgelöst. Als alternative Stimuli wurden unter anderem Lipoteichonsäure (LTA) als Wandbestandteil gram-positiver Bakterien [99], Ischämie [100], TNF- α [101] und chirurgischer Stress [102] beschrieben. Es ist also zu vermuten, dass die inflammatorische "Downregulation" trotz unterschiedlicher vorgeschalteter Stimuli Gemeinsamkeiten in der Endstrecke aufweist. Die genauen Zusammenhänge sind aber trotz intensiver Forschung bis heute nicht vollständig aufgeklärt.

Es stellt sich daher die Frage, ob die HO-1, welche in zahlreichen Modellen von Ischämie/Reperfusion und Sepsis eine Organprotektion vermittelt [85,103,104], auch eine zentrale Rolle in der LPS-vermittelten Endotoxin Toleranz spielen könnte.

Um dieser Frage nachzugehen, wurde zusätzlich in den Lebern der Versuchstiere, die einem LPS-Schock unterworfen waren, die HO-1 Expression untersucht. Es zeigt sich, dass in der mit LPS vorbehandelten Gruppe eine signifikante Erhöhung der HO-1 Proteinmenge gegenüber der Kontrollgruppe und auch gegenüber der Gruppe, welche einem unvorbereiteten gram-negativen Schock unterworfen wurde, zu beobachten ist. Die Gruppe, die ohne Vorbehandlung einem Schock ausgesetzt wurde, zeigt keine signifikante Erhöhung der HO-1 Proteinmenge gegenüber der Kontrollgruppe.

HO-1 wird also nach Vorbehandlung mit niedrig dosiertem LPS in der Leber vermehrt gebildet und korreliert hierbei zum einen mit einer Verbesserung der Kreislaufparameter während der folgenden 6 Stunden dauernden Schockphase und zum anderen mit einer Verminderung der Leberschäden, gemessen an den Serumspiegeln von ALT und AST. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass HO-1 an der Vermittlung der Leberprotektion während der LPS Toleranz beteiligt sein könnte.

Die Vermutung, dass die erhöhte HO-1 Expression in unserem Versuchsmodell die Leber vor Schädigung schützt, wird durch eine Reihe von Arbeiten untermauert, die eine Beteiligung von HO-1 an einem Schutz vor LPS und den schädlichen Auswirkungen von pro-inflammatorischen Zytokinen und oxidativem Stress beschreiben. So führt eine pharmakologische Inhibierung der HO-1 im Modell der Ratte zu einer erhöhten Sterblichkeit nach Applikation von LPS [18]. Auch Versuche an HO-1 defizienten Mäusen zeigen eine verringerte Fähigkeit der Tiere, sich gegen oxidativen Stress zu schützen und auch in dieser Arbeit wird eine erhöhte Sterblichkeit nach LPS Gabe beobachtet [20]. Umgekehrt führt der Gentransfer von HO-1 in Endothelzellen zu einer Protektion gegen oxidativen Stress [21].

Taille et al. zeigten in Versuchen mit Ratten, dass die Applikation von LPS zu einer Induktion der HO-1 Produktion in der Atemmuskulatur führt und dass eine Inhibierung eben dieser HO-1 Produktion eine Verstärkung des oxidativen Stresses in der Muskulatur und der kontraktilen Dysfunktion nach sich zieht [105].

Der erste bisher beschriebene Fall von humaner HO-1 Defizienz zeigte trotz einer normalen HO-2 Aktivität eine Vielzahl von Symptomen, wie z.B. hämolytische

Anämie, Endothelschäden und schwerwiegende Wachstumsschäden. In einer kultivierten Zelllinie des Patienten wurde eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber oxidativem Stress festgestellt [106].

Der protektive Effekt der HO-1 scheint dabei zu einem großen Teil durch ihre Reaktionsprodukte vermittelt zu werden. Wie bereits in Kapitel 1 beschrieben, entstehen durch die Aktivität der HO-1 vermehrt CO, Bilirubin und Ferritin [82]. Diese Metabolite besitzen allesamt antioxidative Eigenschaften und sind in der Lage eine Protektion gegen verschiedene Arten der Gewebeschädigung zu vermitteln [17,19,22].

Bezogen auf eine Organprotektion in der Leber konnte in Versuchen gezeigt werden, dass in Mäusen, die nach vorhergehender Behandlung mit dem hepatozyten-spezifischen Transkriptionsinhibitor D-Galaktosamin (GalN) einer LPS Dosis ausgesetzt wurden, durch die Gabe des HO-1 Induktors CoPP (Cobalt-Protoporphyrin IX) eine Protektion der Leber und ein verbessertes Überleben erreicht werden konnte [107]. Die genannte Studie demonstriert, dass es durch das Zusammenwirken von CO und Biliverdin zu einer signifikanten Reduktion von TNF-Alpha und Interferon (INF)-Gamma kommt, welche zumindest teilweise für den beobachteten protektiven Effekt verantwortlich gemacht wird. Ein ähnlicher Effekt der Protektion durch eine Reduktion der TNF Menge wird auch im Modell der LPS Vorbehandlung beschrieben [12]. TNF scheint außerdem eine Rolle in der Induktion der HO-1 durch LPS inne zu haben. So wurde beobachtet, dass TNF defiziente Mäuse signifikant weniger HO-1 produzieren als normale C57/BL6 Mäuse, wenn beide der gleichen Menge LPS ausgesetzt sind [93]. Es werden aber sicherlich weitere Untersuchungen benötigt, um den genauen Zusammenhang der TNF Expression und der durch HO-1 vermittelten Organprotektion zu klären.

Eine weitere Möglichkeit wie HO-1 organprotektiv wirken könnte, ist über die in dieser Untersuchung zu beobachtende Stabilisierung der Hämodynamik. Der geringere Abfall des mittleren arteriellen Blutdrucks im Verlauf der LPS-Schock Phase könnte über eine verbesserte Organperfusion zu verminderten Organschäden führen. Eine mögliche Erklärung für die verbesserte Hämodynamik liegt in einer Veränderung der Aktivität von sowohl induzierbarer NO-Synthetase (iNOS) als auch eNOS. Wie oben bereits erläutert, kommt es nach Bindung von LPS an eNOS und iNOS zu einer vermehrten Ausschüttung von NO und somit zu einer Vasodilatation [95,108]. Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, dass erhöhte Spiegel von

HO-1 zu einer Reduzierung der Aktivität der iNOS führen können, wohingegen die Aktivität der eNOS häufig gesteigert wird [95,108]. Dies könnte ein möglicher Effekt sein über den ein Abfall des mittleren arteriellen Blutdrucks im vorliegenden Versuch reduziert wird. Pannen et al. und auch andere haben gezeigt, dass eine pharmakologische Inhibition der HO-1 und dadurch verminderte Spiegel von CO zu einer Verminderung der Sinusoidalperfusion in der Leber führen [19,109]. CO scheint dabei der wichtigste Mediator zu sein, der vasodilatatorische Effekt von NO scheint zumindest bezogen auf die Leberperfusion weitaus geringer zu sein [19].

Es wäre also ein synergistischer Effekt denkbar, bei dem über eine Inhibition der iNOS ein verbesserter systemischer mittlerer arterieller Blutdruck erzielt wird, bei gleichzeitiger Verbesserung der Sinusoidalperfusion durch von der HO-1 gebildetes CO. Ob der genannte Effekt wirklich vorliegt, oder ob die Verbesserung des mittleren arteriellen Blutdrucks die in der vorliegenden Untersuchung zu beobachten ist auf bisher unbekanntem Mechanismen der LPS-Vorbehandlung beruhen, ist mit den vorliegenden Daten nicht eindeutig zu klären und könnte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Ebenfalls in unserer Arbeitsgruppe wurden intensiv die Effekte von HO-1 und iNOS im Rahmen der LPS-Toleranz in der Lunge von Ratten untersucht. Es wurde auch in diesem Modell gezeigt, dass die Vorbehandlung mit LPS zum einen zu einer Verringerung der Lungenschäden in einem folgenden LPS-Schock führt und zum anderen eine signifikante Steigerung der Expression von HO-1 induziert. Außerdem wurde in dieser Arbeit nachgewiesen, dass der spezifische HO-1 Inhibitor SnPPiX zu einer nahezu vollständigen Blockierung des protektiven Effektes der LPS-Vorbehandlung führt. Dadurch wird die zentrale Rolle von HO-1 im Rahmen der Protektion weiter verdeutlicht [110].

Genauer betrachtet wurde auch die Rolle der iNOS und darauf folgend ihres Reaktionsproduktes NO. Obwohl NO durch Vasodilatation zu Hypotension und Organschäden führen kann, wurde gezeigt, dass durch LPS Vorbehandlung vermehrt iNOS exprimiert wird und darüber auch eine vermehrte Expression von HO-1 stattfindet. Durch eine Blockade der iNOS mittels des spezifischen Inhibitors 1400-W wird zum einen signifikant weniger HO-1 in der Lunge produziert und zum anderen wird der protektive Effekt der LPS-Vorbehandlung nahezu aufgehoben. Auch konnte gezeigt werden, dass iNOS knock-out Mäuse keine LPS-Toleranz nach Vorbehandlung mit niedrig dosiertem LPS ausbilden. HO-1 wird also zumindest in

der Lunge direkt durch die Aktivität der iNOS reguliert und dieser Mechanismus spielt eine wichtige Rolle im Verlauf der LPS-Toleranz [110]. Möglicherweise sind ähnliche Synergismen von iNOS und HO-1 Aktivität auch im Rahmen der LPS-Toleranz in der Leber vorhanden.

Denkbar wäre somit eine Erhöhung der Expression von HO-1 durch die iNOS mit einer Organprotektion durch die Reaktionsprodukte der HO-1 und darauf folgend eine Verminderung der iNOS Aktivität durch die HO-1, im Sinne einer negativen Rückkopplung und somit eine Verringerung der vasodilatatorischen Wirkung von iNOS und NO.

Das komplexe Zusammenspiel von iNOS, HO-1 und ihren jeweiligen Metaboliten wird jedoch sicher in Zukunft noch weiter untersucht werden müssen, um die genaue Pathophysiologie im Rahmen der LPS-Toleranz weiter aufzuschlüsseln.

Das von uns verwendete Modell des LPS-Schocks durch Applikation von hochaufgereinigtem LPS stimmt in vielen Bereichen mit der Immunreaktion während einer gram-negativen Sepsis überein [111,112], da ein Großteil dieser Immunreaktion durch LPS, welches bei Zellteilungen oder Lyse der Keime frei wird, initiiert wird [4,10,65,66]. Im Verlauf einer Sepsis wird durch die übermäßige Aktivierung des Immunsystems und die massive Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen eine Reihe von Reaktionen ausgelöst, die zu Organschäden und erhöhter Sterblichkeit im Verlauf der Sepsis beitragen [4,70]. Untersuchungen zeigen, dass durch eine Hochregulation der HO-1 eine Organprotektion und eine Verbesserung des Überlebens nach einem LPS-Schock erzielt werden kann [18,21,105,107], welche zumindest zum Teil durch eine Modulation der Expression der oben genannten Zytokine vermittelt werden und somit geeignet erscheinen, auch im Verlauf einer Sepsis wirksam zu sein [107].

Welche Möglichkeiten könnten sich nun ergeben, diesen potentiell protektiven Effekt von HO-1 in der klinischen Anwendung zu nutzen?

Wie in dieser Arbeit und auch in anderen Untersuchungen gezeigt, ist die Gabe von LPS in einer niedrigen Dosierung zumindest im Tiermodell geeignet, eine möglicherweise HO-1 vermittelte Protektion gegenüber einem folgenden, durch LPS ausgelösten Schock zu vermitteln. Eine Induktion von HO-1 ist aber auch durch verschiedene andere Möglichkeiten vorstellbar. So wurde gezeigt, dass die Gabe

von Häm, dem natürlichen Substrat der HO-1, zu einer Blutdrucksenkung bei hypertensiven Ratten führte [113] und dass eine Erhöhung der HO-1 Expression zu einer Protektion in einem Ischämie-Reperusionsmodell am Mäuseherzen führt [104]. Welcher Induktor der HO-1 sich am effektivsten und nebenwirkungsärmsten herausstellt und somit für eine Anwendung am Menschen geeignet sein könnte, wird sich noch zeigen müssen, aber eine Protektion gegen eine Vielzahl an Erkrankungen könnte in Zukunft über eine Induktion der HO-1 auch Einzug in den klinischen Alltag finden. Vorsicht scheint dabei allerdings geboten, da Versuche gezeigt haben, dass die Verringerung einer exzessiv erhöhten HO-1 Aktivität ebenfalls einen protektiven Effekt besitzt. Eine gut abgestimmte Modulation der HO-1 Aktivität dürfte daher am ehesten zu positiven klinischen Effekten führen [114].

Ein anderer Ansatzpunkt liegt in der Tatsache, dass die Wirkung der HO-1 zu einem erheblichen Teil über ihre Reaktionsprodukte CO, Bilirubin und Ferritin [17,19,22] vermittelt wird. Obwohl alle drei Reaktionsprodukte als potentiell zellschädigend beschrieben worden sind, ist diese Wirkung sicherlich dosisabhängig. Es hat sich gezeigt, dass die kurzzeitige exogene Zufuhr von CO in moderaten Dosierungen zu einer Organprotektion in der Lunge führt und die Transplantatabstoßungsrate im Tiermodell der Maus und der Ratte zu senken vermag [112,115]. Ob eine direkte Behandlung mit CO, z.B. über eine Beatmung mit geringen Anteilen von CO, in Zukunft zu Erfolgen führen wird, ist aufgrund der hohen Toxizität von CO fraglich, eine ex-vivo Behandlung von Transplantaten mit CO wäre hingegen eine alternative Möglichkeit der Anwendung.

Verschiedene Arbeiten haben auch gezeigt, dass durch HO-1 produziertes Bilirubin einen protektiven Effekt gegen post-ischämische Myokardschädigung aufweist und verminderte Bilirubinspiegel im Serum mit einem erhöhten Risiko für koronare Herzkrankheit einhergehen [116-118].

Neben einer möglichen durch HO-1 oder seine Reaktionsprodukte vermittelten Protektion, wären auch diagnostische Ansätze denkbar. So wurde festgestellt, dass das durch eine erhöhte Aktivität der HO-1 freigesetzte CO in der Exhalationsluft gemessen werden kann. Erhöhte Mengen von CO wurden bei Patienten mit Asthma [119,120], zystischer Fibrose [121] und Diabetes [122] gemessen. Die Aktivität der HO-1, relativ einfach messbar durch die CO Menge in der Atemluft, könnte somit in der Zukunft dazu dienen, den Krankheitsverlauf dieser und anderer Erkrankungen zu verfolgen.

Es könnte daher möglich sein, in Zukunft durch die zeitlich abgestimmte, gezielte Modulation der Inflammationsprozesse, z.B. über eine Induktion der HO-1, bei bestimmten Hochrisikopatienten (große operative Eingriffe, Transplantationen, Massentransfusionen etc.) den Verlauf einer inflammatorischen Antwort positiv zu beeinflussen und das Überleben zu verbessern. Das genaue Verständnis der hochkomplexen Vorgänge der verschiedenen immunologischen Prozesse ist hierfür allerdings unverzichtbar.

Zusammenfassend kann also durch die Ergebnisse dieser Arbeit und im Einklang mit der aktuellen Literaturlage angenommen werden, dass die HO-1 eine Rolle in der durch LPS-Vorbehandlung vermittelten Leberprotektion einnimmt. Ob sich in Zukunft daraus klinische Anwendungsmöglichkeiten in der Behandlung von SIRS, Sepsis oder anderen Krankheitsbildern ergeben können werden weitere Untersuchungen zeigen müssen.

4 Zusammenfassung

Die schwere Sepsis ist trotz verbesserter Therapiemethoden der modernen Intensivmedizin mit einer erheblichen Mortalität behaftet und septische Erkrankungen verursachen in Deutschland Schätzungen zufolge ca. 60.000 Todesfälle pro Jahr. Im Falle der gram-negativen Sepsis wird durch die Freisetzung von bakteriellen Zellwandbestandteilen wie LPS über die Bindung an Toll-like Rezeptoren, insbesondere TLR-4, eine systemische Immunreaktion ausgelöst. Diese kann dann über verschiedene Mechanismen zu systemischer Hypotension, Organversagen und schließlich zum Tod im Zuge der schweren Sepsis führen.

Es hat sich allerdings herausgestellt, dass LPS auch in der Lage ist protektive Effekte auszulösen. So schützt die Gabe einer niedrigen Dosis LPS den Organismus vor verschiedenen Schädigungen, die in einem späteren Zeitintervall folgen. Beschrieben sind protektive Effekte in Modellen von Ischämie/Reperfusion, direkt-zellschädigenden Agenzien und auch gegenüber hochdosierter LPS-Gabe. In letztgenanntem Fall wird der gezeigte Effekt als LPS-Toleranz bezeichnet.

In der vorliegenden Arbeit sollte nun untersucht werden, ob niedrige Dosen von LPS einen protektiven Effekt bei einem folgenden LPS-Schock vermitteln können, wobei insbesondere Effekte auf die Leber, mit ihrer herausragenden Rolle in der Elimination von LPS aus dem Organismus, im Fokus der Experimente standen. Des Weiteren sollte eine mögliche Rolle der Häm-Oxygenase 1 (HO-1) im Zuge dieser Protektion untersucht werden, da verschiedene Arbeiten der letzten Jahre gezeigt haben, dass HO-1 in der Lage ist eine Protektion gegen verschiedene Arten der Zellschädigung zu vermitteln.

Für die Untersuchungen wurde ein Tiermodell an der Ratte gewählt.

Als wesentliche Ergebnisse sind festzuhalten, dass die Gabe von 1 mg / kg KG LPS (intraperitoneal) 24h vor Auslösen eines LPS-Schocks mit 6 mg / kg KG (intravenös) zu einer signifikanten Verbesserung der Kreislaufparameter und zu einer Verringerung der Leberzellschäden führt, gemessen am mittleren arteriellen Blutdruck bzw. an GOT und GPT im Serum der Tiere. Außerdem zeigt sich, dass die Gabe von niedrig dosiertem LPS zu einem Anstieg der HO-1 Konzentration der Leber im 24h Zeitverlauf führt und dass in den Lebern der Tiere, die eine Protektion

durch LPS-Vorbehandlung erfahren haben, die HO-1 Menge signifikant gegenüber den nicht vorbehandelten Tieren erhöht ist.

Dieses Ergebnis legt nahe, dass die HO-1 eine wichtige Rolle in der Leberprotektion im Rahmen der LPS-Toleranz durch Vorbehandlung mit niedrig dosiertem LPS spielt.

Das in dieser Arbeit verwendete Modell des LPS-Schocks stimmt dabei in vielen Bereichen mit den pathophysiologischen Veränderungen während einer gram-negativen Sepsis überein. Die Ergebnisse dieser Arbeit im Einklang mit den Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen zeigen also, dass durch eine gezielte Modulation der Immunantwort, z.B. über eine Induktion der HO-1 Produktion, eine Protektion des Organismus gegen einen im Intervall folgenden septischen Schock möglich sein könnte.

Eine zeitlich abgestimmte und gezielte Modulation der inflammatorischen Prozesse bei Hochrisikopatienten, z.B. vor geplanten großen operativen Eingriffen oder Organtransplantationen, könnte daher in Zukunft helfen das Überleben dieser Patienten zu verbessern.

Abstract

Severe sepsis is associated with a very high mortality rate despite improved treatment possibilities of modern intensive care medicine. In Germany, 60.000 people die because of severe sepsis every year. In case of gram-negative bacteria infection, a systemic immune response is mainly caused by the reaction of cell-wall fragments such as lipopolysaccharide (LPS) with so called toll-like receptors, especially TLR-4. This can lead to systemic hypotension, organ failure and finally death in the course of severe sepsis.

On the other hand LPS has the ability to mediate protective effects. The application of low-dose LPS protects the organism against harmful effects such as ischemia/reperfusion injury, direct cell-damaging agents and high-doses of LPS. The latter has been named LPS-tolerance.

This work investigates in a rat model whether (i) the application of low-dose LPS 24 hours prior LPS shock achieves liver protection, and (ii) heme-oxygenase (HO)-1 may play role in this mechanism.

The main findings are that the application of 1 mg / kg (intraperitonealy) LPS 24 hours prior the induction of LPS-shock (6 mg / kg intravenously) leads to a significant improvement of circulatory parameters (e.g. mean arterial pressure) and to a reduction of liver damage (assessed by serum levels of GOT and GPT).

Furthermore, low-dose LPS induced time-dependent and significantly HO-1 content in liver tissue. These findings suggest that HO-1 plays a role in liver protection via LPS-pretreatment.

So in the near future a well timed and directed modulation of inflammatory processes could improve the outcome of high-risk patients undergoing major surgery, e.g. organ transplantations.

5 Anhang

5.1 Abkürzungsverzeichnis

ACCP	American College of Chest Physicians
AF	Atemfrequenz
ALT	Alanin Aminotransferase
aPC	aktiviertes Protein C
APS	Ammoniumpersulfat
ARDS	Acute respiratory distress syndrom
AST	Aspartat Aminotransferase
BD	Blutdruck
BSA	Bovine serum albumine (Rinderalbumin)
CD	Cluster of differentiation
CO	Kohlenmonoxid
CRP	C-reaktives Protein
DIG	Disseminierte intravasale Gerinnung
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid = Desoxyribonukleinsäure (DNS)
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
eNOS	Endotheliale Stickoxidsynthetase
ESICM	European Society of Intensive Care Medicine
GOT	Glutamat Oxalacetat Transaminase
GPT	Glutamat Pyruvat Transaminase
HCl	Salzsäure
HO	Häm-Oxygenase
Hsp-32	Hitzeschockprotein 32 (= HO-1)
IFN-Gamma	Interferon Gamma
IL	Interleukin
iNOS	Induzierbare Stickoxidsynthetase
KG	Körpergewicht
LBP	Lipopolysaccharid binding protein
LPS	Lipopolysaccharid

LTA	Lipoteichoic acid (Lipoteichonsäure)
MABD	Mittlerer arterieller Blutdruck
mM	Milimolar
PAF	Platelet activating factor
PAMP	Pathogen associated molecular pattern
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphat gepuffertes Kochsalz)
pCO ₂	Kohlenstoffdioxid Partialdruck
PMN	Polymorphnukleäre Neutrophile Granulozyten
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PRR	Pathogen recognition receptors
SCCM	Society of Critical Care Medicine
SCD	Soluable CD (lösliches CD)
SD	Standard deviation (Standardabweichung)
SDS	Sodiumdodecylsulfate
SIRS	Systemic inflammatory response syndrom
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TLR	Toll like Rezeptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TPBS	Tween PBS
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen

5.2 Materialien und Methoden

Chemikalien

Substanz	Hersteller/Herkunftsort
30% Acrylamid/ Bis Lösung	Bio-Rad, München, Deutschland
Ammonium persulfat (APS) MG: 228,2 g / mol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Aprotinin MG: 6511,4 g / mol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Bradford Reagenz	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Bromphenol Blau MG: 691,9 g / mol	Merck, Darmstadt, Deutschland
BSA (bovine serum albumine)	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, Deutschland
Deoxycholsäure MG: 392,5 g / mol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO) MG: 78,1 g / mol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ethanol MG: 46,1 g / mol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) MG: 292,2 g / mol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Glycerol MG: 92,1 g / mol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Glycine MG: 75,1 g / mol	Fluka, Buchs, Schweiz
Leupeptin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Lipopolysaccharid (LPS) (aus Escherichia Coli)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

2-Mercaptoethanol MG: 78,1 g / mol	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, MG: Deutschland
Methanol MG: 32,0 g / mol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Milchpulver (entrahmt)	Fluka, Buchs, Schweiz
Natriumchlorid MG: 58,4 g / mol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Na-Deoxycholat MG: 414,6 g / mol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Paraformaldehyd MG: 30,0 g / mol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) MG: 174,2 g / mol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Phosphate buffered saline (PBS)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Sodium dodecyl sulfate (SDS) MG: 288,4 g / mol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tetramethylethyldiamin (TEMED) MG: 116,2 g / mol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Sigma 7-9 ®) MG: 121,1 g / mol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100 ® MG: 624,0 g / mol	Sigma Chemical, St. Louis, USA
Trizma ® Hydrochlorid MG: 157,6 g / mol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tween 20 (Polysorbat) MG: 1227,72 g / mol	Merck-Schuchardt, Deutschland

Lösungen

Lysis Puffer:

(Angegebene Werte für 50 ml Puffer)

Substanz	Menge	Menge / 50 ml	Anmerkungen
NaCl	150 mM	438,5 mg	
Trizma HCl (pH 7,4)	50 mM	15,8 g / 200ml, dann 5 ml / 50 ml	Auf pH 7,4 titrieren
EDTA	1 mM	146,1 mg / 50 ml, dann 5 ml / 50 ml	
PMSF	1 mM	10 mg / 300 µl DMSO, dann 260µl / 50 ml	
Triton X-100	1% v / v	500 µl / 50 ml	
Na-Deoxycholat	1% w / v	0,5 g / 50 ml	
SDS	0,1% w / v	1 g / 100 ml, dann 5 ml / 50 ml	
Aprotinin	5 µg / ml	50 µl / 50 ml	Kurz vor Verwenden der Lösung hinzugeben
Leupeptin	5 µg / ml	50 µl / 50 ml	

Mit dest. Wasser auf 50 ml auffüllen

Loading Puffer:

(Angegebene Werte für 10 ml Puffer)

Substanz	Menge	Menge / 10 ml	Anmerkungen
Trizma HCl (pH 6,8)	50 mM	15,8 g / 200 ml, dann 1 ml / 10 ml	Auf pH 6,8 titrieren
Glycerol	20% v / v	2 ml auf 10 ml	
SDS	10% w / v	1 g / 10 ml	
Bromphenol Blau	0,05% w / v	30 mg / 10 ml	
β-Mercaptoethanol	10% v / v	1 ml / 10 ml	Kurz vor Verwenden der Lösung hinzugeben

Mit dest. Wasser auf 10 ml auffüllen

Separation Puffer

(Angegebene Werte für 200 ml Puffer)

Substanz	Menge	Menge / 200 ml
Sigma 7-9	1.875 M	45,4 g / 200 ml
SDS	0,5%	1 g / 200 ml

Mit dest. Wasser auf 200 ml auffüllen und auf pH **8,8** titrieren

Stacking Puffer

(Angegebene Werte für 200 ml Puffer)

Substanz	Menge	Menge / 200 ml
Sigma 7-9	0,625 M	15,1 g / 200 ml
SDS	0,5%	1 g / 200 ml

Mit dest. Wasser auf 200 ml auffüllen und auf pH **6,8** titrieren

Running Puffer

(Angegebene Werte für 1000 ml Puffer)

Substanz	Menge	Menge / 1000 ml
Sigma 7-9	50 mM	3 g / 1000 ml
Glycine	0,384 M	14,4 g / 1000 ml
SDS	0,1%	1 g / 1000 ml

Mit dest. Wasser auf 1000 ml auffüllen

Transfer Puffer

(Angegebene Werte für 1000 ml Puffer)

Substanz	Menge	Menge / 1000 ml
Sigma 7-9	50 mM	3 g / 1000 ml
Glycine	0,384 M	14,4 g / 1000 ml
Methanol	20%	200 ml / 1000 ml

Mit dest. Wasser auf 1000 ml auffüllen

PBS

1 Tablette in 200 ml dest. Wasser auflösen

TPBS

(Angegebene Werte für 400 ml Lösung)

Substanz	Menge / 400ml
PBS	400 ml
Tween 20	1 ml

Blocking Lösung

(Angegebene Werte für 400 ml Lösung)

Substanz	Menge / 400ml
TPBS	400 ml
Milchpulver	20 g / 400 ml (5%)

APS (Ammonium Persulfat)

1 g in 10 ml dest. Wasser auflösen

10% Polyacrylamidgel als Separating Gel

(Angegebene Menge ausreichend für 4 Gele)

Substanz	Menge
Bio-rad Acrylamid / Bis Lösung (30%)	13,4 ml
Separations Puffer	8 ml
Dest. Wasser	18,4 ml
TEMED	40 µl
APS	200 µl

4% Polyacrylamidgel als Stacking Gel

(Angegebene Menge ausreichend für 4 Gele)

Substanz	Menge
Bio-rad Acrylamid / Bis Lösung (30%)	2,6 ml
Stacking Puffer	4 ml
Dest. Wasser	13,2 ml
TEMED	20 µl
APS	100 µl

Antikörper/Proteinstandards

Antikörper	Hersteller/Herkunftsort
Anti β -Actin (Primärantikörper) (aus dem Kaninchen)	Abcam Ltd., Cambridge, UK
Anti HO-1 (Primärantikörper) (aus dem Kaninchen)	Stressgen, Victoria, Canada
Anti Rabbit IgG (Sekundärantikörper) (aus dem Ziegenbock)	Stressgen, Victoria, Canada
Western blotting luminol kit	Santa-Cruz biotechnology, CA, USA

Proteinstandard	Hersteller/Herkunftsort
HO-1 Standard (Syn. Hsp. 32) (aus der Ratte)	Stressgen, Victoria, Canada
Rainbow Marker: Kaleidoscope Prestained Standard	Bio-Rad Laboratories, Hercules

Rainbow Marker:



Protein	Mol. Gew. (kDa)	Farbe
Myosin	210,2	Blau
β -Galaktosidase	118,8	Purpur
BSA	82,5	Grün
Carboanhydrase	40,6	Violett
Trypsin Inhibitor	31,9	Orange
Lysozym	17,5	Rot
Aprotinin	7,0	Blau

Verwendete Geräte und Zubehör

Gerät / Zubehör	Hersteller/ Herkunftsort
Dispergierstation T 8.10 ®	IKA, Wilmington, USA
Elektrophorese Gerät	Amersham Pharma, NJ, USA
Elektrophorese Zubehör (Kämme, Gel-Halterungen, etc.)	Bio-Rad, München, Deutschland
Eppendorf-Heizgerät	NeoLab, Heidelberg, Deutschland
Entwickler	Eastman Kodak, NJ, USA
Filterpapier	Schleicher und Schuell, Dassel, Deutschland
Fixierer	Eastman Kodak, NJ, USA
Magnetisch betriebenes Rührgerät	H&P Labortechnik, Oberschleissheim, Deutschland
Mini-Zentrifuge	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Nitrozellulose Membranen	Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK
PH-Meter 646	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Präzisionswaage	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Probenbehälter (0,5 ml, 1,5 ml und 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Hyperfilm Röntgenfilm	Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK
Schüttler Plattform	Scienceware, New Jersey, USA
Spektrophotometer (µQuant)	Bio-Tek, Vermont, USA
Transparenzfolien	Ahrendt, Dreiech, Deutschland
Vortex Mixer	Neolab, Heidelberg, Deutschland
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Ablauf der Tierversuche

Alle Versuche erfolgten mit Genehmigung der Ethikkommission in den Räumlichkeiten der Tierversuchsanlage der Universität Düsseldorf.

Bei den in dieser Arbeit vorgestellten Experimenten wurden 2 unterschiedliche Protokolle verwendet. Zu Beginn wurde ein Pilotexperiment durchgeführt, bei dem die HO-1 Expression im Zeitverlauf nach LPS Gabe untersucht wurde. Daran angeschlossen waren die eigentlichen Untersuchungen zu LPS Vorbehandlung und folgendem LPS Schock mit invasiver Instrumentierung der Tiere.

Protokoll 1: HO-1 Expression im 24h Zeitverlauf

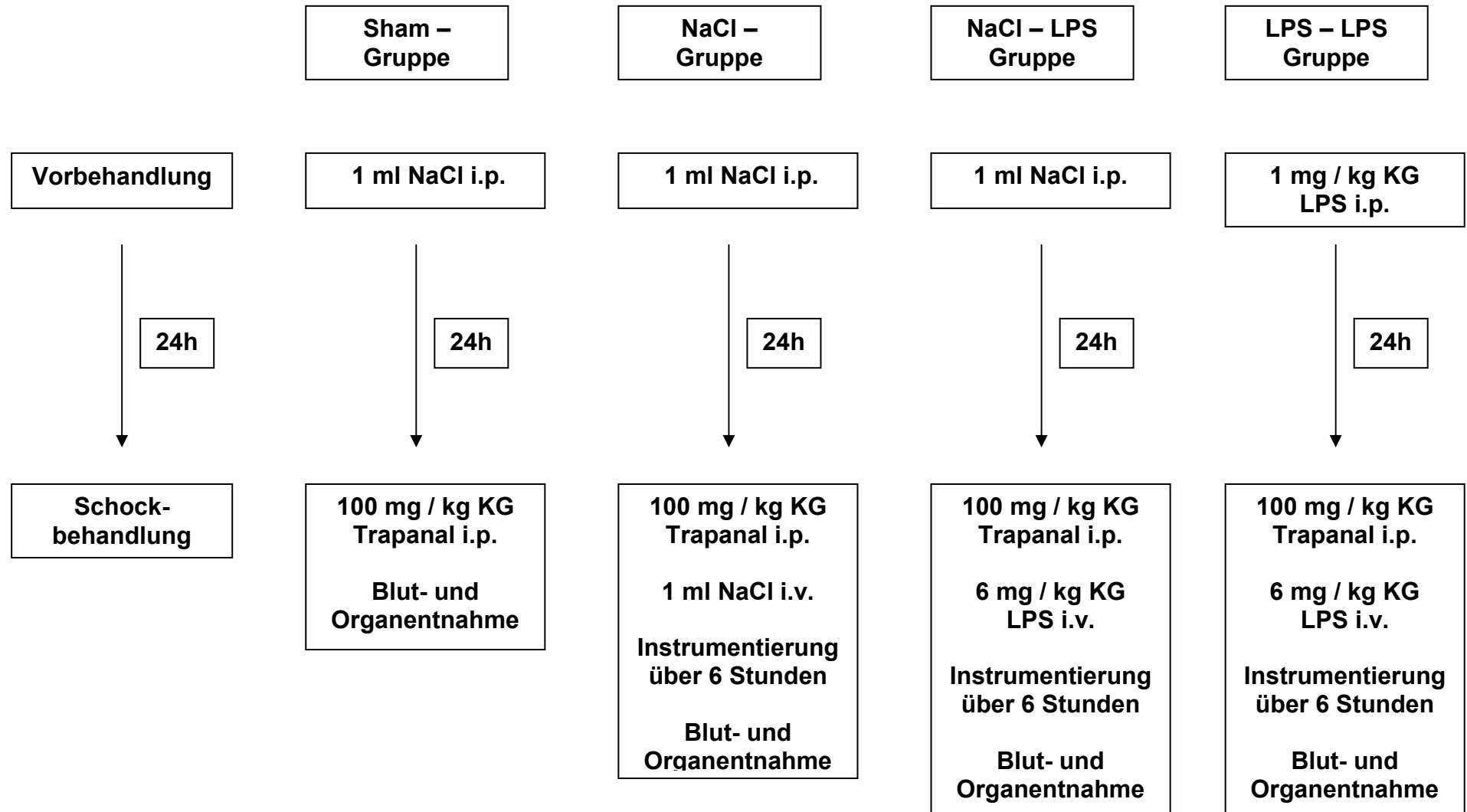
Männliche Wistar Ratten wurden mit 100 mg / kg KG Thiopental (Trapanal®) narkotisiert. Hiernach folgte die Randomisierung und die Behandlung mit 1 mg / kg KG LPS intraperitoneal. Der Kontrollgruppe wurde in äquivalenter Menge NaCl verabreicht.

Die Tiere wurden nun in tiefer Narkose zu den jeweiligen Messzeitpunkten durch eine letale Dosis Thiopental getötet. Im Anschluss erfolgte die Entnahme von Blut- und Organproben.

Protokoll 2: LPS-Schock Modell

In diesem Protokoll erfolgte eine Randomisierung der Tiere in vier Gruppen. Abb. 10 gibt eine Übersicht über die zeitlichen Abläufe und die verschiedenen Protokolle die bei den unterschiedlichen Gruppen angewandt wurden.

Abb. 10 Protokolle der verschiedenen LPS-Schock Gruppen



Operative Methodik:

Zu Beginn wurde allen Tieren 100 mg Thiopental (Trapanal®) pro Kilogramm Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Die Tiere der Sham-Gruppe wurden nun durch eine letale Dosis Thiopental getötet und Blut- und Organproben entnommen.

Bei den anderen Gruppen wurde nach überprüfem Verlust der Schmerzreaktion ein Schnitt von submental bis etwa auf Höhe des Xyphoids durchgeführt, ohne tiefliegende Gefäße zu verletzen. Der Schnitt wurde stumpf weiterpräpariert, bis die Halsmuskulatur sichtbar wurde. Zwischen gerader Halsmuskulatur und M. Sternokleidomastoideus wurde die Trachea freigelegt und unter Umgehung der Gefäße mit einem Faden angeschlungen. Es erfolgte ein gerader Schnitt zwischen den Trachealspangen und das Einführen einer 14G Braunüle als Tubus.

Nach der Tracheotomie wurde die Gefäß-/Nervenstrasse paratracheal freigelegt und mit Hilfe einer Pinzette wurden Nerven und Gefäße stumpf voneinander getrennt. Die A. Carotis wurde nun auf der Pinzette aufgespannt, der distale Teil ligiert und der proximale Teil mit einer BULL-Klemme verschlossen, sowie mit einer weiteren Ligatur angeschlungen. Danach wurde die Vorderseite der Arterie eingeschnitten, ein luftfreies und mit heparinierter NaCl Lösung (50 IE / ml) gefülltes Kathetersystem eingeführt und mit der angeschlungenen proximalen Ligatur fixiert.

Es folgte das Aufsuchen und Freipräparieren der V. jugularis im Schulterbereich der Ratten. Auch hier wurde das Gefäß aufgespannt und distal ligiert, danach proximal angeschlungen und ohne weiteres Abklemmen angeschnitten und mit einem luftfreien und mit NaCl Lösung gefüllten Schlauchsystem katheterisiert. Der Katheter wurde vorgeschoben, bis er in zentraler Position vor dem rechten Vorhof zu liegen kam und danach mit der Ligatur fixiert.

Danach wurden die Schnitte der vorangegangenen Kanülierung steril abgedeckt und die Versuchstiere auf einer Wärmematte gebettet und zusätzlich unter einer Wärmelampe platziert. Es wurde nun eine rektale Temperaturmessung begonnen und bis zum Ende des Versuchs aufrechterhalten. Das arterielle Schlauchsystem wurde an einen Druckabnehmer angeschlossen, der für die Dauer des Versuches kontinuierlich den mittleren arteriellen Blutdruck der Tiere, sowie daraus abgeleitet die Herzfrequenz, aufzeichnete. Außerdem wurden über die gesamte Versuchsdauer hinweg regelmäßig die Temperatur, die Spontanatmung und die Narkosetiefe der Tiere überprüft und gegebenenfalls Maßnahmen zur Regulation ergriffen.

Zur Auslösung eines LPS-Schocks wurde den Tieren nun über eine Dauer von 10 Minuten jeweils eine Dosis von 6 mg / kg KG LPS, sowie 1 ml NaCl Lösung, über den Katheter in der V. jugularis verabreicht. Die Versuchstiere der NaCl-Gruppe erhielten lediglich Kochsalzlösung. Es folgten stündliche Gaben von jeweils 1ml NaCl über den Zugang in der A. Carotis um Flüssigkeitsverluste durch offene Wunden, evtl. aufgetretene Blutverluste und fehlendes Trinken der narkotisierten Tiere auszugleichen. Nach 6 Stunden Versuchsdauer wurden die Tiere in tiefer Narkose durch eine letale Dosis Thiopental getötet ihnen danach Blut- und Organproben entnommen.

Western Blot

Theorie und Hintergrund

Beim Western Blot handelt es sich um ein Verfahren der elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen in einem Polyacrylamidgel und des anschließenden Transfers auf eine Trägermembran. Der Name "Western Blot" ist zurückzuführen auf Edwin Southern, welcher 1971 ein Verfahren der Auftrennung und anschließenden Hybridisierung von DNA Fragmenten erfand und ihm den Namen "Southern Blot" (Blot = engl. für Fleck) gab. Im Nachfolgenden wurden Verfahren zur Untersuchung von RNA mit dem Namen "Northern Blot", sowie zur Untersuchung von Proteinen mit dem Namen "Western Blot" entwickelt und namentlich an das ursprüngliche Verfahren angelehnt.

Vor dem eigentlichen "Blotten", d.h. dem Transfer auf eine Membran, werden die Proteingemische mit Hilfe der Technik der Elektrophorese aufgetrennt. Bei der Elektrophorese wandern geladene Teilchen durch Anlegen eines elektrischen Feldes entsprechend ihrer Größe und ihrer Ladung unterschiedlich schnell durch ein Trägermaterial. Durch die unterschiedliche Geschwindigkeit mit der sich die einzelnen Proteine durch das Trägermedium bewegen werden sie nach Größe und Ladung aufgetrennt. Als Trägersubstanz können verschiedene Materialien dienen, wobei beim Western Blot die Gel-Elektrophorese mit Polyacrylamidgelen zum Einsatz kommt. Als wichtige Unterform der Gel-Elektrophorese, die auch beim Western Blot überwiegend zum Einsatz kommt, ist die SDS-PAGE (*sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) zu nennen. Bei dieser Methode

wird durch Zugabe von SDS (*sodium dodecylsulfate*) eine Denaturierung, sowie eine negative Ladung der Proteine erreicht, welche später eine Auftrennung ausschließlich nach der Größe ermöglicht.

Nach der Auftrennung der Proteinfractionen im Polyacrylamidgel folgt der Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran. Es wird hierbei ein elektrisches Feld angelegt, welches nicht mehr wie noch beim Auftrennen der Proteinfractionen parallel zum Polyacrylamidgel aufgebaut ist, sondern senkrecht zu diesem steht. Durch dieses elektrische Feld werden die Proteine aus dem Gel in eine auf das Gel aufgelegte Membran (z.B. Nitrozellulose) transferiert und bleiben dort aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen haften. Um die nun auf der Membran gebundenen Proteine sichtbar zu machen, kommen verschiedene Techniken zum Einsatz, wobei das Immunoblotting sicher neben Visualisierungsmethoden wie der unspezifischen Anfärbung mit Farbstoffen wie Coomassie Blau u. A. das häufigste ist.

Beim Immunoblotting werden spezifische Antikörper eingesetzt, die gegen Epitope des zu detektierenden Proteins gerichtet sind. An den spezifischen Antikörper, der auch als "primärer Antikörper" bezeichnet wird, bindet nun ein weiterer Antikörper, der "sekundäre Antikörper", an welchen wiederum Enzyme oder radioaktiv markierte Stoffe gebunden sind, die eine Visualisierung der Proteine ermöglichen.

Die freien Bindungsstellen der Membran müssen im Verlauf blockiert werden, um eine unspezifische Bindung der Antikörper auf der gesamten Membran zu verhindern und sicherzustellen, dass die Antikörper nur an den Epitopen der zu untersuchenden Proteine binden. Diese Blockierung wird über unspezifische Proteine, wie z.B. Milchpulver oder BSA (*bovine serum albumin*) erreicht. Es werden nun aufeinanderfolgend der primäre und danach der sekundäre Antikörper auf die Membran appliziert und inkubiert, jeweils unterbrochen von Waschschritten, um schwächer haftende Antikörper zu entfernen.

Sind nun auf der Membran sowohl die Proteine, als auch an ihnen gebunden der primäre und an diesen wiederum gebunden der sekundäre Antikörper vorhanden, so folgt die eigentliche Darstellung der Proteine. Diese kann beispielsweise über ein an den sekundären Antikörper gebundenes Enzym stattfinden. Ein Beispiel für ein solches Enzym ist die HRP (*horse radish peroxidase*), welche unter anderem die Reaktion von Luminol in seine oxidierte Form katalysiert, die danach eine Lumineszenz aufweist. Diese Lumineszenz kann nun entweder mit der Belichtung von Röntgenfilmen oder mit speziellen Scannern abgebildet werden.

Ablauf des Verfahrens

Homogenisierung der Organproben

Die bei -80°C gelagerten Organteile wurden wie folgt für die Untersuchung mittels Western Blot vorbereitet. Alle Schritte der Homogenisierung der Proben fanden unter ständiger Kühlung statt, um eine Zerstörung der zu untersuchenden Proteine durch die im Gewebe vorhandenen Proteasen zu minimieren.

Bei der Homogenisierung wurde sowohl eine mechanische Zerkleinerung der Gewebe, als auch eine chemische Lysierung der Zellmembranen und der Strukturbestandteile der Organe durchgeführt. Die zur chemischen Lysierung notwendigen Detergenzien befinden sich in dem verwendeten Lysierungspuffer, der außerdem noch verschiedene Protease-Inhibitoren enthält, um die oben angesprochene Zerstörung der Proteine durch Proteasen weiter zu minimieren.

Nach der Herstellung eines Zelllysates wurde eine Zentrifugation durchgeführt um Zellwandbestandteile und sonstigen Debris aus den Proben zu entfernen.

Das Zelllysate wurde zu gleichen Teilen mit einem "Loading" Puffer vermischt, der unter anderem SDS als Detergenz, Glycerol zur Erhöhung des spezifischen Gewichtes und Bromphenol-Blau zur Markierung der Position der Proteine im Gel enthält.

Um im weiteren Verlauf der Untersuchungen mit äquivalenten Mengen von Proteinen in den einzelnen Proben arbeiten zu können, mussten nun die unterschiedlichen Proteinkonzentrationen der Proben bestimmt werden. Zu diesem Zweck wurde eine Farbreaktion durchgeführt, deren Absorption bei 595 nm Wellenlänge gemessen und dann gegen eine Standardkurve einer definierten Proteinkonzentration abgeglichen.

Ablauf der Homogenisierung

Die zu homogenisierenden Organteile wurden gewogen und danach mit Pinzette und Skalpell grob zerkleinert. Es folgte die Homogenisierung der Proben mit Hilfe einer Dispergierstation mit Homogenisierungsaufsatz unter Zugabe einer definierten Menge von Lysis Puffer, die dem dreifachen Gewicht der jeweiligen Probe entsprach. Nach jedem Organ wurde eine Reinigung des Homogenisierungsaufsatzes der Dispergierstation, sowie der Pinzette und des Skalpells mit Ethanol 95% und dest.

Wasser durchgeführt um eine Vermischung verschiedener Probenanteile zu verhindern.

Die entstandenen Zellysate wurden bei 10.000 G (rcf) für 10 Minuten bei einer Temperatur von 4°C zentrifugiert. Es folgte das Abpipettieren des entstandenen Überstandes und Auffüllen mit gleicher Menge Loading Puffer, nach vorheriger Entnahme von 20 – 40 µl des Lysates für die Proteinkonzentrationsbestimmung. Danach wurden die Proben für 3-5 Minuten auf 95°C erhitzt.

Ablauf der Proteinkonzentrationsbestimmung

Zur Erstellung einer Standardkurve für die spätere Bestimmung der Proteinkonzentration wurde eine Verdünnungsreihe von BSA (*bovine serum albumine*) angefertigt, absteigend von 1,0 mg / ml bis zu 0,1 mg / ml in 0,1 mg / ml Schritten. Die Proben der Zellysate wurden mit dest. Wasser in einem Verhältnis von 1:40 verdünnt. Im Folgenden wurden jeweils 10 µl der BSA Verdünnungsreihe und der verdünnten Proben auf eine 96-well Platte pipettiert.

Nach dem Aufbringen der Proben wurde zu jeder Probe, sowie zu der BSA-Reihe, jeweils 200 µl Bradford Reagenz hinzugefügt, welche zu einer Färbung der Proben führt, deren Farbe und Intensität abhängig ist von der Proteinkonzentration. Nach 5 Minuten Reaktionszeit wurde die Absorption bei 595 nm Wellenlänge im Photometer gemessen.

Anhand der nun gemessenen Absorption im Photometer konnte man im Vergleich mit der zuvor erstellten Standardkurve die Proteinkonzentration der Proben bestimmen.

Blotting

Zu Beginn wurde die gewünschte Menge Separating Gel hergestellt und nach gründlichem Durchmischen der Bestandteile zügig zwischen zwei bereits vorbereitete Glasplatten pipettiert. Nach vollständigem Aushärten des Separating Gels wurde die entsprechende Menge Stacking Gel hergestellt und über das Separating Gel pipettiert. In das noch flüssige Stacking Gel wurde dann der für die späteren Taschen benötigte Kamm eingeführt.

Danach wurde eine für die Gelelektrophorese geeignete Kammer bis zur Hälfte mit Running Puffer gefüllt und jeweils zwei vollständig ausgehärtete Gele wurden mit einer entsprechenden Vorrichtung in die Kammer überführt und der Raum zwischen den Gelen vollständig mit Running Puffer aufgefüllt.

Es folgte das Einpipettieren der Proben in die dafür vorgesehenen Taschen des Stacking Gels, sowie das Einbringen eines mehrfarbigen Rainbow Markers und eines definierten HO-1 Standards zur späteren, sicheren Identifizierung der gesuchten Banden. Die Elektrophorese wurde mit einer Spannung von 100 V für etwa 70-80 Minuten durchgeführt.

Nach Ablauf der erforderlichen Zeit wurden die Gele in den Transfer überführt und derart in einem sogenannten "Blot-Sandwich" angeordnet, dass das Gel in direktem Kontakt zur Nitrozellulosemembran steht und beide von Filterpapier und zwei dünnen Schwämmen geschützt leicht aneinander gepresst werden. Der Transfer der Proteine auf die Nitrozellulose-Membran erfolgte mit 100 V für etwa 90 Minuten.

Die Membranen wurden nach dem erfolgten Transfer unter leichtem Schütteln bei 4°C über Nacht oder bei Raumtemperatur für 2 Stunden mit einer 5% Milchpulverlösung als Blocking Lösung inkubiert.

Es folgten drei jeweils fünfminütige Waschzyklen mit TBPS zur Entfernung überschüssiger Mengen der Blocking Lösung. Nach den Waschzyklen wurden die Gele für eine Stunde mit dem primären Antikörper in einer Konzentration von 1:2000 inkubiert und danach erneut drei Waschzyklen analog zu den oben genannten unterzogen, um überschüssige Mengen des primären Antikörpers zu entfernen. Der sekundäre Antikörper wurde in einer Konzentration von 1:5000 für ebenfalls eine Stunde inkubiert und die Gele danach erneut den oben erwähnten Waschzyklen unterzogen, gefolgt von drei fünfminütigen Waschzyklen mit PBS.

In einer Dunkelkammer wurden die Membranen nun mit jeweils 3 ml einer Luminol-Lösung übergossen und für 2 Minuten inkubiert. Danach wurde in einer geschlossenen Kassette ein Röntgenfilm für 5-10 Minuten durch die Luminolreaktion mit dem sekundären Antikörper belichtet. Der belichtete Film wurde entwickelt und mit einem Fixierer haltbar gemacht, um danach eingescannt und densitometrisch ausgewertet werden zu können.

Aminotransferasen (AST und ALT)

Die Aminotransferasen, oder Transaminasen, sind Enzyme, welche die Übertragung von Amino- bzw. Ketogruppen zwischen Aminosäuren katalysieren. Sie stellen sensitive Parameter zur Erkennung von Leberzellschäden dar. Zu den Aminotransferasen zählen die Aspartat Aminotransferase (AST, GOT), die bei der Reaktion von L-Aspartat und 2-Oxoglutarat zu Oxalacetat und L-Glutamat benötigt wird, sowie die Alanin Aminotransferase (ALT, GPT), welche die Reaktion von L-Alanin und 2-Oxoglutarat zu Pyruvat und L-Glutamat katalysiert.

Die AST findet sich in der Leber, dem Herzmuskel, dem Skelettmuskel, der Niere, dem Gehirn, dem Pankreas, der Lunge und in Erythrozyten sowie Leukozyten (abnehmende Konzentration analog zur oben erfolgten Aufzählung). Die ALT wird beinahe ausschließlich in Leberzellen gefunden. Aminotransferasen sind normalerweise nur in sehr geringer Konzentration im Serum vorhanden. Leberzellschäden verschiedener Genese, wie virale Hepatitiden oder hypoxische sowie toxische Leberschäden, führen zu einer erhöhten Permeabilität der Zellmembranen mit darauf folgendem Übertritt der Enzyme ins Blut [123].

Die Konzentration der im Blut befindlichen Aminotransferasen wurde durch photometrische Aktivitätsmessung und Umrechnung mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes bestimmt und konnte dann als Maß für eine Schädigung der Leberzellen der Versuchstiere herangezogen werden.

Statistik

Die statistische Auswertung der Ergebnisse mittels GraphPad Prism 4.0 © erfolgte unter Anwendung der einfaktoriellen Varianzanalyse (*One-Way-ANOVA*) mit folgender Bonferroni post-hoc Methode. Bei der graphischen Auswertung wird das arithmetische Mittel dargestellt, die Fehlerbalken zeigen die Varianz. Die Irrtumswahrscheinlichkeit bei dargestellter Signifikanz beträgt $p < 0,05$.

5.3 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Univ.-Prof. Dr. Dr. Kai Zacharowski, FRCA für die Überlassung des Themas und für seine ständige Bereitschaft zur Hilfe in Wort und Tat, sowie für seine besondere Gabe uns nach Rückschlägen zum Weitermachen zu bringen. Vielen Dank Kai.

Mein Dank gilt weiter Carina Tidden, die einen Großteil der Zeit gemeinsam mit mir im Labor verbracht hat und ohne die ich es nicht geschafft hätte. Ich war sicher nicht immer ganz einfach zu ertragen, wenn die Versuche nicht wie erwartet gelaufen sind. Danke, dass Du durchgehalten hast. Vielen Dank Carina.

Besonderen Dank und höchstes Lob möchte ich auch Dr. Olaf Böhm und Dr. Alexander Koch aussprechen, die mich durch die gesamte Arbeit im Labor und vor allem während des Verfassens der Arbeit mit einer bewundernswerten Geduld begleitet haben. Vor allem das Verfassen dieser Arbeit wäre ohne Eure und Kais unermüdliche Korrekturen und Hilfestellungen niemals möglich gewesen. Vielen Dank Olaf und Alex.

Danken möchte ich auch Dr. Paula Zacharowski, die stets die gute Seele der Arbeitsgruppe war und dafür gesorgt hat, dass trotz einiger Fehlschläge die Stimmung stets gut war. Auch war sie immer in fachlichen Fragen eine kompetente Ansprechpartnerin und eine große Hilfe. Vielen Dank Paula.

Ich danke auch dem gesamten Rest der Arbeitsgruppe, ein jeder von euch war stets bereit mir zu helfen und die stets gute Arbeitsatmosphäre hat die vielen Stunden im Labor um ein vielfaches erleichtert. Danke euch allen.

Ich danke auch meinen Eltern, dass sie mein gesamtes Studium mitgetragen haben, nicht nur im finanziellen Sinne und mich mein gesamtes Leben hindurch stets vorbehaltlos unterstützt haben. Vielen Dank.

Mein größter Dank gilt jedoch meiner Frau, dafür dass sie immer an mich geglaubt hat, dafür dass sie mich nach jedem Rückschlag so liebevoll wieder aufgebaut hat und vor allem dafür, dass sie mein Leben jeden Tag um so vieles schöner macht. Vielen Dank mein Engel.

5.4 Literatur

1. Gao H., Leaver S. K., Burke-Gaffney A., Finney S. J.: Severe sepsis and Toll-like receptors. *Semin Immunopathol* 2008;30:29-40.
2. Angus D. C., Linde-Zwirble W. T., Lidicker J., Clermont G., Carcillo J., Pinsky M. R.: Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001;29:1303-1310.
3. Martin G. S., Mannino D. M., Eaton S., Moss M.: The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 2003;348:1546-1554.
4. Bone R. C.: The pathogenesis of sepsis. *Ann Intern Med* 1991;115:457-469.
5. Bornstein S. R., Zacharowski P., Schumann R. R., Barthel A., Tran N., Papewalis C., Rettori V., McCann S. M., Schulze-Osthoff K., Scherbaum W. A., Tarnow J., Zacharowski K.: Impaired adrenal stress response in Toll-like receptor 2-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:16695-16700.
6. Zacharowski K., Zacharowski P. A., Koch A., Baban A., Tran N., Berkels R., Papewalis C., Schulze-Osthoff K., Knuefermann P., Zahringer U., Schumann R. R., Rettori V., McCann S. M., Bornstein S. R.: Toll-like receptor 4 plays a crucial role in the immune-adrenal response to systemic inflammatory response syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:6392-6397.
7. Parrillo J. E.: Pathogenetic mechanisms of septic shock. *N Engl J Med* 1993;328:1471-1477.
8. Wenzel R. P., Pinsky M. R., Ulevitch R. J., Young L.: Current understanding of sepsis. *Clin Infect Dis* 1996;22:407-412.
9. Karima R., Matsumoto S., Higashi H., Matsushima K.: The molecular pathogenesis of endotoxic shock and organ failure. *Mol Med Today* 1999;5:123-132.
10. Rietschel E. T., Kirikae T., Schade F. U., Mamat U., Schmidt G., Loppnow H., Ulmer A. J., Zahringer U., Seydel U., Di Padova F., et al.: Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *Faseb J* 1994;8:217-225.
11. Lehner M. D., Ittner J., Bundschuh D. S., van Rooijen N., Wendel A., Hartung T.: Improved innate immunity of endotoxin-tolerant mice increases resistance to *Salmonella enterica* serovar typhimurium infection despite attenuated cytokine response. *Infect Immun* 2001;69:463-471.
12. Zuckerman S. H., Evans G. F., Butler L. D.: Endotoxin tolerance: independent regulation of interleukin-1 and tumor necrosis factor expression. *Infect Immun* 1991;59:2774-2780.
13. Klein A., Zhadkewich M., Margolick J., Winkelstein J., Bulkley G.: Quantitative discrimination of hepatic reticuloendothelial clearance and phagocytic killing. *J Leukoc Biol* 1994;55:248-252.
14. Smedsrod B., De Bleser P. J., Braet F., Lovisetti P., Vanderkerken K., Wisse E., Geerts A.: Cell biology of liver endothelial and Kupffer cells. *Gut* 1994;35:1509-1516.
15. Toth C. A., Thomas P.: Liver endocytosis and Kupffer cells. *Hepatology* 1992;16:255-266.
16. Desmet V. J., Arias I. M., Boyer J. L., Fausto N., Jakoby W. B., Schachter D. A., Shafritz D. A.: The liver: biology and pathobiology., Raven Press, NewYork, 1994.

17. Oberle S., Schwartz P., Abate A., Schroder H.: The antioxidant defense protein ferritin is a novel and specific target for pentaerythrityl tetranitrate in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;261:28-34.
18. Otterbein L., Sylvester S. L., Choi A. M.: Hemoglobin provides protection against lethal endotoxemia in rats: the role of heme oxygenase-1. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995;13:595-601.
19. Pannen B. H., Kohler N., Hole B., Bauer M., Clemens M. G., Geiger K. K.: Protective role of endogenous carbon monoxide in hepatic microcirculatory dysfunction after hemorrhagic shock in rats. *J Clin Invest* 1998;102:1220-1228.
20. Poss K. D., Tonegawa S.: Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:10925-10930.
21. Yang L., Quan S., Abraham N. G.: Retrovirus-mediated HO gene transfer into endothelial cells protects against oxidant-induced injury. *Am J Physiol* 1999;277:L127-133.
22. Yesilkaya A., Altinayak R., Korgun D. K.: The antioxidant effect of free bilirubin on cumene-hydroperoxide treated human leukocytes. *Gen Pharmacol* 2000;35:17-20.
23. Bauer M., Brunkhorst F., Welte T., Gerlach H., Reinhart K.: [Sepsis. Update on pathophysiology, diagnostics and therapy]. *Anaesthesist* 2006;55:835-845.
24. Bates D. W., Pruess K. E., Lee T. H.: How bad are bacteremia and sepsis? Outcomes in a cohort with suspected bacteremia. *Arch Intern Med* 1995;155:593-598.
25. Geerdes H. F., Ziegler D., Lode H., Hund M., Loehr A., Fangmann W., Wagner J.: Septicemia in 980 patients at a university hospital in Berlin: prospective studies during 4 selected years between 1979 and 1989. *Clin Infect Dis* 1992;15:991-1002.
26. Bone R. C.: Gram-positive organisms and sepsis. *Arch Intern Med* 1994;154:26-34.
27. Levy M. M., Fink M. P., Marshall J. C., Abraham E., Angus D., Cook D., Cohen J., Opal S. M., Vincent J. L., Ramsay G.: 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med* 2003;31:1250-1256.
28. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 1992;20:864-874.
29. Poeze M., Ramsay G., Gerlach H., Rubulotta F., Levy M.: An international sepsis survey: a study of doctors' knowledge and perception about sepsis. *Crit Care* 2004;8:R409-413.
30. Taniguchi T., Koido Y., Aiboshi J., Yamashita T., Suzaki S., Kurokawa A.: Change in the ratio of interleukin-6 to interleukin-10 predicts a poor outcome in patients with systemic inflammatory response syndrome. *Crit Care Med* 1999;27:1262-1264.
31. Ueda S., Nishio K., Minamino N., Kubo A., Akai Y., Kangawa K., Matsuo H., Fujimura Y., Yoshioka A., Masui K., Doi N., Murao Y., Miyamoto S.: Increased plasma levels of adrenomedullin in patients with systemic inflammatory response syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:132-136.
32. Stoiser B., Knapp S., Thalhammer F., Locker G. J., Kofler J., Hollenstein U., Staudinger T., Wilfing A., Frass M., Burgmann H.: Time course of immunological markers in patients with the systemic inflammatory response

- syndrome: evaluation of sCD14, sVCAM-1, sELAM-1, MIP-1 alpha and TGF-beta 2. *Eur J Clin Invest* 1998;28:672-678.
33. Hietaranta A., Kempainen E., Puolakkainen P., Sainio V., Haapiainen R., Peuravuori H., Kivilaakso E., Nevalainen T.: Extracellular phospholipases A2 in relation to systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and systemic complications in severe acute pancreatitis. *Pancreas* 1999;18:385-391.
 34. Takala A., Jousela I., Olkkola K. T., Jansson S. E., Leirisalo-Repo M., Takkunen O., Repo H.: Systemic inflammatory response syndrome without systemic inflammation in acutely ill patients admitted to hospital in a medical emergency. *Clin Sci (Lond)* 1999;96:287-295.
 35. Tang B. M., Eslick G. D., Craig J. C., McLean A. S.: Accuracy of procalcitonin for sepsis diagnosis in critically ill patients: systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2007;7:210-217.
 36. Glauser M. P., Zanetti G., Baumgartner J. D., Cohen J.: Septic shock: pathogenesis. *Lancet* 1991;338:732-736.
 37. Horn K. D.: Evolving strategies in the treatment of sepsis and systemic inflammatory response syndrome (SIRS). *Qjm* 1998;91:265-277.
 38. Wagner J. G., Roth R. A.: Neutrophil migration during endotoxemia. *J Leukoc Biol* 1999;66:10-24.
 39. Mammen E. F.: The haematological manifestations of sepsis. *J Antimicrob Chemother* 1998;41 Suppl A:17-24.
 40. van Gorp E. C., Suharti C., ten Cate H., Dolmans W. M., van der Meer J. W., ten Cate J. W., Brandjes D. P.: Review: infectious diseases and coagulation disorders. *J Infect Dis* 1999;180:176-186.
 41. Gospodarowicz M., Benedet L., Hutter R. V., Fleming I., Henson D. E., Sobin L. H.: History and international developments in cancer staging. *Cancer Prev Control* 1998;2:262-268.
 42. Van Amersfoort E. S., Van Berkel T. J., Kuiper J.: Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. *Clin Microbiol Rev* 2003;16:379-414.
 43. Shapiro N. I., Howell M., Talmor D.: A blueprint for a sepsis protocol. *Acad Emerg Med* 2005;12:352-359.
 44. Rivers E., Nguyen B., Havstad S., Ressler J., Muzzin A., Knoblich B., Peterson E., Tomlanovich M.: Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 2001;345:1368-1377.
 45. Vanhorebeek I., Langouche L., Van den Berghe G.: Tight blood glucose control: what is the evidence? *Crit Care Med* 2007;35:S496-502.
 46. Imai Y., Parodo J., Kajikawa O., de Perrot M., Fischer S., Edwards V., Cutz E., Liu M., Keshavjee S., Martin T. R., Marshall J. C., Ranieri V. M., Slutsky A. S.: Injurious mechanical ventilation and end-organ epithelial cell apoptosis and organ dysfunction in an experimental model of acute respiratory distress syndrome. *Jama* 2003;289:2104-2112.
 47. Annane D., Sebille V., Charpentier C., Bollaert P. E., Francois B., Korach J. M., Capellier G., Cohen Y., Azoulay E., Troche G., Chaumet-Riffaud P., Bellissant E.: Effect of treatment with low doses of hydrocortisone and fludrocortisone on mortality in patients with septic shock. *Jama* 2002;288:862-871.
 48. Sprung C. L., Annane D., Keh D., Moreno R., Singer M., Freivogel K., Weiss Y. G., Benbenishty J., Kalenka A., Forst H., Laterre P. F., Reinhart K., Cuthbertson B. H., Payen D., Briegel J.: Hydrocortisone therapy for patients with septic shock. *N Engl J Med* 2008;358:111-124.

49. Marti-Carvajal A., Salanti G., Cardona A. F.: Human recombinant activated protein C for severe sepsis. *Cochrane Database Syst Rev* 2007;CD004388.
50. Rietschel E. T., Brade H.: Bacterial endotoxins. *Sci Am* 1992;267:54-61.
51. Medzhitov R., Janeway C. A., Jr.: Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol* 1997;9:4-9.
52. Hellman J., Loiselle P. M., Tehan M. M., Allaire J. E., Boyle L. A., Kurnick J. T., Andrews D. M., Sik Kim K., Warren H. S.: Outer membrane protein A, peptidoglycan-associated lipoprotein, and murein lipoprotein are released by *Escherichia coli* bacteria into serum. *Infect Immun* 2000;68:2566-2572.
53. Roberts I. S.: The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. *Annu Rev Microbiol* 1996;50:285-315.
54. Kotani S., Takada H., Tsujimoto M., Ogawa T., Takahashi I., Ikeda T., Otsuka K., Shimauchi H., Kasai N., Mashimo J., et al.: Synthetic lipid A with endotoxic and related biological activities comparable to those of a natural lipid A from an *Escherichia coli* re-mutant. *Infect Immun* 1985;49:225-237.
55. Dziarski R.: Peptidoglycan and lipopolysaccharide bind to the same binding site on lymphocytes. *J Biol Chem* 1991;266:4719-4725.
56. Muller-Loennies S., Zahringer U., Seydel U., Kusumoto S., Ulmer A. J., Rietschel E. T.: What we know and don't know about the chemical and physical structure of lipopolysaccharide in relation to biological activity. *Prog Clin Biol Res* 1998;397:51-72.
57. Alexander C., Rietschel E. T.: Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *J Endotoxin Res* 2001;7:167-202.
58. Morrison D. C., Leive L.: Fractions of lipopolysaccharide from *Escherichia coli* O111:B4 prepared by two extraction procedures. *J Biol Chem* 1975;250:2911-2919.
59. Manthey C. L., Vogel S. N.: Elimination of trace endotoxin protein from rough chemotype LPS. *J. Endotoxin Res.* 1994;1:84-91.
60. Strittmatter W., Galanos C.: Characterisation of protein co-extracted together with LPS in *Escherichia coli*, *Salmonella minnesota* and *Yersinia enterocolitica*. *Microb Pathog* 1987;2:29-36.
61. Hoshino K., Takeuchi O., Kawai T., Sanjo H., Ogawa T., Takeda Y., Takeda K., Akira S.: Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol* 1999;162:3749-3752.
62. Qureshi S. T., Lariviere L., Leveque G., Clermont S., Moore K. J., Gros P., Malo D.: Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4). *J Exp Med* 1999;189:615-625.
63. da Silva Correia J., Soldau K., Christen U., Tobias P. S., Ulevitch R. J.: Lipopolysaccharide is in close proximity to each of the proteins in its membrane receptor complex. transfer from CD14 to TLR4 and MD-2. *J Biol Chem* 2001;276:21129-21135.
64. Haziot A., Hijiya N., Gangloff S. C., Silver J., Goyert S. M.: Induction of a novel mechanism of accelerated bacterial clearance by lipopolysaccharide in CD14-deficient and Toll-like receptor 4-deficient mice. *J Immunol* 2001;166:1075-1078.
65. Hack C. E., Aarden L. A., Thijs L. G.: Role of cytokines in sepsis. *Adv Immunol* 1997;66:101-195.
66. Lukacs N. W., Hogaboam C., Campbell E., Kunkel S. L.: Chemokines: function, regulation and alteration of inflammatory responses. *Chem Immunol* 1999;72:102-120.

67. Jaeschke H., Smith C. W.: Cell adhesion and migration. III. Leukocyte adhesion and transmigration in the liver vasculature. *Am J Physiol* 1997;273:G1169-1173.
68. van Oosten M., van de Bilt E., de Vries H. E., van Berkel T. J., Kuiper J.: Vascular adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 expression on rat liver cells after lipopolysaccharide administration in vivo. *Hepatology* 1995;22:1538-1546.
69. Roitt I. M.: *Essential immunology*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, United Kingdom, 1994.
70. Mulligan M. S., Smith C. W., Anderson D. C., Todd R. F., 3rd, Miyasaka M., Tamatani T., Issekutz T. B., Ward P. A.: Role of leukocyte adhesion molecules in complement-induced lung injury. *J Immunol* 1993;150:2401-2406.
71. Vogel S. N., Hogan M. M.: *Immunophysiology*. Oxford University Press, Oxford, United Kingdom, 1990.
72. Li M. H., Seatter S. C., Manthei R., Bubrick M., West M. A.: Macrophage endotoxin tolerance: effect of TNF or endotoxin pretreatment. *J Surg Res* 1994;57:85-92.
73. Zhang X., Morrison D. C.: Lipopolysaccharide structure-function relationship in activation versus reprogramming of mouse peritoneal macrophages. *J Leukoc Biol* 1993;54:444-450.
74. Knopf H. P., Otto F., Engelhardt R., Freudenberg M. A., Galanos C., Herrmann F., Schumann R. R.: Discordant adaptation of human peritoneal macrophages to stimulation by lipopolysaccharide and the synthetic lipid A analogue SDZ MRL 953. Down-regulation of TNF-alpha and IL-6 is paralleled by an up-regulation of IL-1 beta and granulocyte colony-stimulating factor expression. *J Immunol* 1994;153:287-299.
75. Steel D. M., Whitehead A. S.: The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein. *Immunol Today* 1994;15:81-88.
76. Fox E. S., Thomas P., Broitman S. A.: Clearance of gut-derived endotoxins by the liver. Release and modification of 3H, 14C-lipopolysaccharide by isolated rat Kupffer cells. *Gastroenterology* 1989;96:456-461.
77. Freudenberg M. A., Kleine B., Galanos C.: The fate of lipopolysaccharide in rats: evidence for chemical alteration in the molecule. *Rev Infect Dis* 1984;6:483-487.
78. Diaz-Laviada I., Ainaga J., Portoles M. T., Carrascosa J. L., Muncio A. M., Pagani R.: Binding studies and localization of Escherichia coli lipopolysaccharide in cultured hepatocytes by an immunocolloidal-gold technique. *Histochem J* 1991;23:221-228.
79. Parent J. B.: Membrane receptors on rat hepatocytes for the inner core region of bacterial lipopolysaccharides. *J Biol Chem* 1990;265:3455-3461.
80. Fox E. S., Thomas P., Broitman S. A.: Uptake and modification of 125I-lipopolysaccharide by isolated rat Kupffer cells. *Hepatology* 1988;8:1550-1554.
81. Van Bossuyt H., De Zanger R. B., Wisse E.: Cellular and subcellular distribution of injected lipopolysaccharide in rat liver and its inactivation by bile salts. *J Hepatol* 1988;7:325-337.
82. Tenhunen R., Marver H. S., Schmid R.: The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1968;61:748-755.

83. Cruse I., Maines M. D.: Evidence suggesting that the two forms of heme oxygenase are products of different genes. *J Biol Chem* 1988;263:3348-3353.
84. Yoshida T., Oguro T., Numazawa S., Kuroiwa Y.: Effects of phorone (diisopropylidene acetone), a glutathione (GSH) depletor, on hepatic enzymes involved in drug and heme metabolism in rats: evidence that phorone is a potent inducer of heme oxygenase. *Biochem Biophys Res Commun* 1987;145:502-508.
85. Maines M. D., Mayer R. D., Ewing J. F., McCoubrey W. K., Jr.: Induction of kidney heme oxygenase-1 (HSP32) mRNA and protein by ischemia/reperfusion: possible role of heme as both promotor of tissue damage and regulator of HSP32. *J Pharmacol Exp Ther* 1993;264:457-462.
86. Bonkovsky H. L., Lincoln B., Healey J. F., Ou L. C., Sinclair P. R., Muller-Eberhard U.: Hepatic heme and drug metabolism in rats with chronic mountain sickness. *Am J Physiol* 1986;251:G467-474.
87. Sonin N. V., Garcia-Pagan J. C., Nakanishi K., Zhang J. X., Clemens M. G.: Patterns of vasoregulatory gene expression in the liver response to ischemia/reperfusion and endotoxemia. *Shock* 1999;11:175-179.
88. Wise C.D., Drabkin D.L.: Degradation of haemoglobin and hemin to biliverdin by a new cell-free system obtained from the hemophagous organ of dog placenta. *Fed. Proc.* 1964;23:323.
89. Maines M. D., Trakshel G. M., Kutty R. K.: Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal heme oxygenase. Only one molecular species of the enzyme is inducible. *J Biol Chem* 1986;261:411-419.
90. Keyse S. M., Tyrrell R. M.: Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:99-103.
91. Goda N., Suzuki K., Naito M., Takeoka S., Tsuchida E., Ishimura Y., Tamatani T., Suematsu M.: Distribution of heme oxygenase isoforms in rat liver. Topographic basis for carbon monoxide-mediated microvascular relaxation. *J Clin Invest* 1998;101:604-612.
92. Bissell D. M., Hammaker L., Schmid R.: Hemoglobin and erythrocyte catabolism in rat liver: the separate roles of parenchymal and sinusoidal cells. *Blood* 1972;40:812-822.
93. Song Y., Shi Y., Ao L. H., Harken A. H., Meng X. Z.: TLR4 mediates LPS-induced HO-1 expression in mouse liver: role of TNF-alpha and IL-1beta. *World J Gastroenterol* 2003;9:1799-1803.
94. Bauer I., Wanner G. A., Rensing H., Alte C., Miescher E. A., Wolf B., Pannen B. H., Clemens M. G., Bauer M.: Expression pattern of heme oxygenase isoenzymes 1 and 2 in normal and stress-exposed rat liver. *Hepatology* 1998;27:829-838.
95. Cauwels A., Janssen B., Buys E., Sips P., Brouckaert P.: Anaphylactic shock depends on PI3K and eNOS-derived NO. *J Clin Invest* 2006;116:2244-2251.
96. Sass G., Soares M. C., Yamashita K., Seyfried S., Zimmermann W. H., Eschenhagen T., Kaczmarek E., Ritter T., Volk H. D., Tiegs G.: Heme oxygenase-1 and its reaction product, carbon monoxide, prevent inflammation-related apoptotic liver damage in mice. *Hepatology* 2003;38:909-918.
97. Zuckerbraun B. S., Billiar T. R., Otterbein S. L., Kim P. K., Liu F., Choi A. M., Bach F. H., Otterbein L. E.: Carbon monoxide protects against liver failure through nitric oxide-induced heme oxygenase 1. *J Exp Med* 2003;198:1707-1716.

98. Leon P., Redmond H. P., Shou J., Daly J. M.: Interleukin 1 and its relationship to endotoxin tolerance. *Arch Surg* 1992;127:146-151.
99. Lehner M. D., Morath S., Michelsen K. S., Schumann R. R., Hartung T.: Induction of cross-tolerance by lipopolysaccharide and highly purified lipoteichoic acid via different Toll-like receptors independent of paracrine mediators. *J Immunol* 2001;166:5161-5167.
100. Neviere R. R., Li F. Y., Singh T., Myers M. L., Sibbald W.: Endotoxin induces a dose-dependent myocardial cross-tolerance to ischemia-reperfusion injury. *Crit Care Med* 2000;28:1439-1444.
101. Ogle C. K., Guo X., Chance W. T., Ogle J. D.: Induction of endotoxin tolerance in rat bone marrow cells by in vivo infusion of tumor necrosis factor. *Crit Care Med* 1997;25:827-833.
102. Kawasaki T., Ogata M., Kawasaki C., Tomihisa T., Okamoto K., Shigematsu A.: Surgical stress induces endotoxin hyporesponsiveness and an early decrease of monocyte mCD14 and HLA-DR expression during surgery. *Anesth Analg* 2001;92:1322-1326.
103. Barreiro E., Comtois A. S., Mohammed S., Lands L. C., Hussain S. N.: Role of heme oxygenases in sepsis-induced diaphragmatic contractile dysfunction and oxidative stress. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002;283:L476-484.
104. Yet S. F., Tian R., Layne M. D., Wang Z. Y., Maemura K., Solovyeva M., Ith B., Melo L. G., Zhang L., Ingwall J. S., Dzau V. J., Lee M. E., Perrella M. A.: Cardiac-specific expression of heme oxygenase-1 protects against ischemia and reperfusion injury in transgenic mice. *Circ Res* 2001;89:168-173.
105. Taille C., Foresti R., Lanone S., Zedda C., Green C., Aubier M., Motterlini R., Boczkowski J.: Protective role of heme oxygenases against endotoxin-induced diaphragmatic dysfunction in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:753-761.
106. Yachie A., Niida Y., Wada T., Igarashi N., Kaneda H., Toma T., Ohta K., Kasahara Y., Koizumi S.: Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency. *J Clin Invest* 1999;103:129-135.
107. Sass G., Seyfried S., Parreira Soares M., Yamashita K., Kaczmarek E., Neuhuber W. L., Tiegs G.: Cooperative effect of biliverdin and carbon monoxide on survival of mice in immune-mediated liver injury. *Hepatology* 2004;40:1128-1135.
108. Chaea H. J., Kim H. R., Kang Y. J., Hyun K. C., Kim H. J., Seo H. G., Lee J. H., Yun-Choi H. S., Chang K. C.: Heme oxygenase-1 induction by (S)-enantiomer of YS-51 (YS-51S), a synthetic isoquinoline alkaloid, inhibits nitric oxide production and nuclear factor-kappaB translocation in ROS 17/2.8 cells activated with inflammatory stimulants. *Int Immunopharmacol* 2007;7:1559-1568.
109. Downard P. J., Wilson M. A., Spain D. A., Matheson P. J., Siow Y., Garrison R. N.: Heme oxygenase-dependent carbon monoxide production is a hepatic adaptive response to sepsis. *J Surg Res* 1997;71:7-12.
110. Koch A., Boehm O., Zacharowski P. A., Loer S. A., Weimann J., Rensing H., Foster S. J., Schmidt R., Berkels R., Reingruber S., Zacharowski K.: Inducible nitric oxide synthase and heme oxygenase-1 in the lung during lipopolysaccharide tolerance and cross tolerance. *Crit Care Med* 2007;35:2775-2784.

111. Flach R., Majetschak M., Heukamp T., Jennissen V., Flohe S., Borgermann J., Obertacke U., Schade F. U.: Relation of ex vivo stimulated blood cytokine synthesis to post-traumatic sepsis. *Cytokine* 1999;11:173-178.
112. Munoz C., Carlet J., Fitting C., Misset B., Bleriot J. P., Cavaillon J. M.: Dysregulation of in vitro cytokine production by monocytes during sepsis. *J Clin Invest* 1991;88:1747-1754.
113. Levere R. D., Martasek P., Escalante B., Schwartzman M. L., Abraham N. G.: Effect of heme arginate administration on blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *J Clin Invest* 1990;86:213-219.
114. Iwasashi H., Suzuki M., Unno M., Utiyama T., Oikawa M., Kondo N., Matsuno S.: Inhibition of heme oxygenase ameliorates sepsis-induced liver dysfunction in rats. *Surg Today* 2003;33:30-38.
115. Otterbein L. E., Mantell L. L., Choi A. M.: Carbon monoxide provides protection against hyperoxic lung injury. *Am J Physiol* 1999;276:L688-694.
116. Clark J. E., Foresti R., Sarathchandra P., Kaur H., Green C. J., Motterlini R.: Heme oxygenase-1-derived bilirubin ameliorates postischemic myocardial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;278:H643-651.
117. Greabu M., Olinescu R., Kummerow F. A., Crocna D. O.: The levels of bilirubin may be related to an inflammatory condition in patients with coronary heart disease. *Acta Pol Pharm* 2001;58:225-231.
118. Vitek L., Jirsa M., Brodanova M., Kalab M., Marecek Z., Danzig V., Novotny L., Kotal P.: Gilbert syndrome and ischemic heart disease: a protective effect of elevated bilirubin levels. *Atherosclerosis* 2002;160:449-456.
119. Horvath I., Donnelly L. E., Kiss A., Paredi P., Kharitonov S. A., Barnes P. J.: Raised levels of exhaled carbon monoxide are associated with an increased expression of heme oxygenase-1 in airway macrophages in asthma: a new marker of oxidative stress. *Thorax* 1998;53:668-672.
120. Zayasu K., Sekizawa K., Okinaga S., Yamaya M., Ohru T., Sasaki H.: Increased carbon monoxide in exhaled air of asthmatic patients. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:1140-1143.
121. Paredi P., Kharitonov S. A., Leak D., Shah P. L., Cramer D., Hodson M. E., Barnes P. J.: Exhaled ethane is elevated in cystic fibrosis and correlates with carbon monoxide levels and airway obstruction. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:1247-1251.
122. Paredi P., Biernacki W., Invernizzi G., Kharitonov S. A., Barnes P. J.: Exhaled carbon monoxide levels elevated in diabetes and correlated with glucose concentration in blood: a new test for monitoring the disease? *Chest* 1999;116:1007-1011.
123. Harrison, Tinsley R.: *Harrison's principles of internal medicine*. 2004.

Schriftliche Erklärung

Ich erkläre, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

"Die Rolle der Häm-Oxygenase 1 in der Endotoxin vermittelten Leberprotektion"

in der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf unter Betreuung und Anleitung von Univ.-Prof. Dr. Dr. med. Kai Zacharowski, FRCA mit Unterstützung durch Dr. Alexander Koch und Dr. Olaf Böhm ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht.

Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Düsseldorf, den 16.11.2009

Christian Fricke