

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin III des
Universitätsklinikums Halle (Saale)
Direktor: Prof. Dr. med. Stefan Frantz

Anti-inflammatorische Strategien beim hämorrhagischen Schock in der Ratte

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Cathleen Klappstein, geb. Beyer
geboren am 27.03.1984 in Leipzig

Betreuer: Prof. Dr. med. Michael Buerke

Gutachter: apl. Prof. Dr. med. Michael Buerke, Siegen/MF
Prof. Dr. med. Barbara Seliger
Prof. Dr. med. Michael Hilker, Regensburg

26.01.2017

29.10.2019

Für meine Eltern

Referat

Der hämorrhagische Schock ist eine Komplikation größerer Blutungen und weist eine hohe Letalität auf. Im Fokus aktueller Untersuchungen steht dabei die Entwicklung eines systemischen Entzündungsgeschehens durch Ischämie und Reperfusion, in welchem der Transkriptionsfaktor NF- κ B eine herausragende Position einnimmt.

In der vorliegenden Dissertation wurde der Einfluss der anti-inflammatorischen Substanzen BAY 11-7085 und Pioglitazone auf das Überleben, die Überlebenszeit sowie verschiedene Kreislaufparameter nach hämorrhagischem Schock in Ratten untersucht. Weiterhin wurde die Veränderung der Expression reaktiver Proteine mittels Western Blot sowie die Myeloperoxidaseaktivität als Marker der Akkumulation von Neutrophilen Granulozyten in den Organen Herz, Leber, Lunge und Niere untersucht. Die Versuchstiere wurden hierzu in drei Gruppen eingeteilt: eine Sham-Gruppe, eine Schock + Vehikel-Gruppe sowie eine Schock + Medikament-Gruppe. Der hämorrhagische Schock wurde für 60 Minuten mittels eines druckkontrollierten Modells induziert. Anschließend erfolgte die Reinfusion des entnommenen Blutes und die Nachbeobachtungsphase von maximal drei Stunden. BAY 11-7085 wurde dabei 15 Minuten vor Reinfusion des entnommenen Blutes intraarteriell, Pioglitazone 12 – 16 Stunden vor Beginn des Versuches intraperitoneal verabreicht. Nach Ende der Nachbeobachtungsphase bzw. Versterben der Tiere wurden die Organe entnommen, von diesen Western Blots angefertigt sowie die Myeloperoxidaseaktivität bestimmt.

Für BAY 11-7085 zeigte sich eine Tendenz zur Verbesserung der Überlebensrate sowie zur Verlängerung der Überlebenszeiten nach hämorrhagischem Schock. Mit dem Medikament behandelte Tiere zeigten eine Tendenz zur Stabilisierung des Mittleren arteriellen Druckes. Die Herzfrequenz wurde nicht positiv beeinflusst. BAY 11-7085 scheint einer schockbedingten Schrankenstörung entgegenzuwirken, was sich an einem stabilen Hämatokrit zeigte.

Für Pioglitazone konnte eine signifikante Verbesserung der Überlebensrate sowie zur Verlängerung der Überlebenszeiten nachgewiesen werden. Behandelte Tiere zeigten eine Tendenz zur Stabilisierung des Mittleren arteriellen Druckes und der Herzfrequenz. Einer Schrankenstörung scheint Pioglitazone jedoch nicht entgegenzuwirken. Für den semiquantitativen Nachweis der Proteine HIF-1 α , VEGF, I κ B- α , p38 und T-bet sowie den Myeloperoxidasenachweis zeigten sich für beide Medikamente in den einzelnen Organen unterschiedliche Ergebnisse. Diese lassen aber stellenweise einen protektiven Effekt auf die Expression NF- κ B-abhängiger Proteine und damit auf die inflammatorische Reaktion und deren Folgen vermuten. Die aktuellen Ergebnisse sollten in weiteren tierexperimentellen Studien mit Veränderungen der Medikamentenkonzentration, Kombination beider Medikamente oder anderer Darreichungsformen sowie Lösungsmittel weiter untersucht werden.

Klappstein, Cathleen: Anti-inflammatorische Strategien beim hämorrhagischen Schock in der Ratte, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 79 Seiten, 2017

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole.....	III
1 Einleitung und theoretische Grundlagen.....	1
1.1 Einleitung.....	1
1.2 Definition und Pathophysiologie des hämorrhagischen Schocks.....	2
1.2.1 Definition.....	2
1.2.2 Schockformen.....	2
1.2.3 Pathophysiologie des hämorrhagischen Schocks.....	3
1.3 Organveränderungen im Schock.....	5
1.3.1 Lunge.....	5
1.3.2 Leber.....	6
1.3.3 Nieren.....	6
1.3.4 Herz.....	7
1.4 Ischämie und Reperfusionsschaden.....	7
1.5 Interventionsmöglichkeiten im hämorrhagischen Schock – NF-kB.....	10
1.5.1 Definition, Bestandteile und Vorläuferproteine.....	10
1.5.2 Aktivierung von NF-kB.....	12
1.5.3 Intervention mit BAY 11-7085 und Pioglitazone Hydrochloride.....	14
2 Zielstellung der Arbeit.....	20
3 Materialien.....	21
3.1 Tiermodell zum hämorrhagischen Schock.....	21
3.2 Proteinnachweis mittels Western Blot.....	22
3.3 Myeloperoxidasenachweis.....	23
4 Methoden.....	24
4.1 Tiermodell zum hämorrhagischen Schock.....	24
4.2 Proteinnachweis mittels Western Blot.....	26
4.3 Myeloperoxidasenachweis.....	30
5 Ergebnisse.....	31
5.1 BAY 11-7085.....	31
5.1.1 Effekte im Tiermodell zum hämorrhagischen Schock.....	31
5.1.2 Effekte auf die Proteinexpression.....	36
5.1.3 Effekte auf die MPO-Aktivität.....	39

5.2 Pioglitazone Hydrochloride	40
5.2.1 Effekte im Tiermodell zum hämorrhagischen Schock	40
5.2.2 Effekte auf die Proteinexpression	45
5.2.3 Effekte auf die MPO-Aktivität.....	47
6 Diskussion	48
6.1 Das verwendete Schockmodell	48
6.2 Effekte der Medikamente auf die Überlebensraten und -zeiten	51
6.3 Effekte der Medikamente auf Hämodynamik und Hämatokrit	52
6.4 Effekte der Medikamente auf die Proteinexpression	55
6.4.1 HIF-1 α	55
6.4.2 VEGF	57
6.4.3 I κ B- α	58
6.4.4 p38.....	60
6.4.5 T-bet.....	61
6.4.6 Zusammenfassung	62
6.5 Effekte der Medikamente auf die MPO – Aktivität	63
7 Limitationen der Studien.....	66
8 Zusammenfassung und Ausblick.....	67
9 Literaturverzeichnis.....	69
10 Thesen	79

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

ARDS	acute respiratory distress syndrome
ATP	Adenosintriphosphat
BAY	BAY 11-7085
BSA	bovine serum albumine
DIG	Disseminierte intravasale Gerinnung
DMSO	Dimethylsulfoxid
HF	Herzfrequenz
HIF-1	Hypoxie-induzierbarer Faktor 1
HSP	Hitzeschockprotein
i.a.	intraarteriell
I.E.	Internationale Einheiten
i.p.	intraperitoneal
I κ B	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor
KG	Körpergewicht
KIS	Kininsystem
KPL	Komplementsystem
MAD	Mittlerer arterieller Druck
MAP	mitogen-activated protein
MAPK	mitogen-activated protein kinases
MODS	multiple organ dysfunction syndrome
MPO	Myeloperoxidase
NF- κ B	Nuclear Factor kappa B
NLS	nuclear localization signal
NO	Stickstoffmonoxid
OP	Operation
PA I	Plasminogen-Aktivator I
PAF	Plättchenaktivierender Faktor
PIO	Pioglitazone Hydrochloride
PPAR- γ	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
PRI	Pressure Rate Index
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
Rcf	relative centrifugal force, relative Zentrifugalbeschleunigung
ROS	reactive oxygen species
RP	Reperfusion
RXR	Retinoid acid receptor
SIRS	systemic inflammatory response syndrom
SP	Stabilisierungsphase
T-bet	T-Box-Transkriptionsfaktor
U/g, U/l	Units pro Gramm Gewebeprobe, Units pro Liter Probenvolumina
VEGF	vascular endothelial growth factor

1 Einleitung und theoretische Grundlagen

1.1 Einleitung

Weltweit sterben täglich ca. 16.000 Menschen nach Traumen (beispielsweise durch Unfälle). Damit sind Traumen eine der häufigsten Todesursachen bei Menschen zwischen 5 und 44 Jahren, etwa ein Drittel der dabei auftretenden Todesfälle werden durch massive Blutungen beziehungsweise (bzw.) Blutverluste hervorgerufen. [Krug et al., 2000] Der hämorrhagische Schock, als eine von vielen Indikationen zur intensivmedizinischen Behandlung, ist eine Komplikation dieser massiven Blutungen. Er ist charakterisiert durch eine Gewebeischämie (erste Phase), welcher nach Beginn der Therapie durch Rückgabe bzw. Ersatz des verlorenen Blutvolumens eine Reperfusionphase (zweite Phase) folgt. [Kan et al., 2008a; Hurt et al., 2009] Der Blutverlust an sich führt zunächst zu einem verminderten venösen Rückstrom und damit zur Abnahme der Herzleistung mit Abfall des Blutdruckes und damit zum Kreislaufzusammenbruch. Um dem entgegenzuwirken wird der Sympathikus aktiviert, es folgen Vasokonstriktion und Steigerung der Herzleistung durch Zunahme der Herzfrequenz und Flüssigkeitsretention. Diese Mechanismen führen insgesamt zu einer Kreislaufzentralisation und verminderten Gewebedurchblutung (Gewebeischämie). Es kommt zur Hypoxie. In dieser ersten Phase nach dem Trauma erfolgt dabei reaktiv die Ausschüttung von Zytokinen, um zum einen dem verminderten Sauerstoffangebot von zellulärer Seite entgegenzuwirken, aber auch als eine Art Signalkette, um andere Zellen auf veränderte Bedingungen hinzuweisen. [Bültmann, 2004] In der zweiten Phase, der sog. Reperfusionphase kommt es zu weiterer Schädigung auch von zunächst nicht betroffenen Organen. Die in der Ischämiephase ausgeschütteten Zytokine bewirken dabei im Organismus eine Entzündungsreaktion (Inflammation), durch welche weitere Zytokine und andere Botenstoffe ausgeschüttet werden. Durch die Wiederdurchblutung, welche u.a. durch die Gabe von Flüssigkeit bzw. Blut bedingt ist, erreichen diese Botenstoffe nun auch diejenigen Organe, die zunächst nicht durch den Blutverlust an sich betroffen, sondern nur im Zuge der Hypoxie minderdurchblutet waren und setzen auch hier eine Entzündungsreaktion in Gang, die zu verminderter Organleistung und später zum Ausfall der gesamten Organfunktion führt. Sind mehrere Organe betroffen, spricht man vom sog. MODS (multiple organ dysfunction syndrome). Im Rahmen dieses Multiorganversagens kann es schließlich zum Tod des Individuums kommen. [Bültmann, 2004]

Diese Botenstoffe sind unter anderem die verschiedenen proinflammatorischen Zytokine, zu denen auch der Tumornekrosefaktor alpha [Pearson et al., 2001] gehört. Dieser aktiviert u.a. den Transkriptionsfaktor NF-kB, ein Schlüsselprotein im entzündlichen Geschehen nach hämorrhagischem Schock. In der vorliegenden Arbeit soll daher der Einfluss von NF-kB-hemmenden Medikamenten auf die systemische Entzündungsreaktion nach hämorrhagischem

Schock in Ratten untersucht werden. Dabei werden sowohl klinische Parameter, als auch Überlebenszeit und Western Blots zum Nachweis der Expression verschiedener Proteine in die Betrachtung eingeschlossen. Desweiteren soll die Myeloperoxidaseaktivität als Marker für die Akkumulation von Neutrophilen Granulozyten in den Schockorganen untersucht werden.

1.2 Definition und Pathophysiologie des hämorrhagischen Schocks

1.2.1 Definition

Als Schock wird ein generalisiertes, lebensbedrohliches Kreislaufversagen der Mikrozirkulation mit einer Gewebeschädigung durch Hypoxie, toxische Metabolite und reactive oxygen species (reaktive Sauerstoffspezies, ROS) bezeichnet. [Traber, 1993, Hightower und Intaglietta, 2007] Schock ist also ein pathophysiologischer Zustand, der durch eine systemische und lokale Minderperfusion gekennzeichnet ist. [Beerthuisen, 1993, Efrati et al., 2008; Hurt et al., 2009] Die Mangel durchblutung der terminalen Endstrombahn führt dabei über verschiedene Mechanismen zu einer Beeinträchtigung der Funktion lebenswichtiger Organe wie Leber, Lunge, Niere, Herz, Gehirn und Darm. Die Entwicklung eines Schocks erfolgt dabei progressiv über mehrere Stadien. Der Ablauf ist durch kontinuierliche Übergänge von einer zur nächsten schwerwiegenderen Phase charakterisiert, wenn die Ursache nicht durch therapeutische Maßnahmen behoben werden kann. Zunächst ist das Schockstadium reversibel, es kann aber in eine irreversible Phase übergehen. Am Ende steht eine systemische inflammatorische Reaktionskette, die durch hämodynamische, metabolische und zelluläre Veränderungen (Ansammlung von neutrophilen Leukozyten) gekennzeichnet ist und mit Multiorganversagen und Tod des Individuums endet [Beerthuisen, 1993, Zou et al., 2003, Zingarelli et al., 2009b].

1.2.2 Schockformen

Grundsätzlich lassen sich verschiedene Formen des Schocks unterscheiden (Tabelle 1):

Tabelle 1: Schockarten nach [Bültmann, 2004]

Schockform	Ätiologie
hypovolämischer / hämorrhagischer Schock	Plasma- und Elektrolytverluste, Blutverluste
kardiogener Schock	Myokardinfarkt, Herzrhythmusstörungen
septischer Schock	Bakterien und deren Toxine
anaphylaktischer Schock	Allergene wie Kontrastmittel, Medikamente
neurogener Schock	Intoxikationen, Anästhesie
endokriner Schock	Hyperthyreose, Morbus Addison
toxischer Schock	Toxine (auch Medikamente)

Der hypovolämische Schock ist die Folge eines akuten Verlustes von zirkulierendem Blut (Hypovolämie) [Torres et al., 2004]. Hier können verschiedene Ursachen zugrunde liegen:

- massiver Blutverlust (dann als hämorrhagischer Schock bezeichnet) nach Trauma, gastrointestinalen Blutungen, Tumorblutungen und Gefäßrupturen (Aortenaneurysma) [Santone et al., 2008]
- Flüssigkeitsverlust oder Störungen der Flüssigkeitsverteilung bei schwerem rezidivierendem Erbrechen, Diarrhö, Verbrennungen, akuter Pankreatitis, Aszites oder Peritonitis [Brüning, 2004].

Der hypovolämische / hämorrhagische Schock entsteht, wenn durch große Blutverluste bzw. Einblutungen in Gewebe das nunmehr noch zirkulierende Blutvolumen eine adäquate Gewebepfusion nicht mehr gewährleisten kann. Daraus resultieren eine metabolische Azidose durch Hypoxie des Gewebes und andere Stoffwechselprozesse, die zu schockbedingten Organ dysfunktionen und hoher Mortalität führen. [Santone et al., 2008; Hurt et al., 2009]

1.2.3 Pathophysiologie des hämorrhagischen Schocks

Reversibles Schockstadium

Eine akute Hypovolämie (Blutverlust) führt zunächst zu einem verminderten Rückstrom venösen Blutes und damit zu einer Abnahme des Herzzeitvolumens und des Blutdruckes. Daraufhin werden zentrale und periphere Druckrezeptoren stimuliert, was wiederum eine sympatho-adrenale Reaktion mit Sekretion von Noradrenalin und Adrenalin bewirkt. Die Folgen sind eine starke Arteriolenkonstriktion der Haut, des Splanchnikusgebietes und der Nieren. [Beerthuisen, 1993, Bültmann, 2004, Hightower und Intaglietta, 2007, Torres Filho et al., 2010] Dadurch kommt es zu einer Verlagerung des Blutes aus den oben genannten Organen in den Kreislauf von Lunge, Herz und Gehirn (Zentralisation).

Durch die Minderdurchblutung der Nieren wird das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) aktiviert. Dieses verstärkt die adrenerge Vasokonstriktion und führt über die Sekretion von Aldosteron zu einer vermehrten tubulären Rückresorption von Natrium und Wasser mit dem Ziel, das fehlende Blutvolumen wieder aufzufüllen. [Bültmann, 2004]

Bei Blutverlusten von bis zu 25 % (ca. 1 Liter) kann der Blutdruck durch diese Kompensationsmechanismen stabil gehalten werden. [Bültmann, 2004] Durch Flüssigkeitsverabreichung kann der ursprüngliche Zustand des Organismus wieder hergestellt werden (reversibles Schockstadium). Bei persistierender Schocksituation (d.h. ohne Gabe von Flüssigkeit und weiterer therapeutischer Maßnahmen) sowie größeren Blutverlusten (Blutverluste von etwa 40 %), geht dieses reversible in ein irreversibles Schockstadium über.

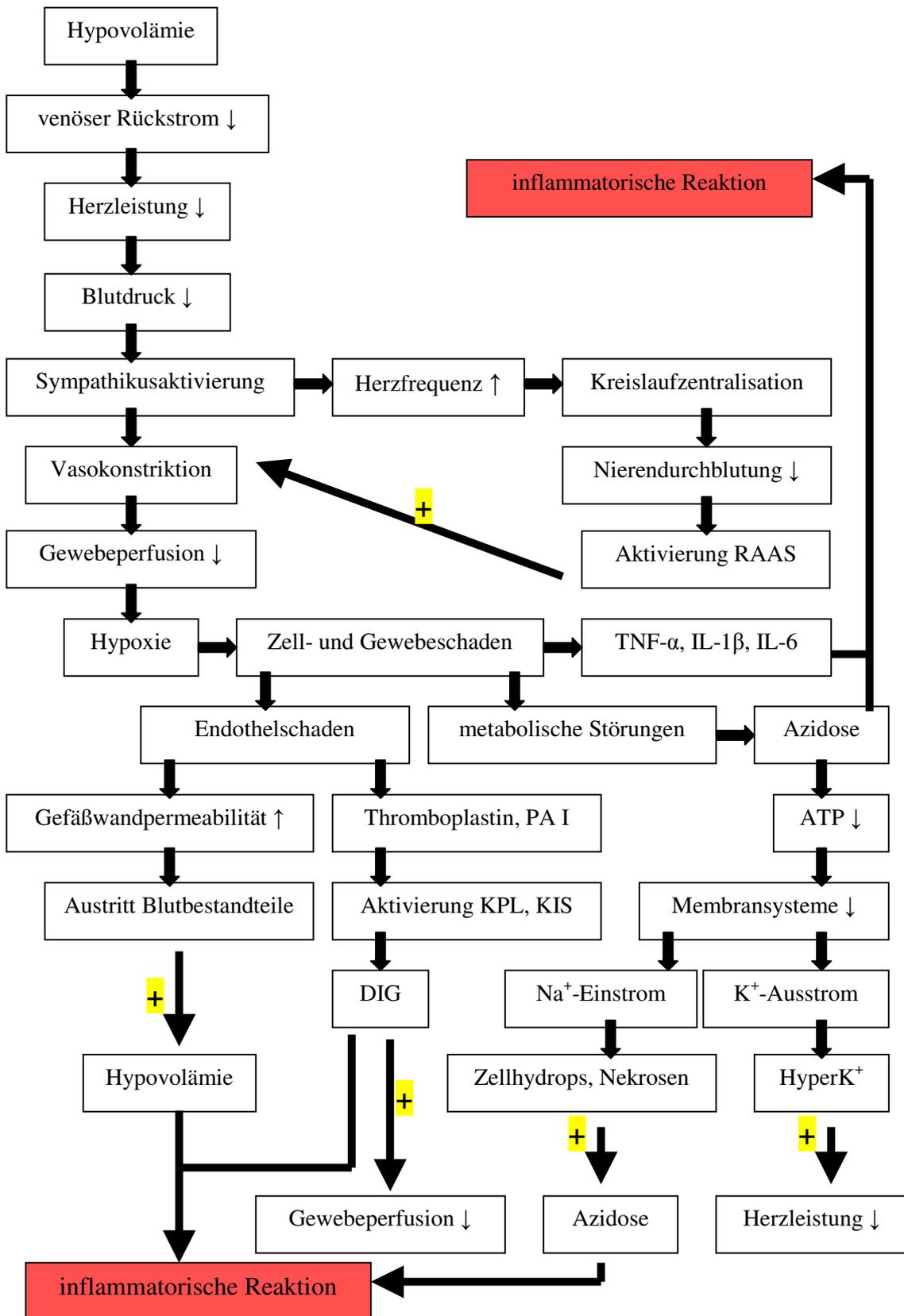


Abbildung 1: Pathophysiologie des hämorrhagischen Schocks mit den möglichen Ausgangspunkten der folgenden inflammatorischen Kaskaden modifiziert nach [Bültmann, 2004]

Irreversibles Schockstadium

Die Minderperfusion des Gewebes verursacht ein Nachlassen des arteriölen Widerstandes bei erhaltener venulärer Kontraktion sowie einen hypoxischen Endothelschaden. Der hydrostatische Druck im Kapillarbett und die Gefäßwandpermeabilität steigt, es kommt zum Austritt von Flüssigkeit in das Interstitium mit weiterer Verminderung des Blutvolumens. [Hightower und Intaglietta, 2007] Auch metabolische Störungen ergeben sich aus der Hypoxie. Durch das verminderte Sauerstoffangebot kommt es zu einer Azidose mit ungenügender Produktion von Adenosintriphosphat (ATP), Versagen der ATP-abhängigen membranären Transportsysteme und Umschaltung auf die anaerobe Glykolyse. Der Ausfall der Transportsysteme führt in den hypoxischen Zellen zum Einstrom von Natrium und Wasser (hydropische Schwellung) und zum Ausstrom von Kalium in Interstitium und Blut (Hyperkaliämie). Weiterhin kommt es zur Überladung der Zelle mit Kalzium. Der Sauerstoffmangel in den Zellen und Geweben führt zu Nekrosen, welche die Azidose verstärken. Die Azidose sowie die Elektrolytverschiebungen wirken sich negativ auf die Herzleistung aus, d.h. es kommt zur Abnahme des Herzzeitvolumens und zum Absinken des Blutdruckes. [Bültmann, 2004, Buerke et al., 2008]

Die hypoxische Schädigung von Endothel und Gewebe führt schließlich auch zur Freisetzung thromboföördernder Faktoren wie Thromboplastin und Plasminogen-Aktivator I (PA I) ins Blut. Plasminogen-Aktivator I ist dabei in der Lage, das Komplement- [Younger et al., 2001] und Kininsystem (KPL bzw. KIS) zu aktivieren, wodurch die Exsudation und Vasodilatation noch verstärkt werden. Thromboplastin hingegen fördert die Plättchenaktivierung und –aggregation und damit die disseminierte intravasale Gerinnung (DIG) mit Mikrothrombenbildung. [Bültmann, 2004]

Durch die hypoxisch bedingte Endothelschädigung wird eine inflammatorische Kaskade [Zou et al., 2003] mit Emigration von neutrophilen Granulozyten und Leukozyten aus dem Blut in das Gewebe [Zakaria et al., 2007] induziert und der Gewebeschaden verstärkt. Die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten stellt dabei den wesentlichen Initiator für das Entstehen des sog. SIRS (systemic inflammatory response syndrome) dar. [Hierholzer et al., 1998; Hirano et al., 2006] Es kommt zu schweren ischämischen Gewebe- und Organschäden (Multiorganversagen), insbesondere von Herz, Lunge, Gehirn und Nieren und zum Tod des Patienten im irreversiblen Schock.

1.3 Organveränderungen im Schock

1.3.1 Lunge

Todesursache beim (hämorrhagischen) Schock sind die schweren Schäden der lebensnotwendigen Organe [Meldrum et al., 1997; Kan et al., 2008a] wie Lunge, Leber, Herz

und Niere. Wenn eines oder mehrere dieser Organe involviert sind, spricht man vom sog. MODS (multiple organ dysfunction syndrome). [Baue, 1993, Carden und Granger, 2000, McDonald et al., 2001, Meng et al., 2001, Younger et al., 2001, Efrati et al., 2008, Santone et al., 2008] Während bzw. nach akutem Schockgeschehen zeigen diese Organe charakteristische Veränderungen, die im folgenden kurz dargestellt werden.

Beim hämorrhagischen Schock kommt es durch Hypoperfusion der Lunge zu einer inflammatorisch bedingten respiratorischen Insuffizienz, auch ARDS (acute respiratory distress syndrome) genannt. [Khadaroo et al., 2004; Sato et al., 2008] Typisch sind hierbei Nekrosen der Pneumozyten und Endothelzellen des Kapillarbettes, die Ausbildung eines interstitiellen, proteinreichen alveolären Lungenödems und die intravasale Aggregation von neutrophilen Granulozyten sowie subpleuralen Blutungen. [Bültmann, 2004, Zingarelli et al., 2009b]

Auch bei dem Versuch der Wiederherstellung der Durchblutung der Lunge mit Gabe von Erythrozytenkonzentraten kann dieser Schaden verursacht werden, diese akute Lungeninsuffizienz ist transfusionsabhängig und tritt üblicherweise ca. sechs Stunden nach Gabe der Blutprodukte auf. Als ursächlich werden Antikörper gesehen, die im Empfänger bereits vorhanden sind und sich gegen die transfundierten Blutkörperchen richten. Es kommt zur Volumenüberladung der Lunge ohne begleitende Herzinsuffizienz [Bültmann, 2004].

1.3.2 Leber

Im hämorrhagischen Schock ist die Leber zumeist vergrößert, von bleicher bis gräulicher Farbe und durch ein interstitielles Ödem mit Gewichtsvermehrung gekennzeichnet. Durch unzureichende Stoffwechselprozesse im Schockgeschehen (β -Oxidation der Fettsäuren) kommt es weiterhin zu einer Leberparenchymverfettung und zentralen Leberparenchymnekrosen. Histologisch zeigen sich massive Ansammlungen von Leukozyten und degenerative Veränderungen der Hepatozyten bis hin zu Zellnekrosen. Die Lebersinusoiden sind mit Detritus (Zerfallsprodukte wie abgestorbene Zellen, Proteine) überfüllt und deshalb erweitert. [Dinges, 1993]

1.3.3 Nieren

Der hämorrhagische Schock führt zu einem akuten ischämischen Nierenversagen, welches durch Parenchym- bzw. Tubulusschäden gekennzeichnet ist. Die Nieren sind blass, geschwollen und nekrotisch. Mikroskopisch zeigt sich eine ödematöse Verbreiterung des Interstitiums, ischämieinduzierte tubuläre Nekrosen und hyaline Mikrothromben. Die distalen Tubuluslumina können mit Detritus gefüllt sein. [Bültmann, 2004]

1.3.4 Herz

Durch massiven Blutverlust (über 30 % des Blutvolumens) kommt es zunächst zu einem Abfall des kardialen Output und des mittleren arteriellen Drucks. Die anschließende zerebrale Ischämie führt über eine Sympathikusaktivierung zu einer Vasokonstriktion im Gefäßsystem. Damit einhergehend ist die Vasodilatation v.a. der Koronargefäße beeinträchtigt, sodass die ausreichende Perfusion des Herzens in der Diastole nicht gewährleistet ist, kardiales Pumpversagen und Arrhythmien sind die Folge. [Traber, 1993] Durch die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wird die kardiale Dysfunktion weiter verstärkt. [Santone et al., 2008] Im Herzmuskel kommt es deshalb im Zuge des Schockgeschehens zu Myokardiolysen, subendokardialen Myokardinfarkten und Blutungen. [Bültmann, 2004]

1.4 Ischämie und Reperfusionsschaden

Die Organschäden beim hämorrhagischen Schock sind jedoch nicht nur durch die Minderperfusion (Ischämie) des entsprechenden Gewebes begründet, ein wesentlicher Teil tritt in Folge der sog. Reperfusion durch die Gabe von Erythrozytenkonzentraten und Infusionen auf. [Carden und Granger, 2000, Hightower und Intaglietta, 2007] Die erneute Durchblutung des ischämischen Organs führt in diesem zu zusätzlichen Schäden (Reperfusionssparadox) [Carden und Granger, 2000, Hirano et al., 2006, Hightower und Intaglietta, 2007].

Reperfusionsschäden spielen in verschiedenen Teilgebieten der Medizin eine große Rolle, wie die folgende Tabelle verdeutlichen soll:

Tabelle 2: Beispiele für Reperfusionsschäden in der Medizin nach [Carden und Granger, 2000]

Transplantationsmedizin	nach erfolgter Transplantation und Wiedereinsetzen der Durchblutung des Organs
Kardiologie	nach Behandlung des akuten Myokardinfarkts durch perkutane transluminale Koronarangioplastie oder Thrombolyse, Bypassoperation
Gefäßchirurgie	nach Revaskularisation eines verschlossenen arteriellen Stromgebietes (Embolusentfernung)
Traumatologie	nach Verletzung großer Extremitätenarterien mit Durchblutungsminderung bzw. -stillstand eines Organs

Der pathophysiologische Ablauf, der zum Reperfusionsschaden führt, entwickelt sich dabei auf folgende Weise: Der Sauerstoffmangel während der Ischämie führt zu einem vollständigen Verbrauch von ATP (mit anschließendem Abbau zu Inosin), ohne dass dieses über die Atmungskette nachgeliefert werden kann. In der Folge können die ATP-abhängigen Ionentransportsysteme ihre Funktion nicht mehr ausführen, es kommt u.a. zum pathologischen Kaliumaus- und Calciumeinstrom in die Zellen mit der Folge von Zellschwellungen und

Nekrosen mit anschließender Adhärenz von neutrophilen Granulozyten und Leukozyten. Aufgrund des massiven Anfalls von Inosin und Hypoxanthin (Abbau von Adenosin: Desaminierung zu Inosin und anschließende Ribose-Abspaltung mit Umwandlung in Hypoxanthin) wird die Aktivität der Xanthinoxidase im Blutplasma erhöht. [Carden und Granger, 2000, McDonald et al., 2001, Hightower and Intaglietta, 2007]

In der Initialphase nach Reperfusion kommt es unter Verbrauch von Sauerstoff zum Abbau von Hypoxanthin zu Harnsäure durch die Xanthinoxidase, die Harnsäure wird anschließend über die Nieren ausgeschieden. Bei diesem Abbau entstehen Sauerstoffradikale (Superoxide) in großer Menge. Desweiteren produzieren auch die aktivierten Endothelzellen des geschädigten Gewebes mehr Superoxide als Stickstoffmonoxid (NO).¹ [Kan et al., 2008a] Es kommt zu einer Dysbalance zwischen den beiden Mediatoren. Diese Superoxide schädigen die bereits durch die Ischämie in ihrer Funktion eingeschränkten Organe weiter (beeinträchtigte endothelabhängige Dilatation von Arteriolen mit weiterer Hypoxie des betreffenden Gewebes, Veränderungen der Zellmembranpermeabilität mit Verstärkung eines bereits bestehenden Ödems, DNA-Schäden, weitere Verschlechterung der Stoffwechsellage, Apoptose). [Beerthuisen, 1993, Carden und Granger, 2000, Hirano et al., 2006] Außerdem führen sie zu einer erhöhten Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und anderen Mediatoren (Adhäsionsmoleküle, Plättchenaktivierender Faktor - PAF), welche eine systemische Inflammationsreaktion (SIRS) hervorrufen. Daneben locken diese Sauerstoffradikale weitere neutrophile Granulozyten [Zou et al., 2003] an, diese bilden Adhäsionsmoleküle aus und verstärken die Bindung der Leukozyten an das Endothel der kleinen Blutgefäße. Gleichzeitig bewirken sie eine Emigration der Leukozyten in das umliegende Gewebe. Auch neutrophile Granulozyten werden angezogen und angeregt und setzen wiederum große Mengen an Sauerstoffradikalen und Botenstoffen (PAF, Leukotriene, proinflammatorische Zytokine) frei, ein Circulus vitiosus entsteht. [Buerke et al., 1998, Carden und Granger, 2000, Hirano et al., 2006, Buerke et al., 2007, Hurt et al., 2009]

Intrazellulär finden im Zusammenhang mit den oben beschriebenen Vorgängen ebenfalls weitreichende Veränderungen statt, viele davon sind durch einen wichtigen Transkriptionsfaktor, den NF- κ B, bedingt.

Im folgenden sollen zwei Abbildungen die dargestellten Sachverhalte ergänzen bzw. verdeutlichen.

¹ Im gesunden Gefäßendothel überwiegt die Produktion von NO gegenüber Superoxiden, diese Balance ist unter anderem für die Regelung des Tonus von arteriellen Blutgefäßen (Guanylatzyklase in glatten Muskelzellen), die Minimierung der Adhäsion von Leukozyten an das Endothel der Gefäße und die Verhinderung der Thrombenbildung von großer Wichtigkeit. Ist diese Balance gestört, kommt es zu entsprechenden Veränderungen der genannten Größen mit weitreichenden Folgen für den Gesamtorganismus. (Carden and Granger, 2000)

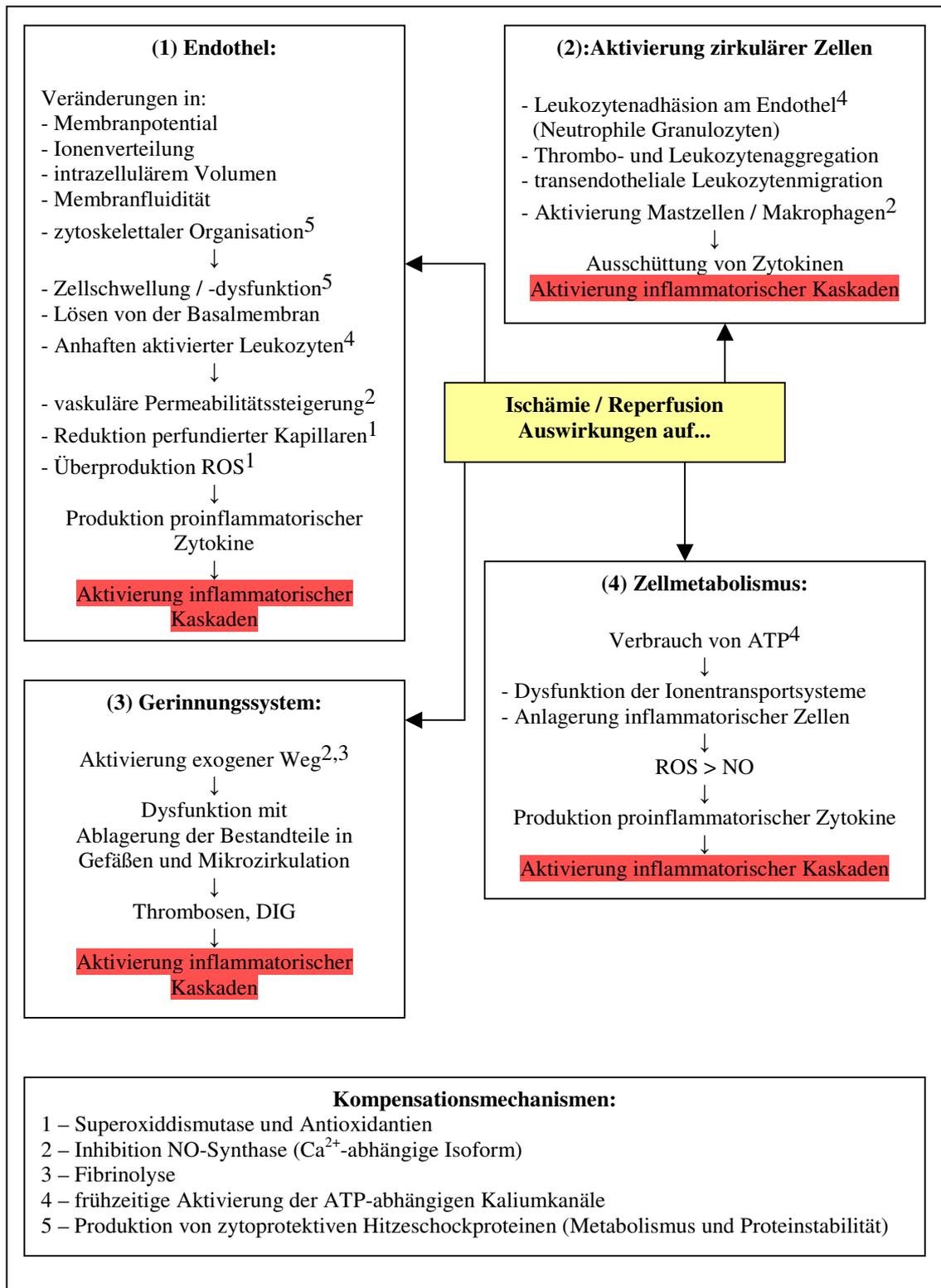


Abbildung 2: Auswirkungen von Ischämie und Reperfusion sowie mögliche Kompensationsmechanismen nach [Carden und Granger, 2000]

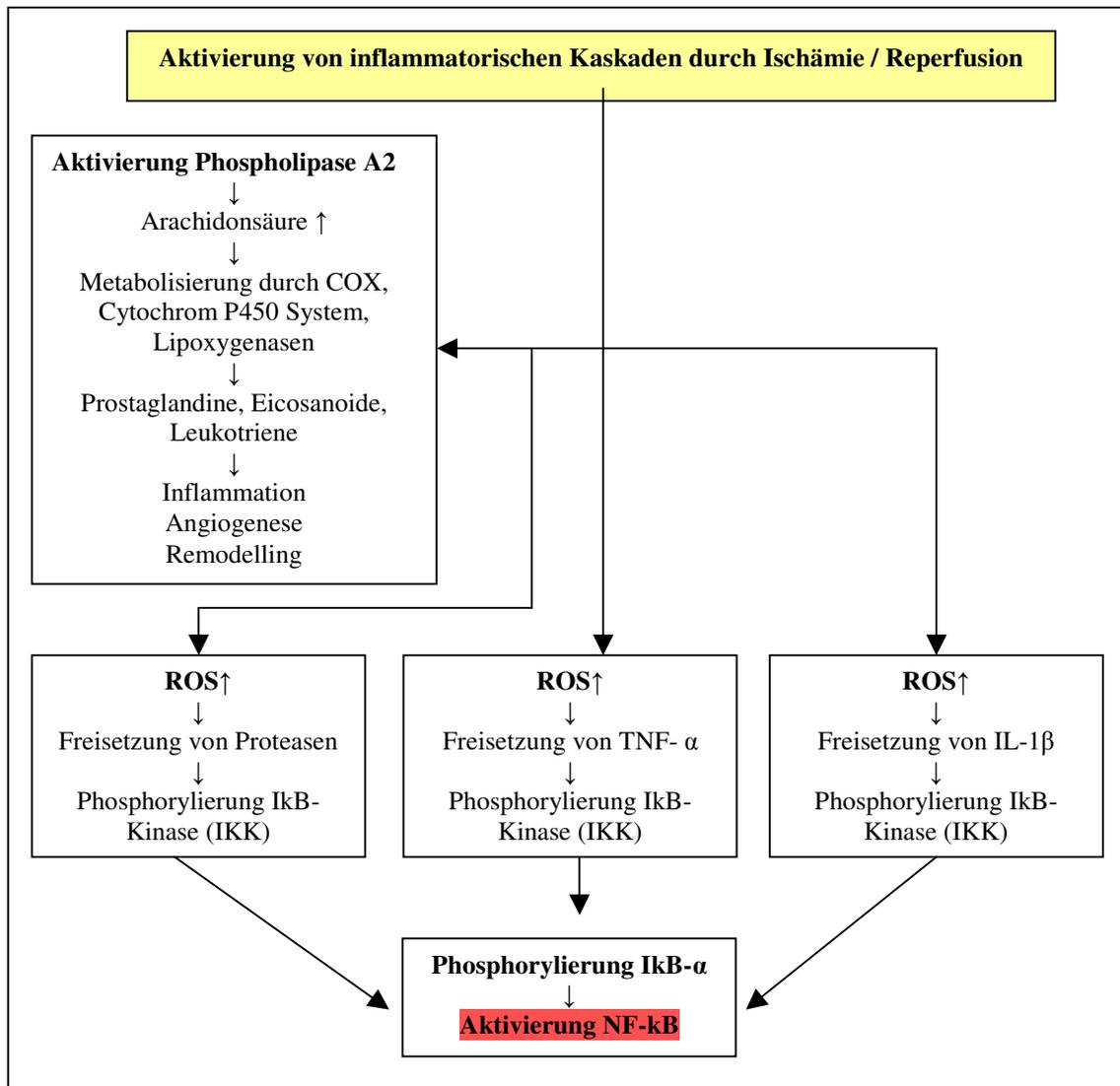


Abbildung 3: Aktivierung inflammatorischer Kaskaden durch Ischämie / Reperfusion nach [Marchant, 2012, Ferrari, 2014]

1.5 Interventionsmöglichkeiten im hämorrhagischen Schock – NF-κB

1.5.1 Definition, Bestandteile und Vorläuferproteine

Der Transkriptionsfaktor Nuclear Factor kappa B (NF-κB) ist beteiligt an Immunreaktionen, entzündlichen Prozessen, sowie an der Kontrolle von Zellproliferation und –apoptose und liegt im Zytoplasma aller Zellen als inaktiver Komplex (Trimer) vor. Ausnahme davon sind reife B-Zellen des Immunsystems, hier liegt der Transkriptionsfaktor permanent in aktiver Form vor. [Lee und Burckart, 1998, Meldrum et al., 1997, McDonald et al., 2001, Yamamoto und Gaynor, 2001, Zou et al., 2003, Majdalawieh und Ro, 2010]

Der NF-κB-Komplex besteht zunächst aus zwei Untereinheiten, die miteinander Homo- oder Heterodimere bilden und verschiedenen Proteingruppen (Gruppe I und II) zugeordnet werden

können. Beide Gruppen unterscheiden sich zum einen in ihrer Funktion und zum anderen im Vorhandensein von sog. Vorläuferproteinen. [Lee und Burckart, 1998]

Aus der Proteingruppe I können entweder NF- κ B 1 (p50), NF- κ B 2 (p52) oder ihre inaktiven Vorläuferstufen (p105 bzw. p100) mit einem der Proteine der Gruppe II, also RelA (p65), RelB oder c-Rel binden. Die Rel-Domäne ist unter anderem verantwortlich für die DNA-Bindung im Nucleus der Zelle, die Dimerisierung, nukleäre Translokation und die Interaktion mit den I κ B-Proteinen, welche inhibitorische Aufgaben übernehmen und zusammen mit dem Dimer den gesamten NF- κ B-Komplex (Trimer) bilden. [Lee und Burckart, 1998, Yamamoto und Gaynor, 2001] Folgende I κ B-Proteine können gebunden sein: I κ B- α , - β , - γ , - δ , - ϵ oder Bcl-3. [Majdalawieh und Ro, 2010] Auch die Vorläuferproteine p105 und p100 übernehmen inhibitorische Aufgaben, sodass bei Bindung dieser Proteine ebenfalls ein inaktiver Komplex vorliegt, der die weitere Bindung eines Inhibitorproteins (I κ B) unnötig macht. [Lee und Burckart, 1998, Yamamoto und Gaynor, 2001]

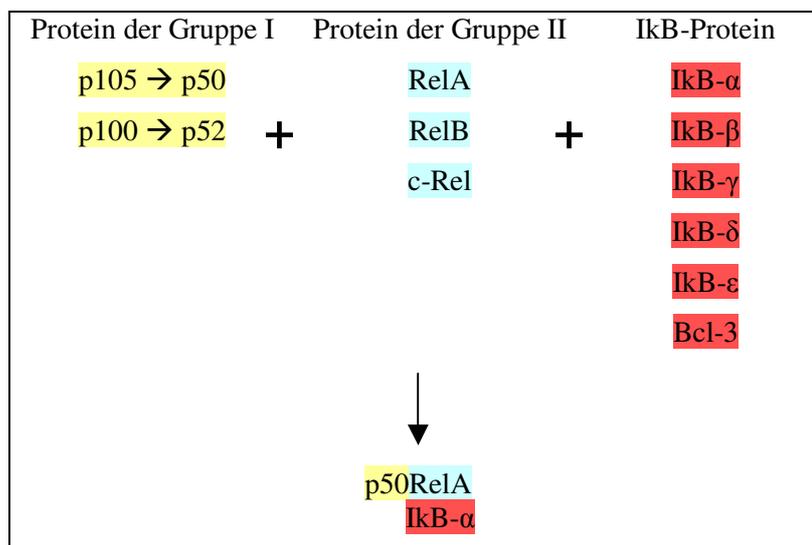


Abbildung 4: Aufbau NF- κ B und Vorläuferproteine nach [Lee et al., 1998, Yamamoto und Gaynor, 2004]

Erst nach Aktivierung durch verschiedene Stimuli und weitere Schritte, welche zur Abspaltung des I κ B-Proteins führen, wandert der Transkriptionsfaktor NF- κ B als Dimer, gesteuert durch sog. Kernlokalisationsignale (NLS – nuclear localization signal) und mit Hilfe von Chaperonen durch die Kernporen in den Nucleus, bindet dort an spezifische Enhancer- und Promotorelemente der DNA der Zielgene und beeinflusst deren Transkription. [Lee und Burckart, 1998, McDonald et al., 2001, Yamamoto und Gaynor, 2001, Zou et al., 2003, Majdalawieh und Ro, 2010]

Tabelle 3: NF- κ B abhängige Proteine nach [Meldrum et al., 1997, Lee und Burckart, 1998, McDonald et al., 2001, Yamamoto und Gaynor, 2004, Majdalawieh und Ro, 2010]

Zytokine	TNF- α , TNF- β , IL-2, IL-6, IL-12
Chemokine	IL-8
Adhäsionsmoleküle	ICAM-1, VCAM-1
Akute Phase Proteine	CRP
Wachstumsfaktoren	GM-CSF, G-CSF
Enzyme	COX-2, Phospholipase A2, NO-Synthase
Transkriptionsfaktoren	I κ B- α , p100, p105, Bcl-3, c-Rel

1.5.2 Aktivierung von NF- κ B

Verschiedene Induktoren sind in der Lage, den Transkriptionsfaktor NF- κ B zu aktivieren und die oben beschriebene Signalkette zu starten. [Lee und Burckart, 1998] Zu diesen Induktoren gehören unter anderem verschiedene Zytokine und Zustände, die den Organismus in Stress versetzen und so über reaktive Sauerstoffspezies die Signalkette aktivieren. [Zou et al., 2003, Majdalawieh und Ro, 2010]

Tabelle 4: NF- κ B aktivierende Moleküle und Faktoren nach [Meldrum et al., 1997, Lee und Burckart, 1998, Yamamoto und Gaynor, 2004, Majdalawieh und Ro, 2010]

Zytokine	TNF- α , TNF- β , IL-1, IL-2, IL-17
Wachstumsfaktoren	Insulin, GM-CSF
Immunrezeptoren und ihre Liganden	CD3, CD4, CD28, CD40
Stressoren	Hämorrhagie, Hypoxie, Reoxygenierung
Krankheitserreger und ihre Produkte	Bakterien: Tbc, LPS, Exotoxin B Viren: HIV-1, CMV, EBV
Sonstige	UV-Licht

Die bereits erwähnten ROIs führen zu rasanter Phosphorylierung des inhibitorischen I κ B-Proteins oder des entsprechenden Vorläuferproteins (p105, p100) durch eine I κ B-Kinase (IKK), welche ebenfalls aus drei Untereinheiten (IKK- α , - β und - γ) besteht und durch weitere Kinasen (bspw. MAP-Kinasen) phosphoryliert und damit aktiviert wird. [Lee und Burckart, 1998, Yamamoto und Gaynor, 2004] Die Phosphorylierung von I κ B an N-terminalen Serinresten führt jedoch nicht unmittelbar zur Dissoziation der Bestandteile des bis dahin inaktiven NF- κ B-Komplexes, vielmehr wandelt sie die Bestandteile in aktivere Substrate um. Getrennt wird das Trimer schließlich durch ubiquitinierte Proteolyse. [Zou et al., 2003, Yamamoto und Gaynor 2004, Majdalawieh und Ro, 2010] Das Inhibitorprotein wird im 26S-Proteosomen abgebaut, das nunmehr wieder freie und aktive NF- κ B-Dimer wandert mit Hilfe des NLS und unterstützt durch sog. Chaperone wie Hitzeschockprotein (HSP) 70 und HSP 90 [Lee et al., 1998, Zou et al., 2003, Yamamoto und Gaynor, 2004] durch die Kernporen in den Zellkern. Hier bindet das Dimer mittels der Rel-Domäne an Promotor- oder Enhancerregionen der Zielgene (zumeist bestehend aus 10 Basenpaaren) und bewirkt so eine verstärkte Transkription dieser Proteine.

NF- κ B bindet also mit Hilfe der Rel-Domäne an der Promotorregion der Zielgene, ein RNA-Polymerase-Proteinkomplex kommt hinzu und bewirkt die Entspiralisierung der Doppelhelix der DNA mit Anlagerung komplementärer Ribonukleotide. Es entsteht die prä-m-RNA (messenger-RNA). Diese wird durch Modifizierungsvorgänge (Splicing) in die aktive m-RNA umgewandelt und wandert über die Kernporen vom Nucleus in das Zytosol der Zelle.

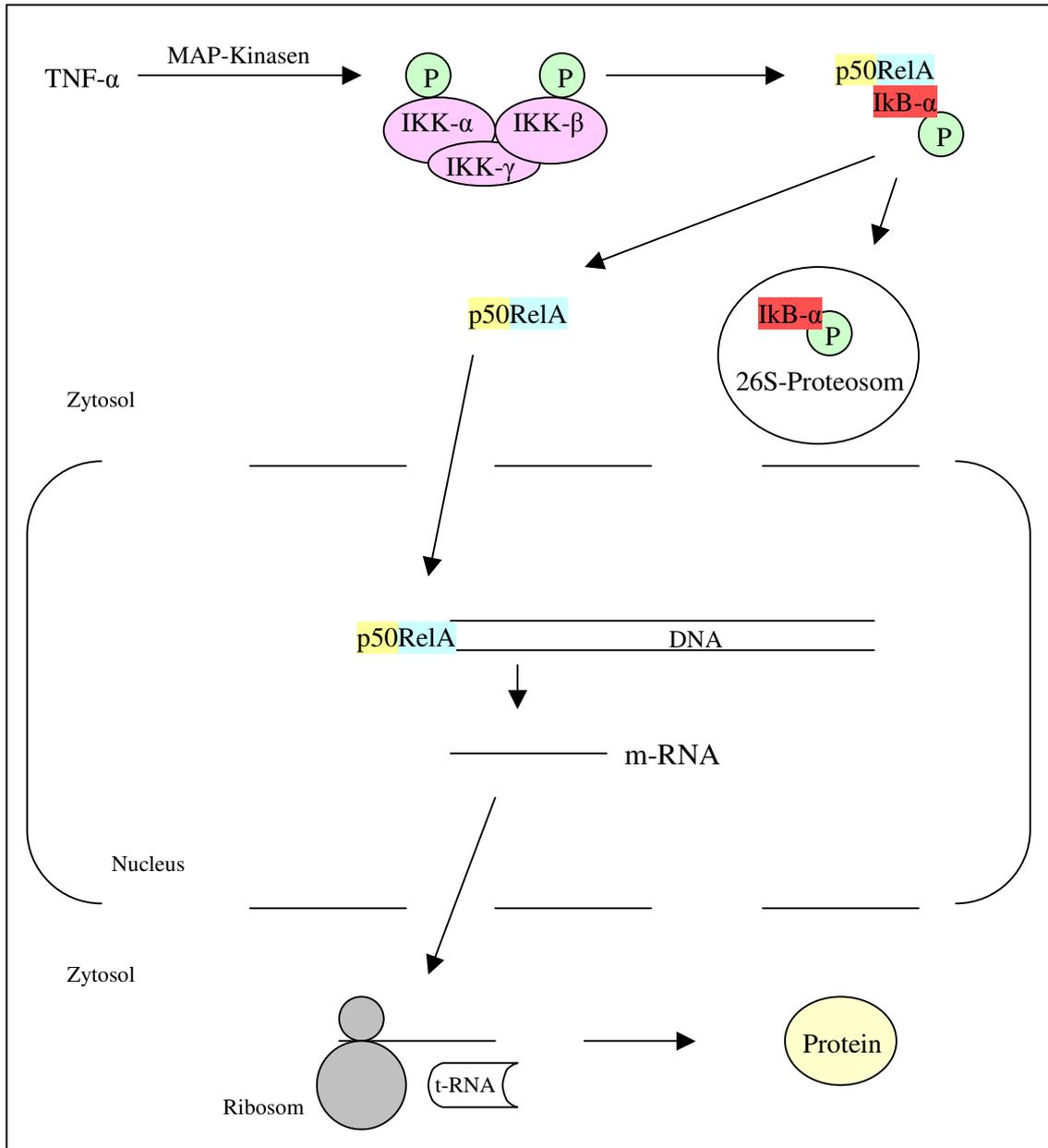


Abbildung 5: Aktivierung von NF- κ B durch TNF- α nach [Lee et al, 1998, Yamamoto und Gaynor, 2004]

Im Zytosol wird die m-RNA am Ribosomen gebunden, t-RNA (transport-RNA) beladen mit jeweils einer der m-RNA komplementären Aminosäure lagert sich an die m-RNA an. Katalysiert durch das Ribosom werden immer weitere t-RNA angelagert, bis ein Stopp-Codon

erreicht ist, das gebildete Protein löst sich vom Ribosomen und erreicht mittels Faltvorgängen im Zytosol der Zelle seine endgültige Struktur. [McDonald et al., 2001, Zou et al., 2003, Yamamoto und Gaynor, 2004, Majdalawieh und Ro, 2010]

Wie zu erkennen ist, muss diese Signalkette strengen Regulationsmechanismen unterliegen, um einer zu schwachen bzw. zu starken Aktivierung des NF- κ B entgegenzuwirken. Dabei unterscheidet man eine positive und negative Rückkopplung (sog. Feedback). Positiv verstärkt wird die Signalkette durch gebildetes TNF- α bzw. IL-2. Die Zytokine sorgen als Induktoren des Signalweges für die weitere Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B.

Neben diesem positiven Feedback existiert jedoch auch eine negative Rückkopplung durch gebildetes I κ B- α . [Lee und Burckart, 1998, Yamamoto und Gaynor, 2004] Zu Beginn der Aktivierung im Cytosol nimmt der Bestand an inhibitorischem I κ B- α durch die ubiquitinabhängige Proteolyse rapide ab. Da jedoch auch für diese Proteine auf der entsprechenden DNA eine Promotor- bzw. Enhancerregion für NF- κ B vorliegt, wird mit zunehmender NF- κ B-Aktivierung (innerhalb von 1 h) der Spiegel an inhibitorischem I κ B- α wieder erhöht, sodass einer zu starken Aktivierung von NF- κ B entgegengewirkt wird. [Lee und Burckart, 1998, Yamamoto und Gaynor, 2004, McKenna und Wright, 2015]

1.5.3 Intervention mit BAY 11-7085 und Pioglitazone Hydrochloride

In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, ob nach hämorrhagischem Schock in Ratten durch die Gabe eines Medikamentes sowohl die systemische Entzündungsreaktion gestoppt, als auch die Überlebenszeit an sich verlängert und die Überlebensrate erhöht werden kann. Diese Untersuchung soll mittels klinischer Parameter, sowie Western Blots zum Nachweis des Effektes auf die Expression verschiedener Proteine erfolgen. Es soll weiterhin untersucht werden, welches Medikament in welcher Dosierung einen protektiven Effekt auf das Überleben nach hämorrhagischem Schock in Ratten aufweist. Dazu wurden zwei Medikamente getestet: BAY 11-7085 und Pioglitazone Hydrochloride.

BAY 11-7085 mit dem Wirkstoff (2E)-3-[[4-(1,1-Dimethylethyl)phenyl]sulfonyl]-2-propenenitrile und der Molekülformel $C_{13}H_{15}NO_2S$ ist ein irreversibler Inhibitor der TNF- α - aktivierten I κ B- α - Phosphorylierung an Ser³² bzw. Ser³⁶ [Zou et al., 2003]. Es wurde ausschließlich zu Forschungszwecken hergestellt und ist aktuell laut Herstellerangaben nicht geeignet für die Verwendung in Diagnostik oder Therapie. Löslich ist das pulverisierte Medikament lediglich in Ethanol oder DMSO.

Untersucht wurde das Medikament bereits in zahlreichen Studien. Vorrangig beschäftigten diese sich mit der Hemmung des Wachstums von Krebszellen. So zeigte Hu et al. bereits 2001, dass BAY 11-7085 Apoptose und Nekrose in Tumorzellen einer humanen monozytären Lymphozyten-Zelllinie induziert. Die nachgewiesenen Effekte waren dosisabhängig und es

konnte weiterhin nachgewiesen werden, dass diese Effekte auf einem NF-kB-abhängigen Weg hervorgerufen werden. Gleichzeitig zeigte die Studie jedoch auch, dass BAY 11-7085 nicht zytotoxisch auf gesunde Endothelzellen wirkt [Hu et al., 2001].

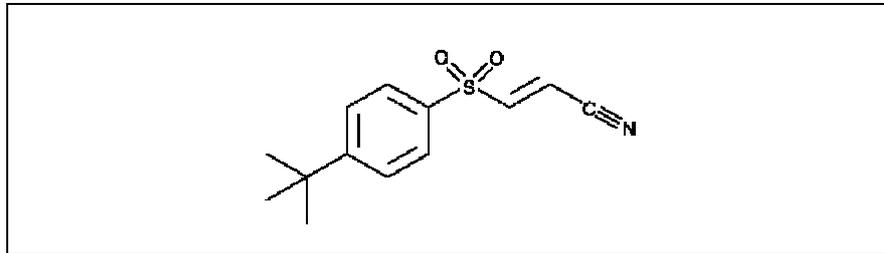


Abbildung 6: Strukturformel von BAY 11-7085
[<https://www.caymanchem.com/app/template/Product.vm/catalog/14795>]

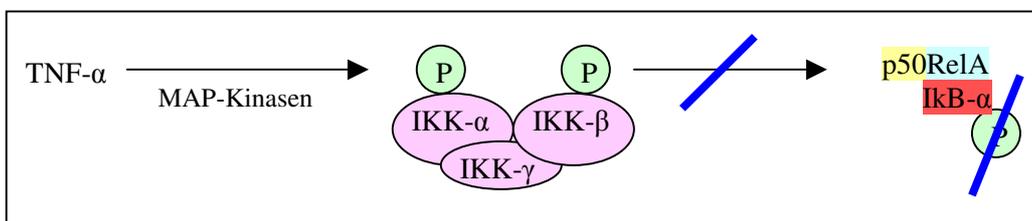


Abbildung 7: Wirkungsweise von BAY 11-7085

Eine Studie von Sourbier et al. beschäftigte sich 2007 mit humanen Zellen eines metastasierten Nierenzellkarzinoms welches auf bisherige Therapien refraktär reagiert hatte. Es konnte nachgewiesen werden, dass BAY 11-7085 signifikant das Tumorzellwachstum um bis zu 80 % via Induktion von Apoptose hemmt bzw. reduziert [Sourbier et al., 2007]. Nach diesen Studien bestand weiterhin in Fachkreisen die Frage, ob das Medikament ebenfalls in inflammatorischen Reaktionen über den NF-kB-abhängigen Weg einen Effekt aufwies. Hierzu konnte von Nanu et al. 2007 nachgewiesen werden, dass das Medikament die Zellproliferation von Endometriosezellen inhibieren und die Apoptose induzieren kann. Dazu wurden allerdings Ovarialzellen in vitro untersucht. Die Endometriose als lokale inflammatorische Reaktion wird von Mediatoren wie Zytokinen und Chemokinen über den Transkriptionsfaktor NF-kB getriggert [Nanu et al., 2007]. Es bestand also weiterhin die Frage, ob für das Medikament auch in ursprünglich gesunden Organen in vivo positive Effekte auf induzierte inflammatorische Reaktionen nachgewiesen werden können. Bereits Pierce et al. beschrieb 1997 Tiermodelle zu inflammatorischen Reaktionen, hier handelte es sich v.a. um die Arthritis und deren Therapiemöglichkeiten. BAY 11-7085 wurde in der Schlussfolgerung als Medikament angesehen, welches möglicherweise über den NF-kB-Signalweg antiinflammatorische Effekte auch bei Ischämie und Reperfusionsschaden induzieren könnte [Pierce et al., 1997]. Hierzu

wurden in den Folgejahren verschiedene Studien an den unterschiedlichsten Organsystemen durchgeführt. Zou et al. beschäftigten sich 2004 mit der mesenterialen Ischämie als wesentliche Komplikation von Schock über die NF- κ B-Aktivierung (MPO als Marker der Neutrophilenansammlung, Zytokinexpression als Marker für die inflammatorische Reaktion). Dazu wurde mittels eines Tiermodells (Ratten) eine 45-minütige Ischämie mit anschließender Reperfusion des zuvor entnommenen Blutes durchgeführt, BAY wurde in den Versuchsgruppen 1 h vor Induktion des Schocks intraperitoneal verabreicht. Die Tiere zeigten zeitabhängig und ohne Behandlung eine erhöhte MPO-Aktivität, erhöhte IL-6-Expression sowie erhöhte NF- κ B-Bindungsaktivität. Die mit BAY behandelten Tiere zeigten zeitabhängig (30 min nach Reperfusion) eine Verminderung des frühen Reperfusionsschadens im Darm (Ileum), sowie eine verminderte MPO-Aktivität im frühen Stadium. Im späten Stadium, d.h. 6 h nach Reperfusion zeigte sich dagegen kein protektiver Effekt des Medikamentes mehr [Zou et al., 2004].

Yang et al. untersuchte 2004 in Zellkulturen sowie im Maus-Tiermodell die NF- κ B-Aktivierung und Bcl-2-Expression nach Induktion von Hypoxie in der Lunge. Auch hier konnte ein zellprotektiver Effekt von BAY 11-7085 mit verminderter Bcl-2-Expression nach Behandlung mit dem Medikament nachgewiesen werden [Yang et al., 2004]. Sangeetha et al. schließlich beschäftigten sich 2010 mit kardialen Fibroblasten in der Zellkultur und deren Verhalten bei Hypoxie bzw. der Expression verschiedener Proteine in den Fibroblasten. Es konnte auch hier gezeigt werden, dass Hypoxie über NF- κ B die Expression von Proteinen sowie die Induktion von Apoptose in den Zellen auslöst. BAY 11-7085 als irreversibler Inhibitor der NF- κ B-Aktivierung zeigte hier jedoch keine protektiven Effekte auf die Apoptose bei Behandlung im Schock. Jedoch konnte eine verminderte Proteinexpression von Bcl-2 und anderer inflammatorischer Proteine nachgewiesen werden. [Sangeetha et al., 2010]

Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass sich als eines der Zielproteine zur Intervention im hämorrhagischen Schock als systemisches inflammatorisches Geschehen und zur Verhinderung der Folgen (Multiorganversagen) die Hemmung des NF- κ B herausgestellt hat. [Altavilla et al., 2001, Yamamoto und Gaynor, 2001, Majdalawieh und Ro, 2010] Dabei wurde aufgrund der bereits erfolgten experimentellen Studien und der nachgewiesenen antiinflammatorischen Effekte bei Hypoxie BAY 11-7085 als erstes zu testendes Medikament für diese Studie ausgewählt. BAY 11-7085 hemmt die TNF- α – aktivierte I κ B- α – Phosphorylierung. Diese Phosphorylierung stellt einen der Schlüsselprozesse in der Aktivierung von NF- κ B dar [Yamamoto und Gaynor, 2004, McKenna und Wright, 2015], durch Hemmung dieser Phosphorylierung unterbleibt die Trennung des inaktiven Trimers (Vorläuferkomplex) im Zytosol, NF- κ B wird daran gehindert in den Nucleus zu wandern und an Promotorregionen zu binden. Die NF- κ B-abhängige Transkription und Translation von beispielsweise verschiedenen Zytokinen unterbleibt und die inflammatorische Reaktion sollte weniger überschießend stattfinden.

Beim hämorrhagischen Schock sind alle Organsysteme betroffen, ein experimentelles Tiermodell mit Betrachtung mehrerer Organsysteme fehlt jedoch bisher. In der klinischen Situation ist auch kein Organ einzeln, sondern der Organismus in seiner Gesamtheit zu betrachten. Daher wurden in dieser Studie Ratten als Tiermodell und Gesamtorganismus der Hypoxie ausgesetzt, die Organe Herz, Lunge, Leber und Niere in die Betrachtung eingeschlossen und untersucht.

Das zweite Medikament, Pioglitazone Hydrochloride, gehört chemisch zur Gruppe der Thiazolidinedione und ist ein spezifischer Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR- γ)-Agonist. Dieser Rezeptor ist ein Mitglied der Hormonrezeptor-Superfamilie und ein nukleärer Transkriptionsfaktor, welcher u.a. die Genregulation für die Proliferation von Fettzellen und Zellen des Immunsystems, sowie die Homöostase des Glukosehaushaltes kontrolliert. PPAR formt nach Bindung eines Liganden mit einem anderen nukleären Rezeptor (Retinoid acid receptor alpha - RXR) ein Heterodimer. Wird der Komplex aktiviert, bindet er an spezifische DNA-Sequenz-Elemente und beeinflusst die Expression von Zielgenen. [Takata et al., 2002, Zingarelli et al., 2003, Abdelrahman et al., 2004, Klotz et al., 2005, Konturek et al., 2005, Zingarelli und Cook, 2005, Xing et al., 2008, Zingarelli et al., 2009b, Viswakarma et al., 2010]

Pioglitazone erhielt 1999 unter dem Handelsnamen Actos die Marktzulassung in den USA. Seit 2000 erfolgte schließlich die Zulassung in Europa zur Behandlung eines unzureichend eingestellten Typ-II-Diabetes bei Erwachsenen (Patienten > 18 Jahre) und bestehender Adipositas als Mono- oder Kombinationstherapie mit Metformin oder einem Sulfonylharnstoff. Chemisch ist Pioglitazone ein Racemat aus 2 Enantiomeren, der R- und S-Form und hat die Strukturformel $C_{19}H_{20}N_2O_3S \cdot HCl$. In Form des Hydrochlorides wird es als Tabletten zu 15, 30 bzw. 45 mg vertrieben. Seit April 2011 darf es nur noch in begründeten Ausnahmefällen zu Lasten der gesetzlichen Krankenversicherung verordnet werden. [Gebrauchsinformation zu Pioglitazon der EMA, 2011, Zusammenfassung des EPAR für Pioglitazon Accord, 2011]

Pioglitazone muss oral eingenommen werden, der Wirkungseintritt erfolgt nach ca. 4 Wochen. Das Medikament wird zu den Insulinsensitizern gezählt, da es die Zellen in Fettgewebe, Leber und Muskeln für Insulin (körpereigen oder -fremd) sensibilisiert, das Insulin kann in den genannten Zellen wieder besser verwertet, der Blutzuckerspiegel effektiver gesenkt werden. Als Nebenwirkungen können eine Zunahme der Adipositas, Wassereinlagerungen im Gewebe sowie die Abnahme der Knochendichte v.a. bei Frauen auftreten. Kontraindikationen für eine Behandlung mit Pioglitazone sind schwere Leberfunktionsstörungen, eine schwere Herzinsuffizienz, Schwangerschaft und Stillzeit sowie chronische Niereninsuffizienz bzw. Dialysepflicht. [Zusammenfassung des EPAR für Pioglitazon Accord, 2011]

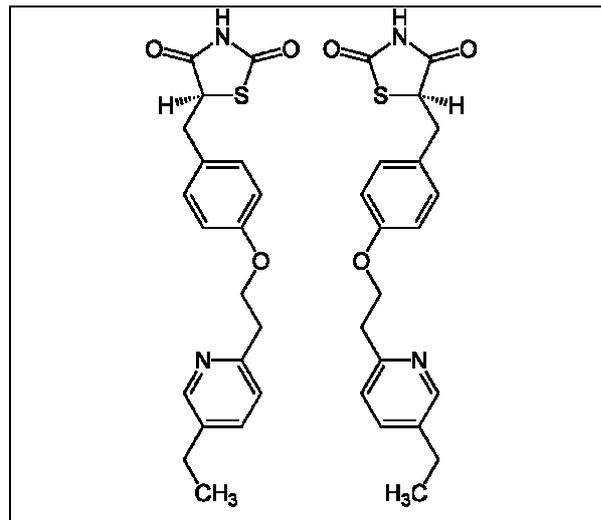


Abbildung 8: Strukturformel Pioglitazone Hydrochloride als 1:1-Gemisch aus der R- und S-Form [<http://arznei-news.de/pioglitazon/>]

Aber nicht nur die effektive Senkung des Blutzuckerspiegels ist eine Wirkung von Pioglitazone. In verschiedenen Studien konnte bisher gezeigt werden, dass das Medikament in der Lage ist, die Produktion von inflammatorischen Zytokinen zu beeinflussen und damit antiinflammatorische Effekte hervorrufen kann. So untersuchte Yuan et al. 2005 die kardioprotektiven und antiinflammatorischen Effekte von Pioglitazone bei experimentell induzierter Myokarditis in Ratten. Es konnte gezeigt werden, dass über eine NF-kB-Blockade bei oraler Gabe von Pioglitazone die Expression proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 β und TNF- α im Myokard signifikant vermindert werden kann. Diese Verminderung ist Folge einer NF-kB-Blockade über eine vermehrte I κ B- α – Expression im Nucleus der Zellen. [Yuan et al., 2005] Auch in anderen Organen konnte dieser antiinflammatorische Effekt experimentell nachgewiesen werden. Park et al. zeigte 2009, dass Pioglitazone in der Lage ist, bei oraler Gabe und experimentell-induziertem allergischem Asthma bronchiale die Expression von IL-17 in der Lunge von Mäusen über eine verminderte NF-kB-Aktivität zu verringern. Weiterhin konnte eine Verminderung von inflammatorischen Zellen im Gewebe nachgewiesen werden [Park et al., 2009]. Auch im Pankreas von Ratten konnte Konturek et al. 2005 bei experimentell induzierter Pankreatitis eine reduzierte Expression von IL-1 β und verminderte Plasmalevel von IL-1 β sowie IL-10 nachweisen [Konturek et al., 2005]. Die beschriebenen antiinflammatorischen Effekte stehen in Zusammenhang mit der Hemmung des NF-kB über drei mögliche Mechanismen. Zum einen bindet das aktivierte PPAR- γ -RXR-Heterodimer an Koaktivatoren des NF-kB, welche die Erhöhung der proinflammatorische Genexpression induzieren und hemmt diese. Weiterhin wird der Transkriptionsfaktor NF-kB direkt durch Bindung des Heterodimers an die Untereinheiten p50 und p65 gehemmt. Außerdem werden MAP-Kinasen (mitogen-activated protein), welche ebenfalls über verschiedene Signalwege zur

Aktivierung von NF- κ B beitragen, gehemmt. [Takata et al., 2002; Zingarelli et al., 2003; Abdelrahman et al., 2004; Zingarelli and Cook, 2005; Shimizu et al., 2006; Zhang et al., 2008]

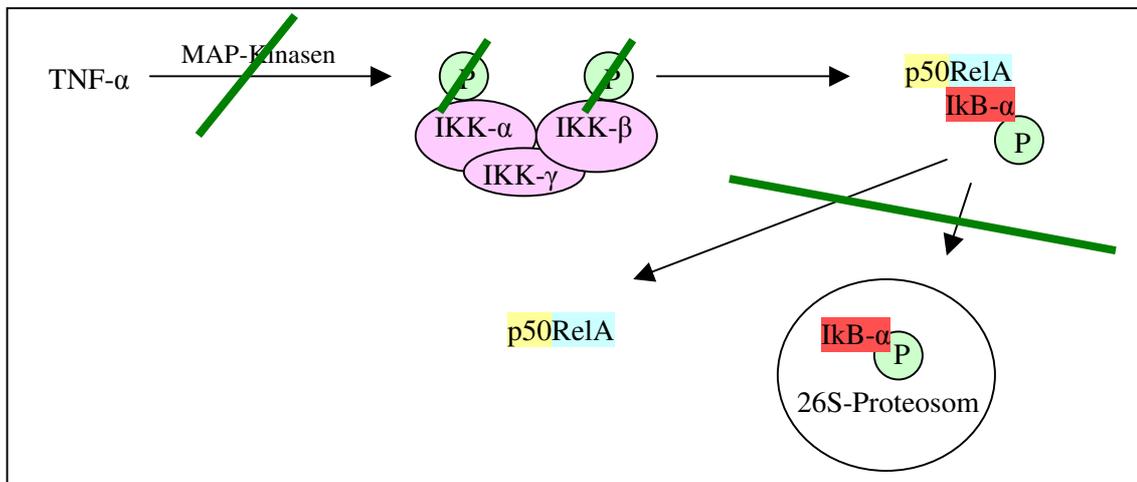


Abbildung 9: Wirkungsweise Pioglitazone Hydrochloride

Auch im ischämischen Geschehen wurde die verminderte Expression proinflammatorischer Zytokine durch das Medikament bereits in einigen Studien tierexperimentell untersucht. So konnte Shiomi et al. 2002 zeigen, dass Pioglitazone antiinflammatorische Effekte im Mausmodell mit chronischer Herzinsuffizienz aufwies. Durch die orale Gabe des Medikamentes konnte sowohl histologisch eine Verbesserung des left ventrikulären remodellings als auch mittels Western Blot eine verminderte Expression von TNF- α und TGF- β nachgewiesen werden [Shiomi et al., 2002]. Naito et al. zeigte schließlich 2010, dass Pioglitazone bei experimentell induzierter gastralischer Ischämie mit anschließender Reperfusion in Ratten signifikant die Expression von TNF- α als auch eine verminderte zytokininduzierte Neutrophilenansammlung im Gewebe bewirkt. [Naito et al., 2010].

Jedoch wurde Pioglitazone bisher noch nicht bezüglich der protektiven Effekte auf die Zytokinexpression sowie das Überleben und weitere klinische Parameter im hämorrhagischen Schock in Ratten untersucht. Die beschriebenen Studien zeigen jedoch signifikante antiinflammatorische Effekte auch bei Ischämie und Reperfusion in verschiedenen Organsystemen. Die vorliegende Studie soll nun diese NF- κ B-abhängigen Effekte im Tiermodell Ratte und den Organen Herz, Lunge, Leber und Niere darstellen.

2 Zielstellung der Arbeit

Nahezu die Hälfte aller Patienten mit hämorrhagischem Schock versterben in den ersten 24 Stunden an multiplen Organversagen. [Torres et al., 2004] Dabei gilt nicht alleine die Hypoxie des Gewebes als der auslösende Faktor, vielmehr trägt der sog. Reperfusionsschaden entscheidend zum Outcome dieser Patienten bei. Nach Reperfusion steigt die Zahl der Entzündungszellen wie Monozyten, Makrophagen und T-Lymphozyten in den Geweben sprunghaft an, die Zahl proinflammatorischer Mediatoren (Zytokine) steigt, die Transkription dieser Mediatoren wird über verschiedene Signalketten und Transkriptionsfaktoren aktiviert und in Gang gehalten. Einer dieser Transkriptionsfaktoren ist der NF- κ B, welcher im Zytoplasma als inaktiver Komplex vorliegt, durch verschiedene Stimuli aktiviert wird und so die inflammatorische Reaktion des Organismus verstärkt.

Daher sind neben der bereits bekannten Therapie (Volumengabe, ect.) neue Medikamente in den Fokus der Untersuchungen gerückt, welche diese inflammatorische Reaktion bremsen bzw. verhindern sollen. Ein Angriffspunkt stellt dabei die Aktivierung des wichtigen Transkriptionsfaktors NF- κ B dar. Für einige immunsuppressive und antiinflammatorische Medikamente wie Glukokortikoide, Salicylate, Cyclosporine und Antioxidantien sind diese Beeinflussungen des NF- κ B-Aktivierungsweges bereits untersucht worden. [Altavilla et al., 2001; Yamamoto and Gaynor, 2001, 2004; Majdalawieh and Ro, 2010] In der vorliegenden Arbeit sollen daher ebenfalls zwei Medikamente im hämorrhagischen Schock getestet werden, die diesen Transkriptionsfaktor beeinflussen. Diese Medikamente sollten neben der antiinflammatorischen Wirkung eine leichte und praktikable Anwendbarkeit sowie eine gute Verträglichkeit aufweisen. Bei den getesteten Medikamenten handelt es sich um BAY 11-7085, einen irreversiblen Inhibitor der TNF- α – aktivierten I κ B- α – Phosphorylierung und um Pioglitazone Hydrochloride, einen spezifischer PPAR- γ -Agonisten. Für beide Medikamente wurden bereits antiinflammatorische Effekte durch Beeinflussung des NF- κ B beschrieben, sodass folgenden Hypothesen aufgestellt werden können:

1. Beide Medikamente verbessern signifikant die Überlebensrate und Überlebenszeit nach hämorrhagischem Schock in Ratten.
2. Die hämodynamischen Parameter Mittlerer arterieller Druck, Herzfrequenz und Pressure Rate Index werden durch die Medikamentengabe positiv beeinflusst bzw. stabilisiert.
3. Die Medikamente wirken einer schockbedingten Schrankenstörung entgegen.
4. Die Leukozytenakkumulation wird gebremst, was sich an einer verminderten MPO-Aktivität in den Organen Leber, Lunge, Herz und Niere zeigt.
5. Die Aktivierung von NF- κ B wird vermindert und damit die Expression proinflammatorischer Proteine gehemmt.

3 Materialien

3.1 Tiermodell zum hämorrhagischen Schock

Tabelle 5: Laborgeräte und Ausstattung

Adapter Sterile Intramedic [®]	Becton Dickinson, Heidelberg
Anatomische und chirurgische Pinzetten	Medicon Instrumente, Tuttlingen
Arterienklemme	Medicon Instrumente, Tuttlingen
Bechergläser 250 ml Barosilicate Glass 3.3	Braun, Melsungen
Combi – Stopper	Braun, Melsungen
Digitaluhr Digi – Clock – Timer	Roth, Karlsruhe
Dreiwegehahn Discofix [®]	Braun, Melsungen
Druckaufnehmer CODAN pvb	Critical Care GmbH, Kaltenkirchen
Einmalspritzen 10 ml ohne Kanüle	Terumo Europe NV Leuven, Belgien
Electronic thermometer Precision ama – digit ad 15 th	Amarell, Kreuzwertheim
gebogene Klemme	Medicon Instrumente, Tuttlingen
Heizkissen	Korona, Langgöns, Sundern
Hettich Hämatokrit Kapillaren, Versiegelungs- /Zentrifugenkit, Zentrifuge	Hettich, Tuttlingen
Insulinkanülen 0,4 mm x 13 mm	BD Eclipse [™] Needle, USA
Insulinspritzen 1 ml, BD Plastipak [™]	Becton Dickinson, Heidelberg
Inzisionsschere	Medicon Instrumente, Tuttlingen
Introducer – Katheter	Becton Dickinson, Heidelberg
Maschinengarn Obergarn Mercifil Dominator 40	Wenco, Essen
Mikroschere	Medicon Instrumente, Tuttlingen
Mullkompressen steril 10 x 10 cm	Fuhrmann Verbandstoffe GmbH
Operationskalpell, Standardmodell	Medicon Instrumente, Tuttlingen
Pipetten 10 µl / 100 µl Eppendorf Reference	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen ep T.I.P.S. 10 – 100 µl, 50 – 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Polyethylenschlauch, i. D. 0,58 mm, 1,67 mm	Becton Dickinson, Heidelberg
scharfe Schere	Medicon Instrumente, Tuttlingen
Siemens Sirecust 1261 Überwachungsmonitor	Siemens, München
Spatel	Medicon Instrumente, Tuttlingen
Schutzbrille	Esska, Hamburg
Taschenrechner TI-30X	Texas Instruments, Freising

Tabelle 6: Chemikalien und Medikamente

BAY 11-7085 Lot D00078440	Calbiochem [®] , Sandhausen
Dimethylsulfoxid (DMSO), D-2650	Sigma Aldrich, Schnellendorf
Ethanol absolut, Artikel-Nr. 20.821.321	VWR, Dresden
Stickstoff flüssig	Forschungsabteilung Universitätsklinikum Halle/Saale
Heparin – Natrium (25.000 I.U./5ml)	ratiopharm GmbH, Ulm
isotone NaCl – Lösung 0,9 %	Braun, Melsungen
Narcoren [®] , Injektionslösung	Merial GmbH, Hallbergmoos
Pioglitazone Hydrochloride, sc-204848, Lot K0309	Santa Cruz, Heidelberg
Softasept [®] N	Braun, Melsungen
Xylonest [®] , 2 % Injektionslösung	AstraZeneca, Wedel

3.2 Proteinnachweis mittels Western Blot

Tabelle 7: Laborgeräte und Ausstattung

Centrifuge Tubes 50 ml	Labcon, SanRafael, USA
Filmmaterial Amersham Hyperfilm™ ECL	Amersham GE Healthcare Limited, UK
Flaschen mit Schraubdeckel (PP) 100 ml, 500 ml, 1000 ml	Schott, Mainz
Folienschweißgerät Vacupack plus	Krupps, Solingen
Glasauflaufformen	Pyrex / Schott, Mainz
Halbmikroküvetten 1201	ratiolab, Dreieich
Hamiltonspritze, Exmire Microsyringe, 5 µl – 500 µl	Roth, Karlsruhe
Heizblock Thermomixer 5437	Eppendorf, Hamburg
Immobilon™ – P Transfer Membrane	Millipore, Schwalbach
Inkubator Heraeus	Heraeus, Hanau
Kanülen Sterican 0,7 x 30, 0,9 x 70	Braun, Melsungen
Laborwaage FI3100	Fischerbrand, Schwerte
Linearschüttler Polymax 2020	Heidolph Instruments, Schwabach
Magnetrührer Ikamag RCT	IKA® Labortechnik Janke&Kunkel, Staufen
Messzylinder 5, 10, 25, 100 ml	Schott, Mainz
pH-Meter CG837	Schott, Mainz
Pipette 0,5 – 10 µl, 10 – 100 µl, 100 – 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen 0,5 – 10 µl, 10 – 100 µl, 100 – 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Präzisionswaage Precisa 40SM-200A	PAG Oerlikon AG, Zürich
Reaktionsgefäße 1,5 und 2,0 ml	Eppendorf, Hamburg
Scanner AGFA Snapscan 1236s	AGFA, Köln
Spectrophotometer S.250	Secomam, Frankreich
Spritzen 1, 2, 5, 10, 20, 50 ml	Braun, Melsungen
Vortexer Reax 2000	Heidolph Instruments, Schwabach
Wasseraufbereitungsanlage Milipore	Milipore, Bedford, USA
Zentrifuge Eppendorf Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Hettich	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen

Tabelle 8: Chemikalien und Medikamente

Acrylamide / Bis Solution, 29:1	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Albumin	Roth, Karlsruhe
Amidoschwarz 10B	VWR, Dresden
Ammonium-Persulfat, 10 g	Bio – Rad Laboratories Inc., München
Aqua dest.	Klinikapotheke Universitäts-klinikum Halle (Saale)
Benzonase®, 1.01694.0001	Merck Chemicals, Schwalbach
CHAPS, 1479.1	Roth, Karlsruhe
Complete Mini	F. Hoffmann-La Roche Ltd., Schweiz
Dimethylsulfoxid DMSO, D-2650	Sigma Aldrich, Schnellendorf
ECL Western blotting detection reagents and Analysis system, RPN 2108, RPN 2132	Amersham, GE Healthcare UK
Essigsäure, 3738.1	Roth, Karlsruhe
Ethanol absolut, 20.821.321	VWR, Dresden

Glycin 99 %, G 8898-1KG	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Harnstoff, A 120.1	Roth, Karlsruhe
Kodak processing Chemicals D-19 Developer, P 5670 1GA	Kodak, Rochester, NY
Kodak Fixer, P 6557 1GA	Kodak, Rochester, NY
Loading Dye Solution	Fermentas, St. Leon – Rot
Magermilchpulver (5%ige Lösung)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Methanol	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natronlauge (NaOH), 6771 1	Roth, Karlsruhe
PBS-Tabletten, P-4417	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Ponceau S, P-7170	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Primärantikörper HIF – 1 α , ab1, Lot 905249, mouse monoclonal	abcam, Cambridge
Primärantikörper I κ B- α (H-4), sc-1643, mouse monoclonal	Santa Cruz, Heidelberg
Primärantikörper p38 α/β , sc-7972, mouse monoclonal	Santa Cruz, Heidelberg
Primärantikörper T-bet (D-5), sc-137114, mouse monoclonal	Santa Cruz, Heidelberg
Primärantikörper VEGF (C-1), sc-7269, mouse monoclonal	Santa Cruz, Heidelberg
Salzsäure (HCl), 4625-1	Roth, Karlsruhe
SDS solution 10 %, 161-0416	Roth, Karlsruhe
SDS, 2326.3	Roth, Karlsruhe
Sekundärantikörper ab6728, Lot 883197, Rabbit polyclonal	abcam, Cambridge
Sekundärantikörper sc-2005, goat anti – mouse IgG HRP	Santa Cruz, Heidelberg
TEMED, (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamine), 161-0801	Bio – Rad Laboratories GmbH, München
Thioharnstoff, T-7875	Sigma Aldrich, Schnelldorf
TRIS (Trishydroxymethylaminomethan), 48855.2	Roth, Karlsruhe
Tween 20, P-9419-100ML	Sigma Aldrich, Schnelldorf

3.3 Myeloperoxidasenachweis

Tabelle 9: Laborgeräte und Ausstattung

Ultrazentrifuge (Rotor SS 34)	Sorvall, Buckinghamshire
Magnetrührer IkaMag RCT	IKA®Labortechnik Janke & Kunkel, Staufen
Präzisionswaage Precisa 40SM-200A	PAG Oerlikon AG, Zürich
Spectrophotometer S.250	Secoman, Domont Cedex.
Ultra Thurrax T 25	Janke & Kunkel, Staufen
Zentrifugenröhrchen	Labotec Labortechnik Vertriebs GmbH, Wiesbaden

Tabelle 10: Chemikalien und Medikamente

PBS	Sigma Aldrich, Schnelldorf
H ₂ O ₂ (0,005 %)	Roth, Karlsruhe
Hexadecyltrimethylammonium Bromide	Sigma Aldrich, Schnelldorf
KH ₂ PO ₄	Merck Chemicals, Darmstadt
σ -Dianisidine	Sigma Aldrich, Schnelldorf

4 Methoden

4.1 Tiermodell zum hämorrhagischen Schock

Als Versuchstiere werden männliche Ratten der Gattung Wistar mit einem Gewicht von 275 g bis 394 g verwendet. Die Tiere werden mit Narcoren[®], 60 mg/kg Körpergewicht (KG), intraperitoneal (i.p.) verabreicht, narkotisiert. [Zakaria et al., 2007] Das Kontrollieren der Narkosetiefe und gegebenenfalls Nachinjizieren von entsprechender Menge des Narkotikums ist während der gesamten Versuchslaufzeit selbstverständlich. Die Tiere werden auf einer Heizdecke gelagert (Konstanthalten der Körpertemperatur über den gesamten Versuch bei 37 °C, rektale Messung) und für den Versuchsbeginn vorbereitet.

Die Präparation beginnt mit dem Setzen eines Längsschnittes am Hals der Tiere von der Incisura jugularis nach kranial und Anwendung eines Lokalanästhetikums (Xylonest 2 %) auf der Schnittfläche. Die Halsfaszien und Muskeln werden stumpf zur Seite präpariert und die Trachea dargestellt. Diese wird durch einen Querschnitt eröffnet und ein Trachealtubus (Polyethylenschlauch) eingeführt und fixiert, welcher der Freihaltung der Atemwege während der gesamten Versuchsdauer (Spontanatmung) dient.

Dann wird die Arteria carotis communis in der Tiefe des Gewebes aufgesucht, dargestellt und durch Anbringen von Gefäßklemmen der Blutfluss in diesem Gefäß unterbrochen. Mit Hilfe einer Mikroschere wird die Arterie im Querschnitt eröffnet. Ein Katheter wird in das Blutgefäß eingeführt und fixiert. Die Gefäßklemme kann anschließend entfernt werden. Der arterielle Katheter wird mit dem Druckaufnehmer zur Bestimmung von Mittlerem arteriellem Druck (MAD) und Herzfrequenz (HF) verbunden. Gleichzeitig dient er während des Versuches der Blutentnahme und Reinfusion des entnommenen Blutes sowie der Medikamentengabe.

Anschließend erfolgt eine Stabilisierungsphase von 10 bis 15 min, nach welcher die zu messenden Parameter MAD, HF, Pressure Rate Index (PRI) und Hämatokrit erstmalig bestimmt werden. Diese Parameter werden (mit Ausnahme des Hämatokrits, welcher alle 40 Minuten bestimmt wird) im Abstand von jeweils 20 Minuten gemessen. Nach der Stabilisierungsphase folgt eine 60-minütige druckkontrollierte Hypotoniephase. Ziel ist es, während dieser Zeit den Mittleren arteriellen Druck zwischen 35 und 40 mmHg einzustellen und konstant zu halten. Dazu werden über den arteriellen Zugang Blutportionen von 1 ml abgenommen, bis der MAD den gewünschten Wert erreicht und im Verlauf der Hypotoniephase je nach Veränderung des MAD jeweils Blut reinjiziert oder abgenommen. Das entnommene Blut wird in einer mit 15 I.E. (Internationale Einheiten) Heparin vorgelegten Spritze bei Raumtemperatur gelagert. 15 Minuten vor Reinfusion des entnommenen Blutes werden den Versuchstieren der verschiedenen Gruppen die jeweiligen Substanzen (mit Ausnahme des Medikamentes Pioglitazone) zugeführt. Folgende Gruppen werden dazu in den Versuch eingeschlossen (siehe Tabelle 11):

Tabelle 11: Gruppen der Versuchsreihe

Gruppenname	Medikamentendosis	Anzahl der Versuchstiere
BAY 11-7085 Sham 100 μ M	ohne Schockinduktion, nach 45 min i.a. Gabe von 100 μ M BAY 11-7085 aufgefüllt auf 1 ml Aqua dest.	5
Pioglitazone Sham 10 mg/kg	ohne Schockinduktion, 12 bis 16 h vor Versuchsbeginn Gabe von Pioglitazone 10 mg/kg KG i.p.	5
häm. Schock + Vehikel 1 ml 0,9 % NaCl	15 min vor Reinfusion des entnommenen Blutes wird den Tieren 1 ml 0,9 % NaCl i.a. zugeführt	7
häm. Schock + BAY 11-7085 100 μ M	15 Minuten vor Reinfusion des entnommenen Blutes 100 μ M (gemessen am Blutvolumen des Tieres) BAY 11-7085 aufgefüllt auf 1 ml mit Aqua dest. i.a.	7
häm. Schock + Pioglitazone 10mg/kg	12 bis 16 h vor Versuchsbeginn Gabe von Pioglitazone 10 mg/kg KG i.p., mit Schockinduktion	7

Nach erfolgter Hypotoniephase wird das entnommene Blut in Portionen von 1 ml komplett reinfundiert. Es schließt sich die Nachbeobachtungszeit an, die mit dem Tod des Versuchstieres endet (MAD unter 35 mmHg, Herz- oder Atemstillstand) bzw. maximal 180 Minuten beträgt. Nach dem Tod des Versuchstieres werden eine Niere, Teile der Lunge, Teile der Leber und das Herz entnommen, in kalter NaCl-Lösung gespült, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Weiterverarbeitung in einem Eppendorf-Tube aufbewahrt.

Die zu messenden Kreislaufparameter werden folgendermaßen bestimmt:

Der MAD kann direkt vom Überwachungsmonitor, welcher an den Druckaufnehmer angeschlossen ist, abgelesen werden.

Die Herzfrequenz wird aus der arteriellen Druckkurve durch Umrechnung ermittelt. Dazu werden die Spitzen der Kurve ausgezählt und diese Anzahl mit einem Umrechnungsfaktor multipliziert, es ergibt sich die Herzfrequenz des Tieres zu einem Zeitpunkt (t).

Der Pressure Rate Index gibt einen Anhaltspunkt über die Höhe des kardialen Sauerstoffbedarfes zu einem Zeitpunkt (t). Er ist definiert als Produkt von MAD und Herzfrequenz, geteilt durch 1000.

Als letzter Parameter ist der Hämatokrit zu bestimmen. Der Hämatokrit ist der Anteil der Erythrozyten am Gesamtblutvolumen. Die Bestimmung erfolgt nach Wintrobe. Eine Hämatokrit-Kapillare wird mit Blut des Versuchstieres aufgezogen, mit Versiegelungskit verschlossen und in einer Hämatokritzentrifuge für eine Minute zentrifugiert. Es trennen sich in der Kapillare die korpuskulären Bestandteile vom Blutserum. Die Kapillare wird auf eine Auswertungsschablone aufgelegt und der Hämatokrit kann direkt in Volumenprozent abgelesen werden.

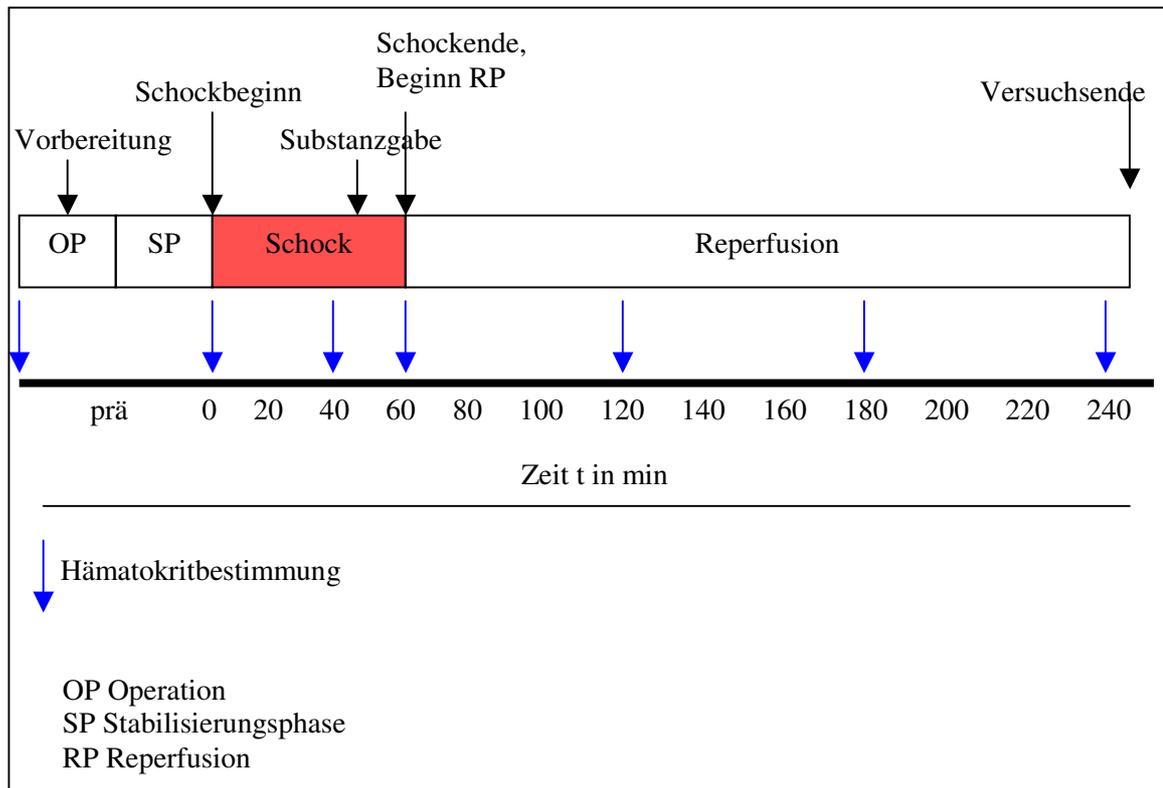


Abbildung 10: Versuchsablauf und zu messende Parameter

4.2 Proteinnachweis mittels Western Blot

Western Blot bezeichnet die Übertragung von Proteinen (hier durch Gelelektrophorese) auf eine Trägermembran, diese Proteine werden im Anschluss durch unterschiedliche Reaktionen (hier Antigen – Antikörper – Reaktionen) nachgewiesen.

Zunächst müssen die Proteine aus den entnommenen Organen extrahiert werden. Dazu wird ein Lysepuffer hergestellt. Anschließend erfolgt die Aufbereitung der Proben. Von den in flüssigem Stickstoff eingefrorenen Gewebeproben werden ca. 100 µg im vorgekühlten Mörser zerkleinert und anschließend mit 1000 µl gekühltem Lysepuffer versetzt.

Tabelle 12: Herstellung des Lysepuffers (-20 °C)

Harnstoff	7 M	17,0 g
Thioharnstoff	2 M	6,1 g
CHAPS	4 %	1,6 g
TRIS Buffer	40 mM	0,194 g
Complete Mini		4 Tabletten
Auffüllen mit Aqua dest. auf		40 ml

Mit einem Pistill wird die Mischung nochmals zerkleinert und in ein Tube überführt. Im Ultrathurrax werden anschließend noch nicht gelöste Gewebeteile durch Ultraschall zertrümmert und in Lösung gebracht. Das Lysat wird eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und dann

bei 20.800 Rcf (relative centrifugal force, relative Zentrifugalbeschleunigung) bei einer Temperatur von 4 °C 90 Minuten zentrifugiert, der Überstand wird abgenommen und für die Proteinbestimmung genutzt. Um feststellen zu können, wie viel Proteinmasse sich in den einzelnen Lysaten befindet, wird die Proteinbestimmung nach Popov vorgenommen.

Tabelle 13: Proteinbestimmung nach Popov, Herstellung der Lösungen

Lösung I	0,65 g Amidoschwarz 10B in 50 ml von Lösung II
Lösung II	30 ml Eisessig (100 %ige Essigsäure), 450 ml Methanol auf 900 ml mit Aqua dest. aufgefüllt
Lösung III	Lösung I mit Lösung II 1:10 verdünnen

Die Lösungen werden im Verhältnis 1:20 mit Wasser verdünnt. Zur Erstellung der Eichkurve wird eine BSA (bovine serum albumine)-Stammlösung (2 mg/1000 µl) mit Aqua dest. auf 25 µg/ml - 125 µg/ml - 250 µg/ml - 500 µg/ml und 1000 µg/ml verdünnt. 200 µl der Eich- bzw. Probelösung wird in Eppendorf-Tubes vorgelegt und durch den Zusatz von 600 µl Lösung III ein Komplex aus Proteinen und Amidoschwarz 10B ausgefällt. Die Probe wird 5 Minuten bei 20.800 Rcf zentrifugiert, der Überstand verworfen. Das Pellet wird dreimal mit 750 µl Lösung II gewaschen und 5 Minuten bei 20.800 Rcf zentrifugiert. Das Pellet wird in 1 ml 0,1 M Natronlauge gelöst, in Mikroküvetten überführt und die Absorption bei 620 nm in einem Spektrophotometer gemessen. Die Eichgerade wird aus den Absorptionswerten der Eichproben bestimmt und die Konzentration der Proben durch Extrapolation gewonnen. Nun kann ermittelt werden, wie viel Probenvolumina für die entsprechende Elektrophorese benötigt wird.

Tabelle 14: Material Proteintrennung mittels Gelelektrophorese und Proteintransfer

1,5 % Ammoniumpersulfat (APS)	150 mg APS in 10 ml Aqua dest. lösen
10 x Sodium dodecyl sulfate (SDS) Elektrophoresepuffer	30,29 g Tris (25 mM) 144 g Glycin (192 mM) 10 g SDS pH 8,3 und auf 1000 ml mit Aqua dest. auffüllen
10 x Transferpuffer	30,29 g Tris (25 mM) 144 g Glycin (192 mM) 10 g SDS pH 8,3 und auf 1000 ml mit Aqua dest. auffüllen
1 x Transferpuffer (mit 20 % Methanol)	100 ml 10 x Transferpuffer 200 ml Methanol 700 ml Aqua dest., pH 8,3
10 x Tris-Buffer Saline (TBS)	12,10 g Tris 90 g NaCl, in 1000 ml Aqua dest. lösen
TBS-T	100 ml 1 x TBS 1 ml 0,1 Tween
Trenngelpuffer Endkonzentration im Gel: 375 mM Tris-HCL, pH 8,8	363 g Tris Base (3,0 M) auf 1000 ml mit Aqua dest. auffüllen Filtration, Lagerung bei 4 °C
Sammelgelpuffer Endkonzentration im Gel: 125 mM Tris-HCL, pH 6,8	30 g Tris Base (3,0 M) auf 500 ml mit Aqua dest. auffüllen Filtration, Lagerung bei 4 °C

Das Prinzip der Elektrophorese nach Laemmli (1970) ist die Proteintrennung nach Ladung und Größe. Die im Elektrophoreseverfahren voneinander getrennten Proteine werden anschließend auf eine Polyvinylidendifluoridmembran transferiert und können mit geeigneten Antikörpern immunologisch nachgewiesen werden.

Tabelle 15: Inhaltsstoffe Trenn- und Sammelgel

Trenngel (für zwei Gele)	Sammelgel (für zwei Gele)
13,5 ml Acrylamid (30 %)	2,5 ml Acrylamid (30 %)
5,62 ml Trenngelpuffer	5 ml Sammelgelpuffer
450 µl 10 % SDS	200 µl 10 % SDS
23,25 ml Aqua dest.	11,3 ml Aqua dest.
2,25 ml APS	1 ml APS
22,5 µl Temed	15 µl Temed

Die Gelelektrophorese wird vorbereitet, indem jegliches Zubehör mit Aqua dest. gespült und anschließend mit 70 %igem Ethanol abgerieben und getrocknet wird. Zunächst wird das Trenngel (Resolving-Gel) hergestellt und in die Kammern gegossen. Anschließend wird das Gel sofort mit 150 µl Isopropanol überschichtet. Es erfolgt die Polymerisation mit einer Wartezeit von 30 bis 45 Minuten. Abschließend wird das fertige Trenngel mit Aqua dest. gespült.

In einem zweiten Schritt wird das Sammelgel hergestellt und zügig über das Trenngel gegossen, die Kämme für die späteren Gelkammern luftblasenfrei eingesetzt und es erfolgt erneut die Polymerisation des hergestellten Gels mit einer Wartezeit von ca. 45 bis 60 Minuten. Nach der Polymerisation werden die Kämme gezogen und die Sammelgele mit Elektrophorese-Puffer gespült. Während der Polymerisation werden die zu analysierenden Proben jeweils mit gleichem Volumen Loading Dye Solution (Laemmli Puffer) versetzt und zur Proteindenaturierung für 5 Minuten bei 95 °C erhitzt, kurz zentrifugiert und auf Eis gelegt. Mit einer Spritze werden die Proben nach Polymerisation des Gels direkt in die Geltaschen aufgetragen. Ein Standard (Kaleidoskope Prestained Lot 31007846) wird mitgeführt. Es erfolgt die Elektrophorese bei konstanter Stromstärke für 20 Minuten bei 40 mA und anschließend ca. 4 Stunden bei 80 mA. Nach der Elektrophorese erfolgt der Proteintransfer aus dem SDS-Polyacrylamidgel auf die Polyvinylidendifluorid-Membran. Zunächst werden alle Bestandteile für den Proteintransfer in Transferpuffer gespült und anschließend wird der Transfer mit einer Tank-Blot Apparatur (mit Platinelektrode) im Sandwich-Aufbau durchgeführt.

Tabelle 16: Aufbau Transferkassette Western Blot

unten		→	oben
Gitter	Schwamm	Filterpapier	Gitter
Silberelektrode (Anode)	Filterpapier	Transfermembran	Platinelektrode (Kathode)
Gitter	Transfermembran	Gel	Gitter
	Gel	Filterpapier	
	Filterpapier	Schwamm	
	Schwamm		

Die Tank Blot Apparatur wird für 12 Stunden bei 0,5 A, anschließend für 1 Stunde bei 1,0 A auf Eis gelegt. Mit dem roten Farbstoff Ponceau S werden die nachzuweisenden Proteine und der mitgeführte Standard sichtbar gemacht. Dazu wird die Membran 2 Minuten in Ponceau S – Lösung gefärbt und anschließend für ebenfalls 2 Minuten in 10 % Essigsäure gewaschen und fixiert. Es schließen sich mehrere Waschschrte mit Aqua dest. an, bis das Proteinbandenmuster erkennbar ist.

Tabelle 17: Material immunologischer Proteinnachweis

10x Tris-Buffer Saline (TBS)	12,10 g Tris 90 g NaCl in 1000 ml Aqua dest. lösen
Spüllösung (TBS-T), 0,1 %:	100 ml 10 x TBS 900 ml Aqua dest. 1 ml Tween
Blockierungslösungen	5 % Magermilchpulver in TBS-T 0,1 % 1 % Magermilchpulver in TBS-T 0,1 %
ECL-plus	Lösung 1 – 25 ml und Lösung 2 – 625 µl gut miteinander vermischen

Der Proteinnachweis erfolgt mit Hilfe spezifischer Antikörper, welche durch Ausbildung charakteristischer Bandenmuster das Vorhandensein der nachzuweisenden Proteine angeben.

Die Membran muss zunächst durch Spülung mit Blockierungslösung behandelt werden, um freie unspezifische Bindungsstellen, an welche die Antikörper ebenfalls binden würden, zu besetzen. Dazu wird die Membran kurz in TBS-T 0,1 % gespült und anschließend mit 5 % Magermilchpulver / TBS-T 0,1 % 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird die Membran nochmals mit TBS-T 0,1 % gespült und mit dem primären Antikörper (in 5 % Blockierungslösung) bei Raumtemperatur für 2 Stunden inkubiert. Es folgen 6 jeweils 5 Minuten dauernde Spülvorgänge mit TBS-T 0,1 %. Nun wird die Membran mit dem sekundären Antikörper (in 1 % Blockierungslösung) bei Raumtemperatur für 1,5 Stunden inkubiert und erneut durch Waschkvorgänge von je 5 Minuten in TBS-T 0,1 % gespült.

Nach Inkubation mit den Antikörpern muss die Membran aktiviert werden. Dies geschieht durch Inkubation mit ECL-plus-Lösung für 5 min. Danach kann die Entwicklung der Blot-Membran in der Dunkelkammer erfolgen. Die Membran wird in eine Röntgenkassette gelegt und bei Rotlicht in der Dunkelkammer mit einem Röntgenfilm (Hyperfilm-Amersham) bedeckt. Es erfolgt die Schließung der Kassette für die vom Hersteller angegebene Entwicklungszeit. Anschließend wird der Röntgenfilm durch Inkubation in Entwicklungs- und Fixierungsflüssigkeit mit zwischenliegenden Spülvorgängen (Aqua dest.) entwickelt und kann ausgewertet werden. Nach Entwicklung der Filme konnte mit Hilfe der Standardbanden, den Proteinbanden eine entsprechende Proteingröße in kDa zugeordnet werden. Die Blot-Membran kann im Kühlschrank aufbewahrt und für weitere Proteinnachweise genutzt werden.

4.3 Myeloperoxidasenachweis

Ischämie und Reperfusion führen zu Migration und Ansammlung von neutrophilen Granulozyten in den verschiedenen (ischämischen) Organen. Die Zellen sorgen mit ihren intrazellulären Granula und Enzymen für die systemische inflammatorische Antwort des Gesamtorganismus. Die Akkumulation von Neutrophilen Granulozyten erfolgt jedoch nicht kontinuierlich im gesamten Organ, diese Zellen sind inhomogen verteilt, sodass die Aktivitätsbestimmung der Myeloperoxidase im gesamten Organ der histologischen Auswertung von einigen Schnitten überlegen ist. [Bradley et al., 1982b] Um die Wirksamkeit von Medikamenten auf diese Vorgänge zu untersuchen, kann die Ansammlung dieser Zellen quantifiziert werden. Einer dieser Enzymnachweise ist die Aktivitätsbestimmung der Myeloperoxidase (MPO), ein für die Neutrophilen Granulozyten spezifisches Enzym, welches antimikrobielle und zytotoxische Eigenschaften aufweist. Angegeben wird die Aktivität der Myeloperoxidase in U/l bzw. U/g Gewebe. 1 Unit (U) ist dabei definiert als Abbau von 1 µmol Peroxid pro min bei einer Temperatur von 25 °C [Bradley et al., 1982a,b, Ormrod et al., 1987, Carden und Granger, 2000, Zakaria et al., 2007, Sato et al., 2008]

Tabelle 18: Herstellung HTAB-Puffer und ODI-Lösung

HTAB-Puffer	ODI-Lösung
250 mg C19H42BrN 45 ml Aqua dest. 5 ml KH ₂ PO ₄ 50 mM Lösung auf pH 6 einstellen	5 ml PBS 0,5 ml H ₂ O ₂ 0,005 % Lösung auf pH 6 einstellen 8,35 mg σ-Dianisidine

Für die Aktivitätsbestimmung der Myeloperoxidase nach der Methode von Mullane in den einzelnen Organen werden alle Ansätze auf Eis durchgeführt und gelagert. Zunächst wird der HTAB-Puffer aus den o.g. Chemikalien hergestellt. Dann werden je Organ ca. 1 g Probenmenge in zehnmal soviel HTAB-Puffer über mindestens 6 Stunden gelöst. Die so erhaltene Mischung wird anschließend mit Hilfe eines Ultra Thurrax 1 min homogenisiert und danach bei 4 °C für 30 min bei 12.500 Rcf zentrifugiert. Der Überstand wird in einem Verhältnis von 1:1000 mit der ODI-Lösung inkubiert. Die Lösungen werden in Mikroküvetten überführt und die Absorption bei 450 nm in einem Spektrophotometer [Mullane et al., 1985] nach 1 min und 2 min gemessen.

Es erfolgt die Berechnung der MPO in U/l mittels der folgenden Formel:

$$\text{MPO-Aktivität in U/l} = \frac{\Delta E}{e \cdot d \cdot t \cdot q}$$

- ΔE - Absorption (2 min – 1 min)
- e - molarer Extinktionskoeffizient σ-Dianisidine bei 460 nm, e = 0,113 l* (µmol*mm)⁻¹
- d - Weglänge des Lichtes (10 mm)
- t - Reaktionszeit (1 min)
- q - Volumenanteil des Überstandes am Volumen der Meßküvette

In einem letzten Schritt wird die Umrechnung der MPO von U/l in U/g Gewebe vollzogen.

5 Ergebnisse

5.1 BAY 11-7085

5.1.1 Effekte im Tiermodell zum hämorrhagischen Schock

Einfluss von BAY 11-7085 auf die Überlebensraten zu $t=240$ min

Es soll die Frage beantwortet werden, ob es einen statistisch signifikanten Unterschied in den Überlebensraten zum Zeitpunkt $t=240$ min zwischen der mit dem Medikament behandelten Gruppe und der Vehikelgruppe gibt.

Vor Beendigung der 60 Minuten dauernden Schockphase wurde den Versuchstieren BAY 11-7085 in entsprechender Konzentration (100 μM gemessen am Blutvolumen berechnet auf das Körpergewicht des einzelnen Tieres zu Versuchsbeginn) über den arteriellen Katheter verabreicht. Vorversuche mit einer Konzentration von 10 μM bzw. 50 μM zeigten keine messbaren Effekte auf die Überlebenszeit, sodass zu dieser höheren Konzentration übergegangen wurde. Die Überlebenszeit in diesen Versuchen ist definiert als die Zeit zwischen der Beendigung des hämorrhagischen Schocks durch Reinfusion des zuvor entnommenen Blutes und dem Versterben des Versuchstieres. Die maximale Überlebenszeit beträgt 240 min, alle Tiere, die zu diesem Zeitpunkt noch lebten, wurden dann euthanasiert.

Als erstes soll die Überlebensrate betrachtet werden. Die Überlebensrate in den Versuchen ist definiert als der Anteil der Tiere (in Prozent) an der Gesamtpopulation der Versuchsgruppe, welcher nach einer bestimmten Zeit t noch gelebt hat. Zunächst überleben alle Tiere der Shamgruppe das Versuchsende. Das bedeutet, die Gabe von BAY 11-7085 hat ohne die Induktion des hämorrhagischen Schocks keinen Einfluss auf die Überlebensrate der Tiere.

Tiere mit induziertem hämorrhagischem Schock und ohne die Gabe von BAY 11-7085 überlebten nicht das Ende der Nachbeobachtungszeit, während 42,9 % der mit dem Medikament behandelten Tiere den Versuch überlebten. Ein statistischer Test (T- Test) zeigt allerdings zum Zeitpunkt $t=240$ min keine signifikante Verbesserung der Überlebensrate der mit BAY 11-7085 behandelten Tiere im Vergleich zur Placebogabe ($p>0,05$ und daher nicht signifikant). Es zeigt sich aber die Tendenz, dass Tiere mit hämorrhagischem Schock unter Behandlung mit BAY 11-7085 höhere Überlebensraten aufweisen als Tiere ohne diese Behandlung.

Die Zusammenhänge der Behandlung der unter hämorrhagischem Schock stehenden Tiere mit BAY 11-7085 im Vergleich zur Placebogabe lassen sich mit Hilfe einer Ereigniszeitanalyse (hier Kaplan-Meier-Überlebensfunktion) darstellen. Dabei wird mit statistischen Analysemethoden die Zeit bis zu einem bestimmten Ereignis (hier Tod des Tieres) zwischen den Gruppen verglichen, um die Wirkung der Medikamentengabe abschätzen zu können. [Janssen und Laatz, 2009]

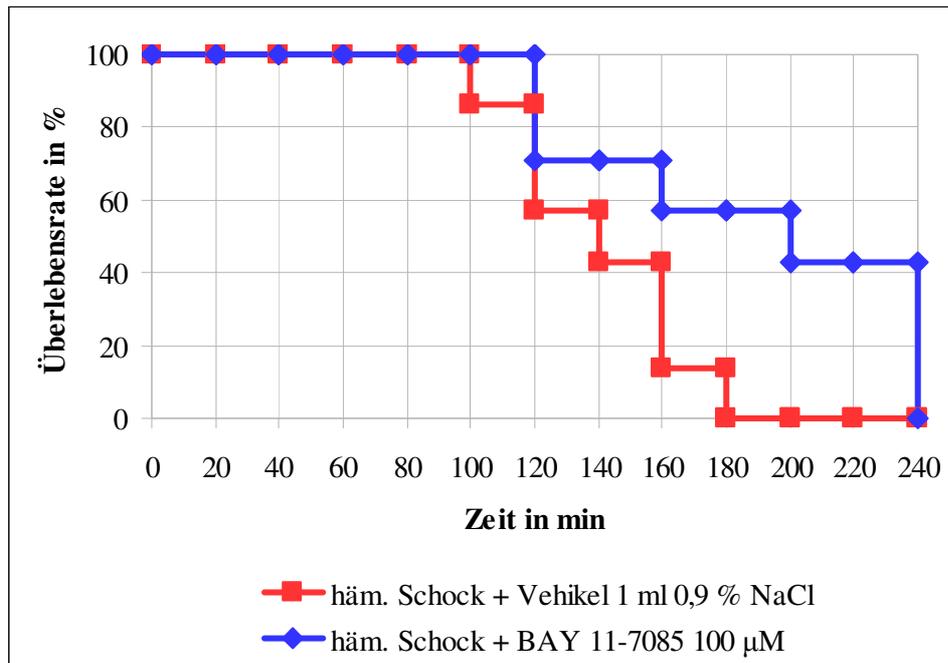


Abbildung 11: Kaplan-Meier-Überlebensfunktion (Überlebensrate) BAY 11-7085

Einfluss von BAY 11-7085 auf die Überlebenszeiten

Wie die unten stehende Grafik verdeutlicht, überleben alle Tiere der Shamgruppe das Ende der Nachbeobachtungszeit, haben also eine mittlere Überlebenszeit von 240 min (Median 240 min) ohne Abweichungen nach oben oder unten.

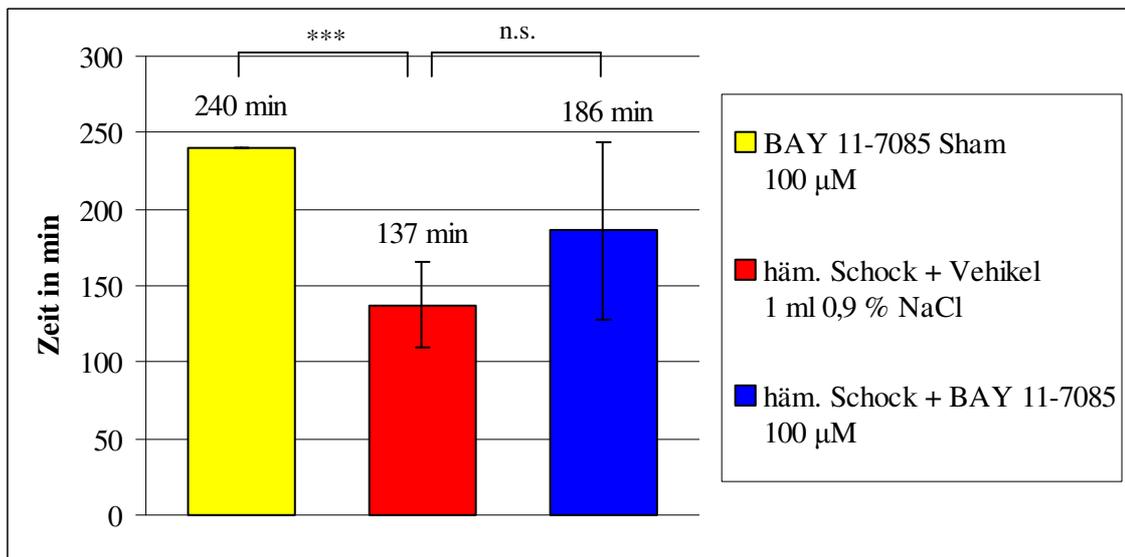


Abbildung 12: Effekt von BAY 11-7085 auf die Überlebenszeiten nach hämorrhagischem Schock unter Angabe des Standardfehlers, *** = $p < 0,001$, n.s. = nicht signifikant

Die Tiere der Vehikelgruppe dagegen weisen insgesamt eine mittlere Überlebenszeit von 137 min (Median 140 min) auf, die minimale bzw. maximale Überlebenszeit beträgt hier 100 min

bzw. 170 min. Die mittlere Überlebenszeit der mit BAY 11-7085 behandelten Tiere beträgt im Vergleich dazu 186 min (Median 200 min) mit einer minimalen bzw. maximalen Überlebenszeit von 110 min bzw. 240 min. Damit zeigen mit BAY 11-7085 behandelte Tiere im Vergleich zu den Tieren der Vehikelgruppe eine Tendenz zu längeren Überlebenszeiten.

Einfluss von BAY 11-7085 auf die Hämodynamik und den Hämatokrit

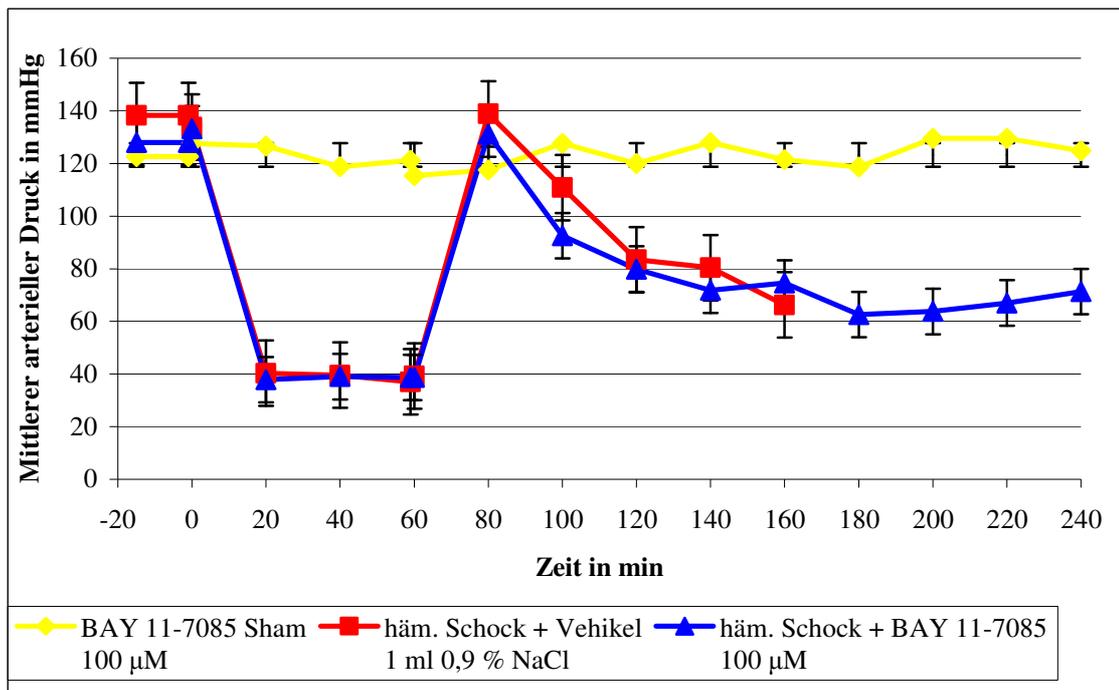


Abbildung 13: Mittlerer Verlauf MAD BAY 11-7085 unter Angabe des Standardfehlers, keine Signifikanz vorhanden

Wie die Grafik zeigt, bleibt zunächst der mittlere Verlauf des MAD der Shamgruppe über die gesamte Versuchsdauer relativ konstant, d.h. die alleinige Gabe des Medikamentes BAY 11-7085 hat keinen Einfluss auf den MAD der Versuchstiere.

Die Vehikel- und Medikamentengruppe zeigen dagegen bedingt durch den experimentell verursachten hämorrhagischen Schock zunächst beide einen von t=0 min bis t=60 min reichenden gleichartigen Verlauf der Kurven. Zu t=60 min steigt der MAD in beiden Gruppen wieder auf die Ausgangswerte an, dies ist erklärbar durch die Reinfusion des zuvor entnommenen Blutes in gesamter Menge, die Schockphase wurde in beiden Gruppen ordnungsgemäß beendet. Anschließend zeigt sich ein Absinken des MAD in beiden Gruppen, wobei der Verlauf der Vehikelgruppe geringfügig höhere Werte im Vergleich zur Medikamentengruppe zeigt. Ab dem Zeitpunkt t=100 min folgt ein gleichartiger Verlauf des MAD beider Gruppen auf einen Wert um ca. 60 mmHg. Dieser Wert bleibt in der Medikamentengruppe bis zum Versuchsende bestehen, während ab t=170 min alle Tiere der

Vehikelgruppe verstorben sind. BAY 11-7085 zeigt die Tendenz der Erhöhung des MAD nach hämorrhagischem Schock in Ratten im Vergleich zur Placebogabe.

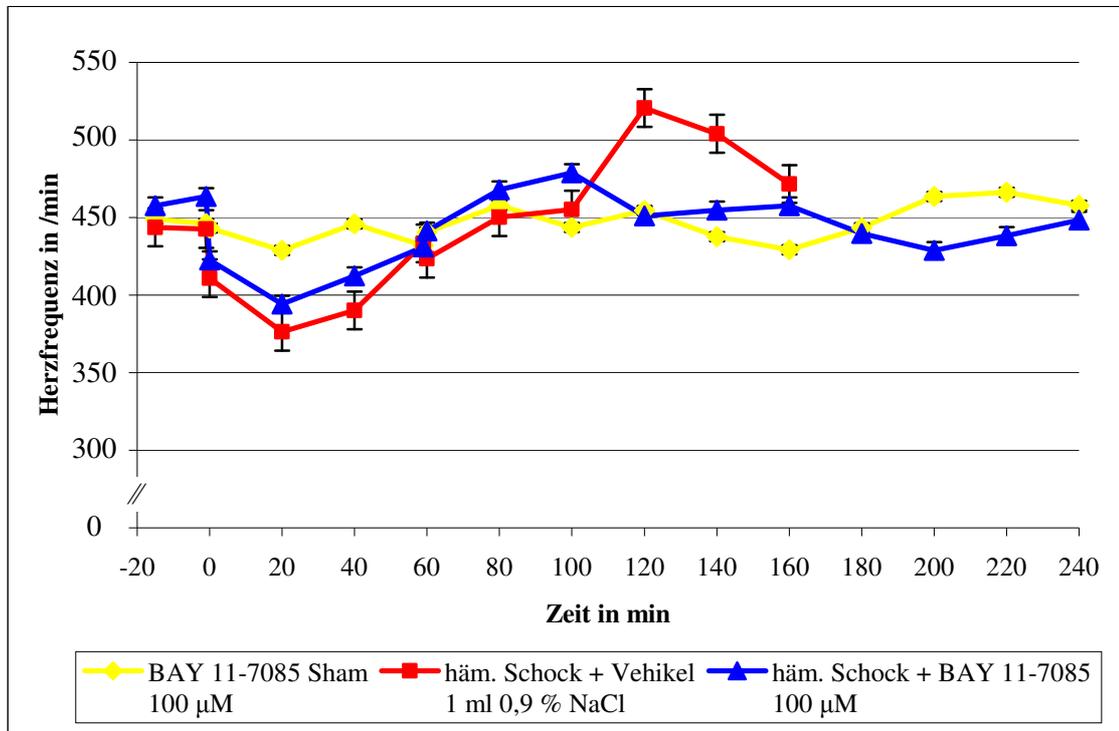


Abbildung 14: Mittlerer Verlauf Herzfrequenz BAY 11-7085 unter Angabe des Standardfehlers, keine Signifikanz vorhanden

Die Herzfrequenz (HF) der Shamgruppe bleibt über die gesamte Versuchsdauer relativ konstant, sodass auch hier die Schlussfolgerung gezogen werden kann, dass die alleinige Gabe von BAY 11-7085 keinen Einfluss auf den mittleren Verlauf der HF der Versuchstiere hat.

Die Graphen der Medikamenten- und Vehikelgruppe zeigen zunächst gleiche Ausgangswerte, sinken dann experimentell bedingt zu t=0 min gleichartig ab und steigen ab t=20 min bis t=60 min wieder auf die jeweiligen Ausgangswerte an. Ab diesem Zeitpunkt zeigen sich jedoch Unterschiede im Verlauf der beiden Kurven. Während sich der Verlauf der HF der Medikamentengruppe mit kleinen Schwankungen nach oben bzw. unten relativ konstant gestaltet (durch jeweils einzelnen Ausreißer nach oben bzw. unten bedingt), steigt die Herzfrequenz der Vehikelgruppe zu t=100 min bis t=120 min sprunghaft an, um dann langsam wieder auf den Wert der Medikamentengruppe zu fallen, dieser wird bei t=160 min erreicht. Ab diesem Zeitpunkt sind nur noch Werte der mit BAY 11-7085 behandelten Tiere vorhanden, da alle Tiere der Vehikelgruppe verstorben sind. Der sprunghafte Anstieg der Vehikelgruppe zu t=120 min kann ebenfalls durch einen einzelnen Ausreißer nach oben erklärt werden. Aus der Grafik lässt sich demnach kein eindeutiger Einfluss des Medikamentes BAY 11-7085 auf die Herzfrequenz nach hämorrhagischem Schock ableiten.

Der Verlauf des Pressure Rate Index ist dem des MAD gleichwertig, was sich aus der Berechnungsweise des PRI ergibt. Aus diesem Grund wurde auf die graphische Darstellung des PRI verzichtet und nur kurz auf den Verlauf eingegangen.

Auch der mittlere Verlauf des Pressure Rate Index (PRI) der Shamgruppe zeigt über die gesamte Versuchsdauer relativ konstante Werte. Auch hier kann geschlussfolgert werden, dass die alleinige Gabe des Medikamentes BAY 11-7085 ohne Induktion des hämorrhagischen Schocks keinen Einfluss auf den Verlauf des PRI der Versuchstiere hat.

Die Graphen der Vehikel- und Medikamentengruppe hingegen zeigen einen dem MAD gleichartigen Verlauf mit Ausnahme eines leichten Anstieges des PRI der Vehikelgruppe zum Zeitpunkt $t=120$ min. Dies erklärt sich aus der Berechnungsweise des PRI und der Tatsache, dass die mittlere Herzfrequenz der Tiere zu diesem Zeitpunkt ebenfalls einen Anstieg zeigt. Das Medikament BAY 11-7085 zeigt also die Tendenz zur Erhöhung des PRI nach hämorrhagischem Schock in Ratten.

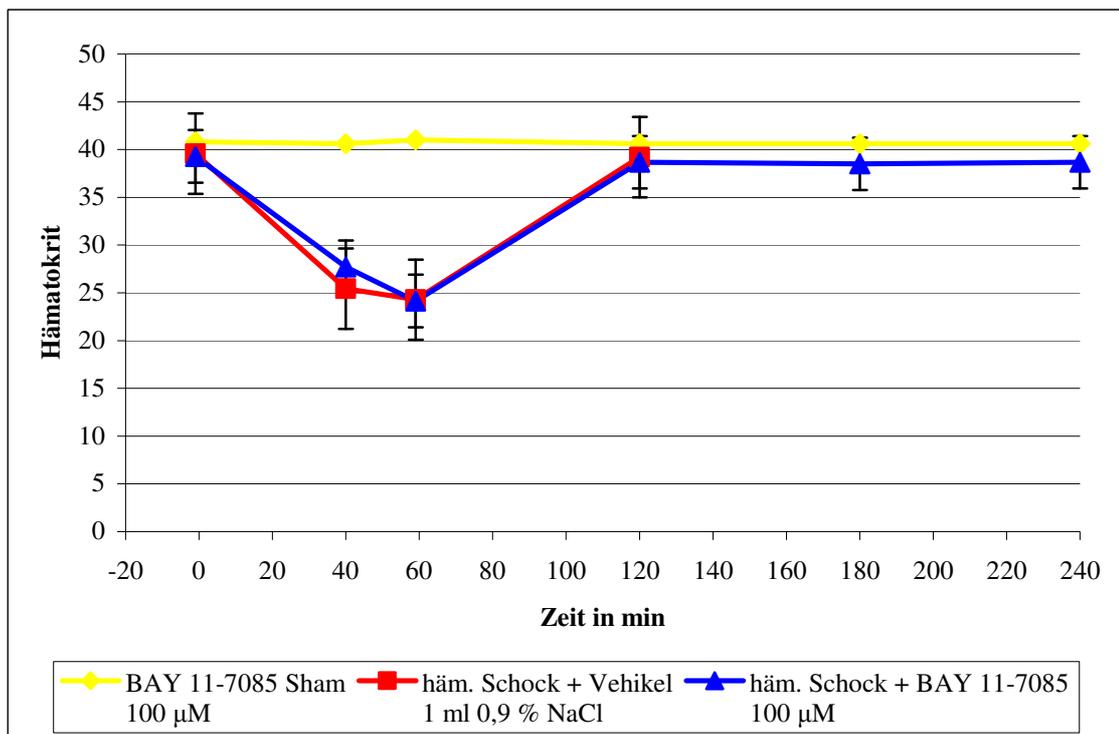


Abbildung 15: Mittlerer Verlauf Hämatokrit BAY 11-7085 unter Angabe des Standardfehlers, keine Signifikanz vorhanden

Der gemessene Hämatokrit bleibt bei Tieren der Shamgruppe konstant, d.h. das Medikament BAY 11-7085 hat ohne Induktion des hämorrhagischen Schocks keinen Einfluss auf den Hämatokrit.

Tiere der Vehikel- und Medikamentengruppe zeigen von $t=0$ min bis zu $t=60$ min einen gleichartigen Verlauf der Graphen, charakterisiert durch ein Absinken des Hämatokrits. Dies

erklärt sich durch die experimentelle Induktion des hämorrhagischen Schocks. Durch den Blutverlust werden im Körper Kompensationsmechanismen aktiviert, die u.a. zur Flüssigkeitsverschiebung aus dem Interstitium in die Blutgefäße führen, sodass das vorhandene intravasale Blutvolumen erhöht wird. Gleichzeitig sinkt aber der Anteil der korpuskulären Bestandteile. Nach Reinfusion des entnommenen Blutes zu $t=60$ min steigt der Hämatokrit in beiden Gruppen gleichartig wieder auf den Ausgangswert an, da durch Rückgabe des entnommenen Blutes auch die entnommenen korpuskulären Bestandteile wieder in die Blutbahn der Tiere zurückgelangen. Ab $t=120$ min zeigt sich jedoch ein Unterschied im Verlauf beider Graphen. Alle Tiere der Vehikelgruppe versterben bis zum nächsten Messzeitpunkt, während der Hämatokrit der mit BAY 11-7085 behandelten Tiere konstant bleibt. Es kann geschlussfolgert werden, dass mit dem Medikament behandelte Tiere eine Tendenz zur Abschwächung der schockbedingten Schrankenstörung zeigen.

5.1.2 Effekte auf die Proteinexpression

Signifikant verminderte Expression von HIF-1 α in der Leber

Das Protein HIF-1 α konnte zunächst nur in der Leber der Versuchstiere mittels Western Blot nachgewiesen werden.

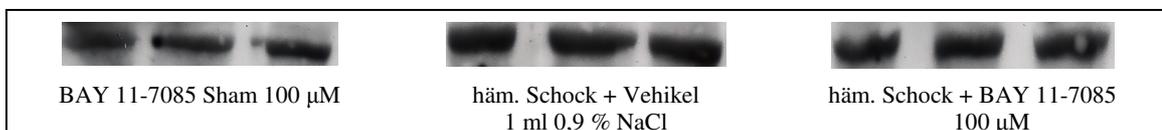


Abbildung 16: Expression von HIF-1 α in der Leber nach Gabe von BAY 11-7085 im hämorrhagischen Schock

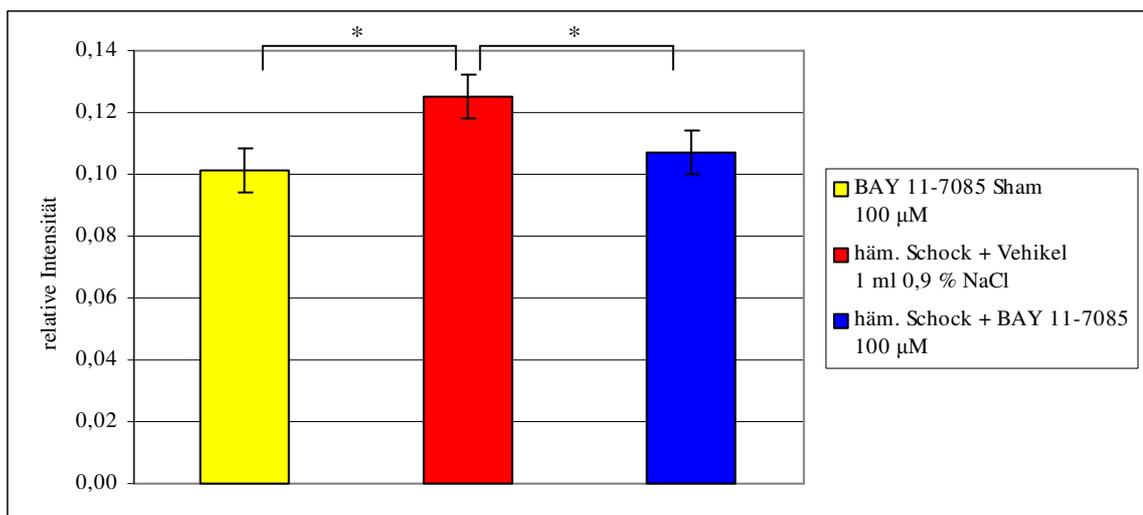


Abbildung 17: Expression von HIF-1 α in der Leber nach Gabe von BAY 11-7085 im hämorrhagischen Schock unter Angabe des Standardfehlers, * = $p < 0,05$

Es zeigte sich eine signifikant verminderte Expression von HIF-1 α in der mit BAY 11-7085 behandelten Gruppe im Vergleich zur Vehikelgruppe. Die Shamgruppe zeigte dagegen die niedrigste Proteinexpression.

Signifikant verminderte Expression von VEGF in Herz und Niere

Das Protein VEGF konnte in den Organen Herz, Lunge und Niere der Versuchstiere nachgewiesen werden. In Herz und Niere der Versuchstiere konnte eine signifikant verminderte Expression von VEGF in den mit BAY 11-7085 behandelten Tieren im Vergleich zur Vehikelgruppe nachgewiesen werden. Die geringste Proteinexpression wiesen Tiere der Shamgruppe auf. In der Lunge hingegen zeigte sich die höchste Proteinexpression in der Shamgruppe, mit BAY 11-7085 behandelte Tiere zeigten die geringste Expression von VEGF.

Signifikant verminderte Expression von I κ B- α im Herz

Das Protein I κ B- α konnte in Herz und Leber der Versuchstiere mittels Western Blot nachgewiesen werden. Es konnte eine signifikant verminderte Expression des Proteins in den Herzen der Medikamentengruppe im Vergleich zur Vehikelgruppe nachgewiesen werden. Die signifikant geringste Expression von I κ B- α zeigte sich in den Herzen der Shamgruppe.

In der Leber der Versuchstiere konnte ebenfalls die höchste Expression in der Vehikelgruppe nachgewiesen werden, die geringste Proteinexpression zeigten die Tiere der Shamgruppe.

Verminderte Expression von p38 im Herz

Das Protein p38 konnte in allen entnommenen Organen nachgewiesen werden.

Im Herz der Versuchstiere zeigte sich die höchste Expression von p38 in Tieren der Vehikelgruppe, die mit BAY 11-7085 behandelten Tiere dagegen wiesen die geringste Expression von p38 auf. In Leber und Niere zeigte sich ein in etwa gleichartiges Ergebnis. Hier zeigte sich die geringste Proteinexpression in der Vehikelgruppe. In der Leber zeigte sich die höchste Proteinexpression in der Shamgruppe, in der Niere dagegen die höchste Expression von p38 in den mit BAY 11-7085 behandelten Tieren. In der Lunge konnte die höchste Proteinexpression in den mit BAY 11-7085 behandelten Tieren nachgewiesen werden, die geringste Expression von p38 zeigte sich dagegen in der Shamgruppe.

Verminderte Expression von T-bet in Herz und Niere

T-bet konnte mittels Western Blot in den Herzen, Lungen und Nieren der Versuchstiere nachgewiesen werden. In Herz und Niere zeigte sich die geringste Expression des Proteins in der Medikamentengruppe. Die höchste Expression von T-bet konnte dagegen in der Vehikelgruppe in diesen Organen nachgewiesen werden. In der Lunge der Versuchstiere konnte

die höchste Proteinexpression ebenfalls in der Vehikelgruppe nachgewiesen werden, hier zeigte jedoch die Shamgruppe die geringste Expression von T-bet.

Zusammenfassung der Effekte von BAY 11-7085 auf die Proteinexpression

Die folgende Tabelle soll die Effekte der Gabe von BAY 11-7085 im hämorrhagischen Schock auf die Proteinexpression zusammenfassend darstellen. Die Shamgruppe wurde jeweils auf den Wert 1 gesetzt, da diese keinem Schock ausgesetzt waren. Eine verstärkte Expression wird durch eine positive Zahl gekennzeichnet, eine verminderte Expression gegenüber der Shamgruppe durch eine negative Zahl (im folgenden auch mit der Farbe rot gekennzeichnet). Vorhandene Signifikanzen zwischen den einzelnen Gruppen wurden ebenfalls ergänzt.

Tabelle 19: Effekte von BAY 11-7085 auf die Proteinexpression im Überblick,
** = p<0,01, * = p<0,05

Organ / Gruppe	HIF-1α	VEGF	IκB-α	p38	T-bet
Leber					
BAY 11-7085 Sham 100 μ M	1,0	-	1,0	1,0	-
häm. Schock + Vehikel 1 ml 0,9 % NaCl	+ 0,2 *	-	+ 0,56 *	- 0,38	-
häm. Schock + BAY 11-7085 100 μ M	+ 0,1 *	-	+ 0,11	- 0,15	-
Lunge					
BAY 11-7085 Sham 100 μ M	-	1,0	-	1,0	1,0
häm. Schock + Vehikel 1 ml 0,9 % NaCl	-	- 0,08	-	+ 0,33	+ 3,24 **
häm. Schock + BAY 11-7085 100 μ M	-	- 0,17	-	+ 0,44	+ 2,25
Herz					
BAY 11-7085 Sham 100 μ M	-	1,0	1,0	1,0	1,0
häm. Schock + Vehikel 1 ml 0,9 % NaCl	-	+ 2,2 *	+ 8,5 **	+/- 0	+ 0,45
häm. Schock + BAY 11-7085 100 μ M	-	+ 0,33 *	+ 5,0 **	+/- 0	- 0,45 **
Niere					
BAY 11-7085 Sham 100 μ M	-	1,0	-	1,0	1,0
häm. Schock + Vehikel 1 ml 0,9 % NaCl	-	+ 3,4 *	-	- 0,2	+ 0,5
häm. Schock + BAY 11-7085 100 μ M	-	+ 0,2 *	-	+ 0,5 *	- 0,2 *

5.1.3 Effekte auf die MPO-Aktivität

Es sollte untersucht werden, ob die Gabe von BAY 11-7085 einen Einfluss auf die Ansammlung von Neutrophilen Granulozyten, charakterisiert durch die Höhe der Myeloperoxidaseaktivität, in den Organen im Vergleich zur Placebogabe hat. Als Vergleichsgruppe wurde die Shamgruppe hinzugezogen. In allen Organen der Versuchstiere der Shamgruppe zeigte sich jeweils die niedrigste MPO-Aktivität.

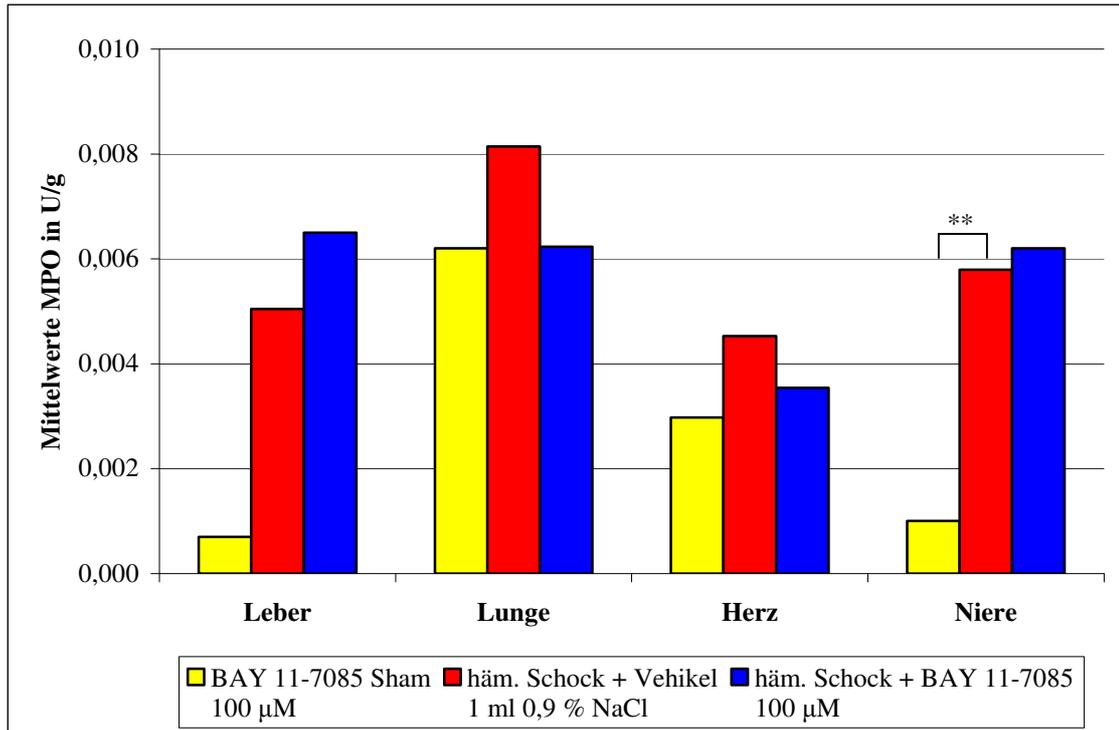


Abbildung 18: Effekte von BAY 11-7085 auf die MPO-Aktivität in den unterschiedlichen Organen, ** = $p < 0,01$, wenn keine Angabe = nicht signifikant

In Niere und Leber zeigten sich im direkten Vergleich der Gruppen BAY und Vehikel höhere MPO-Aktivitäten in den mit BAY 11-7085 behandelten Tieren.

In Lunge und Herz dagegen war die MPO-Aktivität in Organen von Vehikeltieren höher als in den mit BAY 11-7085 behandelten Tieren. Eine signifikante Erhöhung der MPO-Aktivität der Vehikelgruppe im Vergleich zur Shamgruppe zeigte sich lediglich in der Niere der Versuchstiere.

5.2 Pioglitazone Hydrochloride

5.2.1 Effekte im Tiermodell zum hämorrhagischen Schock

Einfluss von Pioglitazone auf die Überlebensraten zu t=240 min

Für das Medikament Pioglitazone soll ebenfalls die Frage beantwortet werden, ob es einen statistisch signifikanten Unterschied in den Überlebenszeiten und Überlebensraten zum Zeitpunkt t=240 min zwischen der Medikamenten- und Vehikelgruppe gibt.

Für Pioglitazone sollte die entsprechende Dosis von zunächst 1 mg/kg KG und später 10 mg/kg KG während der Schockphase intraarteriell (i.a.) injiziert werden. In Vorversuchen zeigte sich jedoch, dass die mit dem Medikament behandelten Tiere sofort nach Injektion noch in der Schockphase verstarben, sodass zu einer i.p. Injektion 12 bis 16 Stunden vor Induktion des hämorrhagischen Schocks übergegangen wurde. Hier traten bei Dosen von 1 mg/kg KG keine messbaren Effekte auf, sodass eine Konzentrationserhöhung auf 10 mg/kg KG erfolgte.

Alle Tiere der Shamgruppe überleben das Ende der Nachbeobachtungszeit, d.h. die alleinige Gabe von Pioglitazone ohne Induktion des hämorrhagischen Schocks hat keinen Einfluss auf die Überlebensrate der Tiere. Tiere der Vehikelgruppe überleben das Ende der Nachbeobachtungszeit nicht, während 57,1 % der mit Pioglitazone behandelten Tiere das Versuchsende überleben. Ein statistischer Test (T-Test) zeigt zum Zeitpunkt t=240 min eine signifikante Verbesserung der Überlebensrate der mit Pioglitazone behandelten Tiere im Vergleich zur Vehikelgruppe ($p < 0,01$).

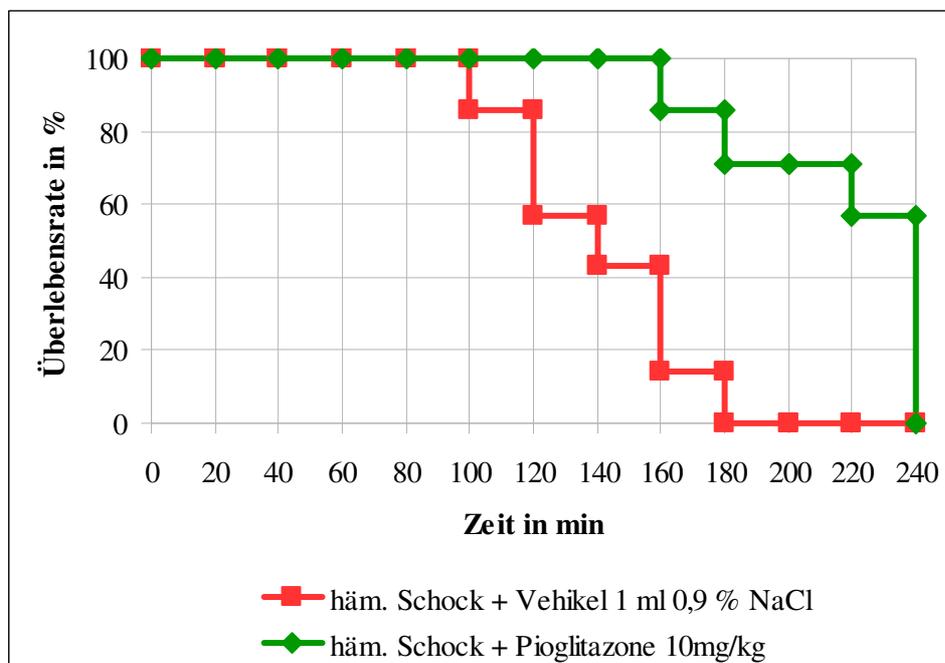


Abbildung 19: Kaplan-Meier-Überlebensfunktion (Überlebensrate) Pioglitazone

Wie ersichtlich wird, verhalten sich die Überlebenskurven beider Gruppen bis zum Zeitpunkt $t=100$ min gleich, d.h. alle Tiere in der Vehikel- und Medikamentengruppe überleben diesen Zeitraum. Zum Zeitpunkt $t=100$ min verstirbt dann das erste Tier der Vehikelgruppe, während es 160 min dauert, bis das erste Tier in der Medikamentengruppe verstirbt. Im Zeitverlauf findet sich ein auf das kumulative Überleben bezogener tendenziell besserer Verlauf der mit Pioglitazone behandelten Tiere im Vergleich zu den mit NaCl behandelten Tieren. Diese sind zum Zeitpunkt $t=170$ min alle verstorben, während noch 6 Tiere der Medikamentengruppe leben. Ein weiteres Tier der mit Pioglitazone behandelten Gruppe verstirbt nach 180 min, die restlichen Versuchstiere überleben alle das Ende der Nachbeobachtungszeit.

Ein statistischer Test (Logrank-Test) zeigt zu den Zeitpunkten $t=140$ min ($p=0,035$), $t=160$ min ($p=0,015$), $t=180$ min ($p=0,01$), $t=200$ min ($p=0,01$) und $t=220$ min ($p=0,035$) statistisch signifikant höhere Überlebensraten der mit Pioglitazone behandelten Tiere im Vergleich zur Vehikelgruppe.

Einfluss von Pioglitazone auf die Überlebenszeiten

Tiere der Shamgruppe überleben alle das Ende der Nachbeobachtungszeit. Im Vergleich dazu haben Tiere der Vehikelgruppe eine mittlere Überlebenszeit von 137 min (Median 140 min), die minimale bzw. maximale Überlebenszeit beträgt 100 min bzw. 170 min. Die Überlebenszeit der mit Pioglitazone behandelten Tiere beträgt durchschnittlich 217 min (Median 240 min) mit einem Minimum bzw. Maximum von 160 min und 240 min. Damit zeigen mit Pioglitazone behandelte Tiere nach hämorrhagischem Schock signifikant längeren Überlebenszeiten im Vergleich zu Tieren der Vehikelgruppe.

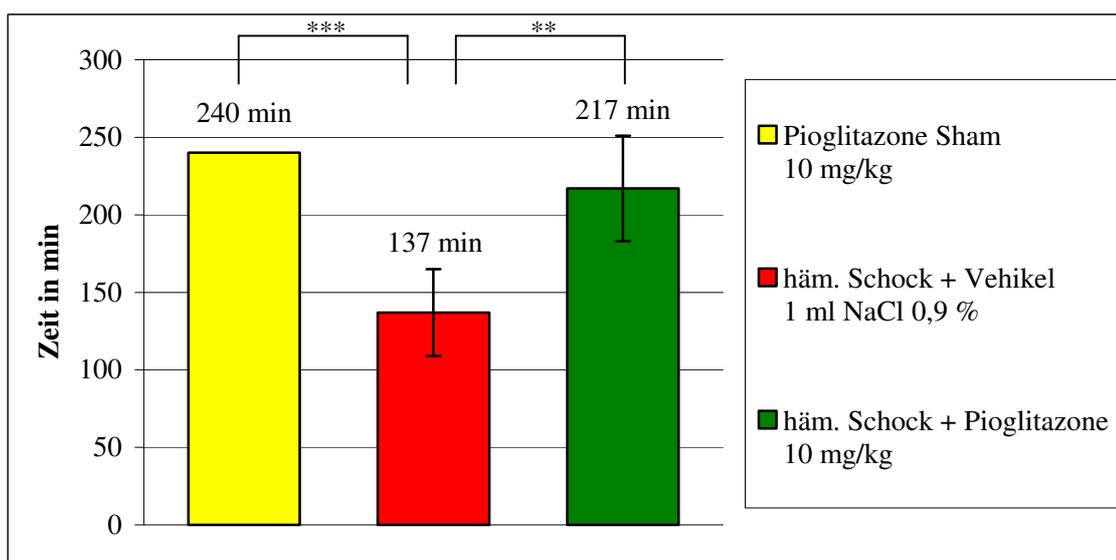


Abbildung 20: Effekt von Pioglitazone auf die Überlebenszeiten nach hämorrhagischem Schock unter Angabe des Standardfehlers, *** = $p<0,001$, ** = $p<0,01$

Einfluss von Pioglitazone auf die Hämodynamik und den Hämatokrit

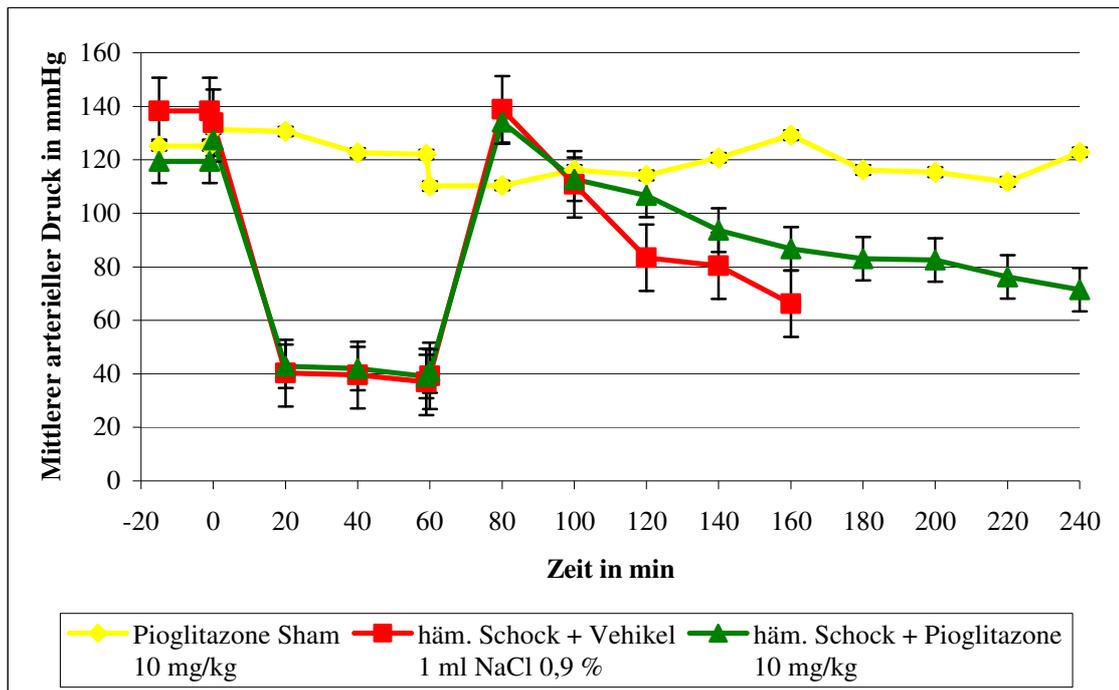


Abbildung 21: Mittlerer Verlauf Mittlerer arterieller Druck Pioglitazone unter Angabe des Standardfehlers, keine Signifikanz vorhanden

Der MAD der Shamgruppe verläuft über die gesamte Versuchsdauer relativ konstant, d.h. die alleinige Gabe von Pioglitazone hat keinen Einfluss auf die Höhe des MAD.

Der MAD der Vehikel- und Medikamentengruppe dagegen zeigt experimentell bedingt durch Induktion des hämorrhagischen Schocks zwischen $t=0$ min und $t=60$ min einen gleichartigen Verlauf. Ab $t=60$ min steigt der MAD in beiden Gruppen zunächst wieder auf die Ausgangswerte an, dies ist erklärbar durch die Reinfusion des zuvor entnommenen Blutes. Im weiteren Verlauf ist ein weitestgehend ähnliches Absinken des MAD in beiden Gruppen bis $t=60$ min zu verzeichnen, wobei der MAD der Medikamentengruppe insgesamt höher ist als in der Vehikelgruppe. Ab dem Zeitpunkt $t=160$ min bleibt der MAD der Medikamentengruppe konstant, während zu diesem Zeitpunkt nur noch 1 Tier der Vehikelgruppe lebt und ab 170 min alle Tiere dieser Gruppe verstorben sind. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Pioglitazone die Tendenz zur Erhöhung des MAD nach hämorrhagischem Schock in Ratten zeigt.

Auch der mittlere Verlauf der Herzfrequenz der Tiere der Shamgruppe bleibt über die gesamte Versuchsdauer konstant, d.h. die alleinige Gabe von Pioglitazone ohne hämorrhagischen Schock hat keinen Einfluss auf die Höhe der Herzfrequenz. Während der Schockphase zwischen $t=0$ min und $t=60$ min zeigt sich ein gleichartiger Verlauf der HF der Vehikel- und Medikamentengruppe, der hämorrhagische Schock ist also in allen Versuchstieren gleich stark.

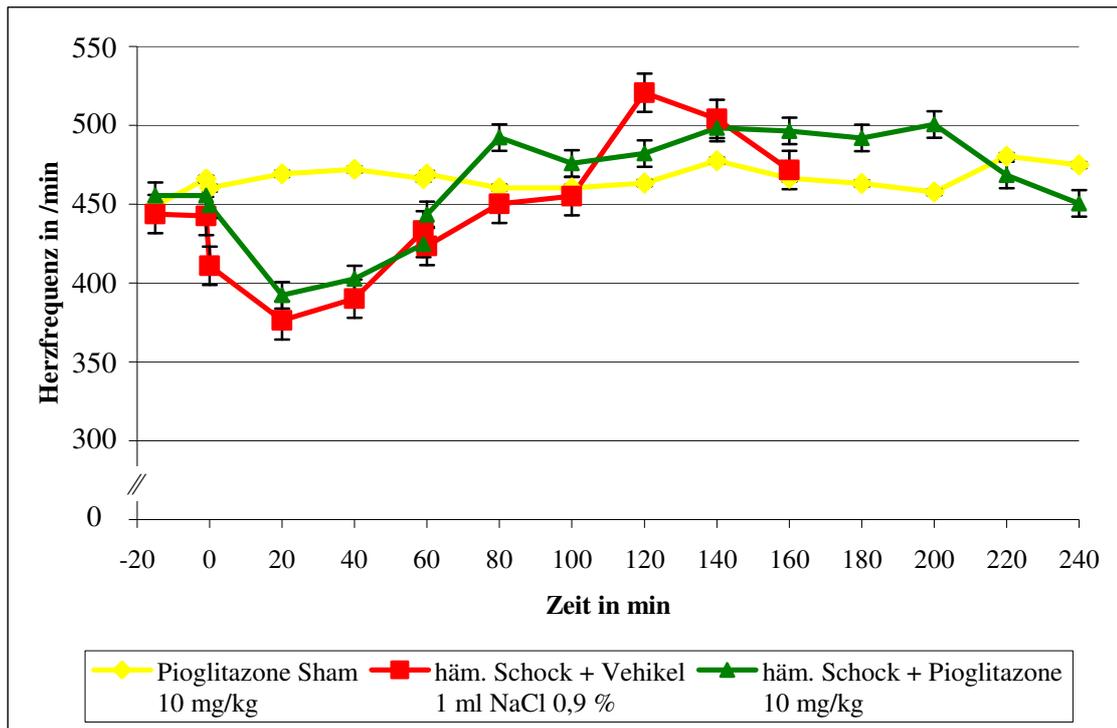


Abbildung 22: Mittlerer Verlauf Herzfrequenz Pioglitazone unter Angabe des Standardfehlers, keine Signifikanz vorhanden

Bis zum Zeitpunkt $t=80$ min erreichen alle Tiere zunächst die Ausgangswerte der Herzfrequenz, wobei die mit Pioglitazone behandelten Tiere einen Anstieg der HF leicht über den Ausgangswert zu verzeichnen haben. Die mittlere Herzfrequenz der Tiere der Medikamentengruppe bleibt bis zu $t=200$ min über dem Niveau der Ausgangswerte und über dem Niveau der HF der Shamgruppe. Erst ab $t=220$ min und $t=240$ min ist ein Absinken der Werte zu verzeichnen. Die Vehikelgruppe dagegen zeigt bis zu $t=120$ min einen sprunghaften Anstieg der Werte der HF, dies kann jedoch durch den einzelnen Ausreißer nach oben erklärt werden. Trotzdem bleibt die Höhe der Werte der HF in dieser Gruppe in ihrer Gesamtheit hinter den Werten der Medikamentengruppe zurück. Ab $t=170$ min sind alle Tiere dieser Gruppe verstorben.

Zusammenfassend zeigt Pioglitazone die Tendenz zur Erhöhung der Herzfrequenz nach hämorrhagischem Schock in Ratten.

Der mittlere Verlauf des PRI bleibt über die gesamte Versuchsdauer konstant, d.h. die alleinige Gabe von Pioglitazone hat keinen Einfluss auf die Höhe des PRI in Ratten.

Wie bereits bei Erläuterung der Ergebnisse des MAD verhalten sich die mittleren Verläufe des PRI der Vehikel- und Medikamentengruppe zunächst bis zum Zeitpunkt $t=60$ min simultan. Zum Zeitpunkt $t=120$ min zeigt sich dann ein sprunghafter Anstieg des PRI in der Vehikelgruppe, dies ist auch hier durch den Ausreißer und die Berechnungsweise des PRI

bedingt und hat keinen Stellenwert auf die Interpretation der Ergebnisse. Insgesamt lässt sich auch hier die Schlussfolgerung ziehen, dass Pioglitazone die Tendenz zur Erhöhung des PRI nach hämorrhagischem Schock in Ratten zeigt.

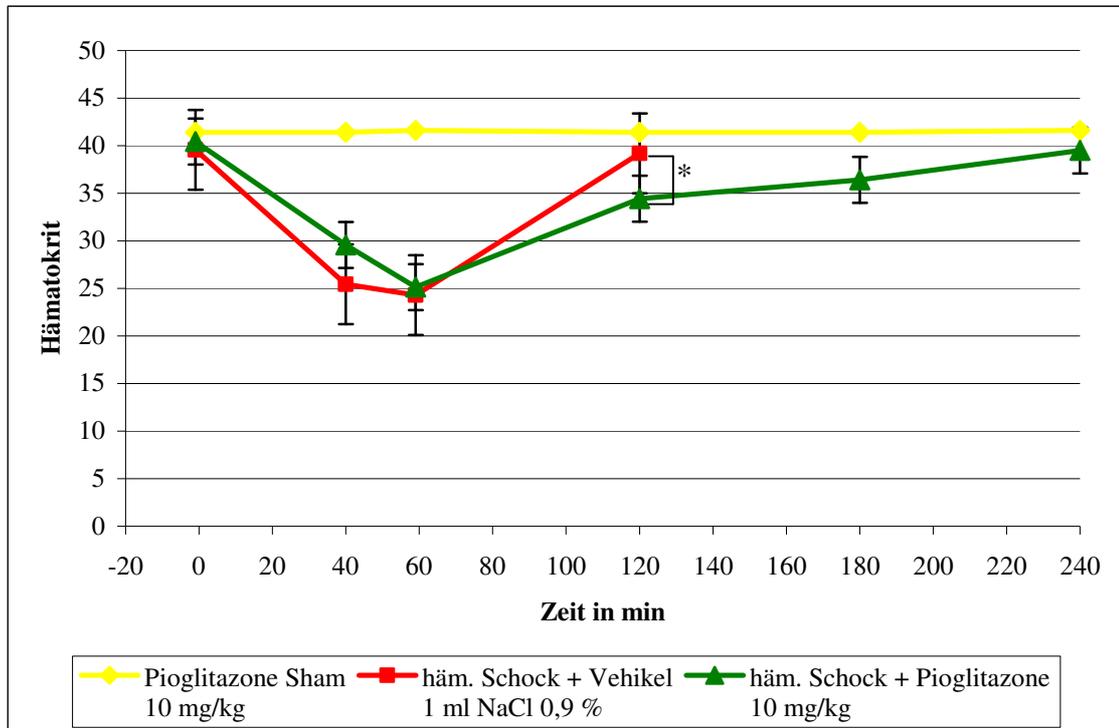


Abbildung 23: Mittlerer Verlauf Hämatokrit Pioglitazone unter Angabe des Standardfehlers, * = $p < 0,05$

Wie aus der Grafik ersichtlich ist, ist der Hämatokrit der Tiere der Shamgruppe über die gesamte Versuchsdauer konstant, d.h. die alleinige Gabe von Pioglitazone hat keinen Einfluss auf den Hämatokrit der Versuchstiere.

Die Vehikel- und Medikamentengruppe zeigen zunächst bis einschließlich $t=60$ min einen gleichartigen Verlauf, d.h. der hämorrhagische Schock wirkt in beiden Gruppen gleich stark. Während zum Zeitpunkt $t=80$ min die Werte der Vehikelgruppe wieder auf den Ausgangswert ansteigen, erreicht die Medikamentengruppe das Ausgangsniveau nicht, dieser Unterschied zwischen Vehikel- und Medikamentengruppe ist signifikant.

Alle Tiere der Vehikelgruppe sind zum erneuten Messzeitpunkt $t=180$ min verstorben, dem entgegen steht der stetige Anstieg des Hämatokrits in der Medikamentengruppe bis auf die Ausgangswerte zu $t=240$ min. Das heisst, es besteht eine Schrankenstörung des Endothels, sodass flüssige Blutbestandteile ins Interstitium abfließen können, während die korpuskulären Blutbestandteile im Gefäßsystem verbleiben. Daher steigt der Hämatokrit der Versuchstiere im Versuchsverlauf weiter an. Insgesamt kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die Gabe von Pioglitazone nach hämorrhagischem Schock in Ratten keinen Einfluss auf die Schrankenstörung hat, da der Hämatokrit im Versuchsverlauf nicht konstant bleibt.

5.2.2 Effekte auf die Proteinexpression

Verminderte Expression von HIF-1 α in der Leber

Die höchste Expression von HIF-1 α in der Leber nach hämorrhagischem Schock zeigte die Vehikelgruppe, gefolgt von der Medikamentengruppe. Die geringste Proteinexpression konnte in der Shamgruppe nachgewiesen werden.

Signifikant verminderte Expression von VEGF in der Niere

Für die mit Pioglitazone behandelten Tiere konnte VEGF in Herz, Nieren und Lungen der Versuchstiere nachgewiesen werden. In Herz und Nieren zeigte die Vehikelgruppe die höchste Expression von VEGF, gefolgt von der mit Pioglitazone behandelten Gruppe. Die Shamgruppe wies die geringste Proteinexpression auf. Die Ergebnisse für die Expression von VEGF in der Niere sind dabei signifikant. In den Lungen der Versuchstiere zeigte sich die höchste Expression von VEGF in der Shamgruppe, die niedrigste in der Vehikelgruppe.

Erhöhte Expression von I κ B- α im Herz

I κ B- α konnte in Leber und Herz der Versuchstiere nachgewiesen werden. In der Leber zeigte sich die höchste Proteinexpression bei Tieren der Vehikelgruppe, gefolgt von den mit dem Medikament behandelten Tieren. Die Shamgruppe zeigte die geringste Expression von I κ B- α . Im Herz dagegen konnte die höchste Expression in den Organen der mit Pioglitazone behandelten Tiere nachgewiesen werden, gefolgt von Tieren der Vehikelgruppe. Auch hier konnte in der Shamgruppe die geringste I κ B- α - Expression verzeichnet werden.

Signifikant erhöhte Expression von p38 im Herz

Auch für die mit Pioglitazone behandelten Tiere konnte p38 in allen entnommenen Organen nachgewiesen werden. In Leber und Lungen zeigte sich das gleiche Ergebnis wie bei den mit BAY 11-7085 behandelten Tieren. Im Herz dagegen konnte eine signifikant stärkere Proteinexpression in den mit Pioglitazone behandelten Tieren, die schwächste in den Organen der Tiere der Vehikelgruppe nachgewiesen werden. In den Nieren zeigte sich die stärkste Expression von p38 in der Shamgruppe, die niedrigste in der Vehikelgruppe.

Signifikant erhöhte Expression von T-bet in der Lunge

T-bet konnte in Herz, Lungen und Nieren nachgewiesen werden. Im Herz zeigte sich die höchste Proteinexpression in der Vehikelgruppe, die geringste in der mit Pioglitazone behandelten Gruppe der Versuchstiere.

In der Lunge konnte die signifikant höchste Proteinexpression in der Shamgruppe, die signifikant geringste Expression von T-bet in der Vehikelgruppe verzeichnet werden.

In den Nieren der Versuchstiere zeigte sich dagegen die höchste T-bet - Expression in den mit Pioglitazone behandelten Tierorganen, während sich die geringste in den Organen der Vehikelgruppe zeigte.

Zusammenfassung der Effekte von Pioglitazone auf die Proteinexpression

Die folgende Tabelle soll die Effekte der Gabe von Pioglitazone im hämorrhagischen Schock auf die Proteinexpression zusammenfassend darstellen. Auch hier wurde die Shamgruppe auf den Wert 1 gesetzt. Eine verstärkte Proteinexpression wird durch eine positive Zahl, eine verminderte Expression durch eine negative Zahl (Farbe rot) sichtbar gemacht. Signifikanzen wurden, wo vorhanden, ergänzt.

Tabelle 20: Effekte von Pioglitazone auf die Proteinexpression im Überblick, ** = p<0,01, * = p<0,05

Organ / Gruppe	HIF-1α	VEGF	IκB-α	p38	T-bet
Leber					
Pioglitazone Sham 10 mg/kg	1,0	-	1,0	1,0	-
häm. Schock + Vehikel 1 ml NaCl 0,9 %	+ 4,33 **	-	+ 7,0 **	- 0,57	-
häm. Schock + Pioglitazone 10 mg/kg	+ 4,0	-	+ 6,5	- 0,07	-
Lunge					
Pioglitazone Sham 10 mg/kg	-	1,0	-	1,0	1,0
häm. Schock + Vehikel 1 ml NaCl 0,9 %	-	- 0,43	-	+ 0,5	- 0,67 *
häm. Schock + Pioglitazone 10 mg/kg	-	- 0,21	-	+ 0,75	- 0,13 *
Herz					
Pioglitazone Sham 10 mg/kg	-	1,0	1,0	1,0	1,0
häm. Schock + Vehikel 1 ml NaCl 0,9 %	-	+ 3,4	+ 3,33 **	- 0,18 *	+ 1,25
häm. Schock + Pioglitazone 10 mg/kg	-	+ 0,4	+ 4,67	+ 0,18 *	- 0,13
Niere					
Pioglitazone Sham 10 mg/kg	-	1,0	-	1,0	1,0
häm. Schock + Vehikel 1 ml NaCl 0,9 %	-	+ 5,0 **	-	- 0,43	- 0,09
häm. Schock + Pioglitazone 10 mg/kg	-	+ 0,25 **	-	- 0,21	+ 0,09

5.2.3 Effekte auf die MPO-Aktivität

Es sollte untersucht werden, ob die Gabe von Pioglitazone einen Einfluss auf die Ansammlung von Neutrophilen Granulozyten, charakterisiert durch die Bestimmung der Myeloperoxidaseaktivität, in den verschiedenen Organen der Versuchstiere im Vergleich zur Placebogabe hat. Als Vergleichsgruppe wurden auch hier die Tiere der Shamgruppe hinzugezogen.

In der Leber zeigte sich die gleiche MPO-Aktivität (Ergebnis auf drei Nachkommastellen gerundet) in den Organen der Sham- und Medikamentengruppe.

In den Organen Herz und Niere der Versuchstiere der Shamgruppe zeigte sich jeweils die niedrigste MPO-Aktivität, in den Lungen der Shamtiere jedoch zeigten sich die höchste MPO-Konzentrationen im Vergleich zu Medikamenten- und Vehikelgruppe.

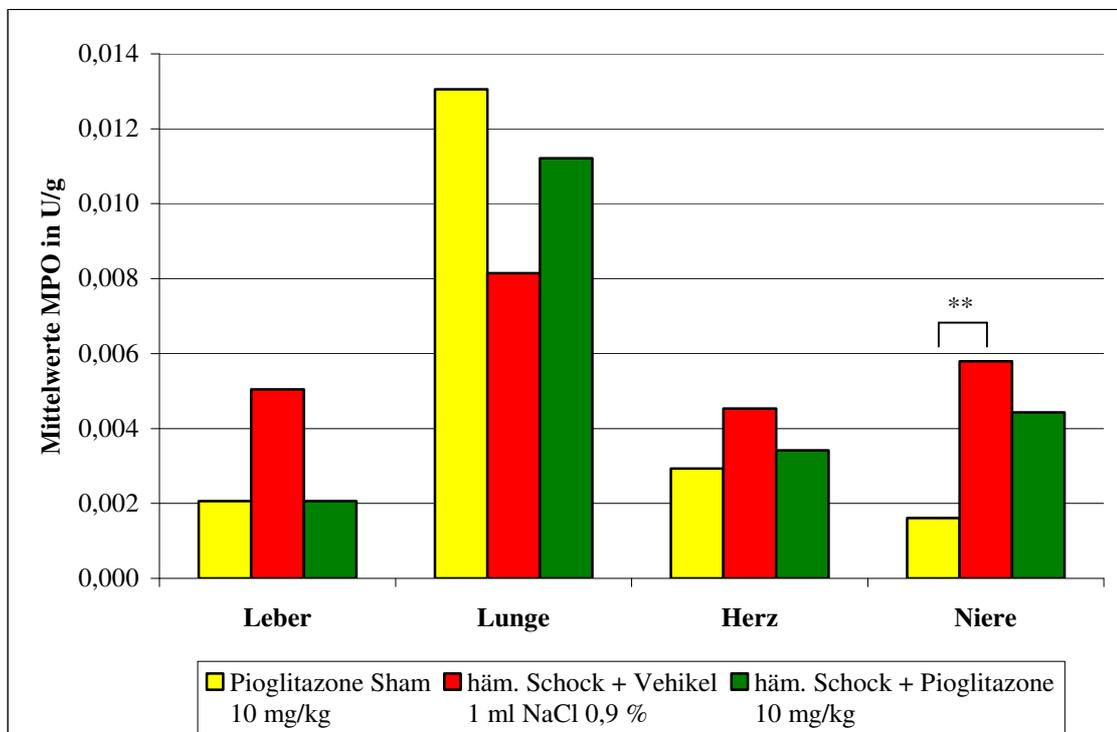


Abbildung 24: Mittelwerte MPO Leber und Niere Pioglitazone, ** = $p < 0,01$, wenn keine Angabe = nicht signifikant

In den Organen Niere und Leber zeigte sich die höchste MPO-Aktivität in der Vehikelgruppe verglichen mit Sham- und Medikamentengruppe. Der Unterschied der MPO-Aktivität in Sham- und Vehikelgruppe der Niere ist dabei signifikant.

In den Lungen der Versuchstiere zeigten sich in der Medikamentengruppe höhere MPO-Aktivitäten als in der Vehikelgruppe. Die höchste MPO-Aktivität konnte jedoch für dieses Organ in der Shamgruppe nachgewiesen werden.

In den Herzen der Versuchstiere dagegen zeigte sich die höchste MPO-Aktivität in der Vehikelgruppe.

6 Diskussion

6.1 Das verwendete Schockmodell

Das optimale Schockmodell sollte reproduzierbar, größtenteils standardisierbar und damit vergleichbar sein. Zur Induktion eines hypovolämischen / hämorrhagischen Schocks existieren das druck- und das volumenkontrollierte Schockmodell. [Jochem et al., 2003; Torres et al., 2004; Zingarelli und Cook, 2005; Lu et al., 2005, Torres Filho et al., 2010] Beim druckkontrollierten Schockmodell wird Blutvolumen der Versuchstiere bis zu einem bestimmten Zielwert (MAD) entnommen und dieser über die gesamte Dauer der Ischämiephase konstant gehalten. Ein Vorteil ist, dass in allen Versuchstieren der hämorrhagische Schock gleich stark induziert wurde, die Daten damit vergleichbar sind. Es kann eine Standardisierung erfolgen, da direkt durch Ablesen des MAD das weitere Vorgehen bestimmt werden kann.

Beim volumenkontrollierten Schockmodell dagegen wird den Versuchstieren zu Beginn der Ischämiephase eine bestimmte Volumenmenge des zirkulierenden Blutes entnommen (bspw. 1 ml Blut pro 100 g KG). Nachteil ist jedoch, dass im Zuge von Anpassungsreaktionen des Organismus² eine Zunahme des zirkulierenden Blutvolumens und damit ein Anstieg des MAD noch in der Schockphase erfolgt und somit die Vergleichbarkeit hinsichtlich Stärke und Wirkung des hämorrhagischen Schocks erschwert. Aus diesen Gründen wurde in der vorliegenden Arbeit das druckkontrollierte Schockmodell gewählt. Die Zeitdauer der einzelnen Phasen wurde dabei so gewählt, dass ein hinreichend schwerer hämorrhagischer Schock ausgelöst wurde, die Versuchstiere innerhalb einer festgesetzten Zeitspanne verstarben und die Experimente damit in einem gewissen zeitlichen Rahmen durchgeführt werden konnten, was die Praktikabilität und die Vergleichbarkeit mit der klinischen Situation³ erheblich erhöhen sollte.

Auch der Ablauf während des gesamten Experimentes sollte standardisiert und dadurch mit anderen Studien vergleichbar sein. Drei Punkte sind dabei besonders von Bedeutung: Die anfängliche Narkotisierung des Versuchstieres erfolgt durch Verabreichung von 60 mg / kg KG Pentobarbital i.p.. In vergleichbaren Studien [Lu et al., 2010] wurde jeweils eine ähnliche, zum Teil etwas geringere Menge des Narkotikums appliziert. Um eine ausreichende Narkosetiefe sicherzustellen und da sich in Vorversuchen die o.g. Menge als praktikabel erwies, wurde diese auch beibehalten. Die Nachdosierung erfolgte jeweils nach klinischer Kontrolle mit positiver Reaktion (Setzen eines Schmerzreizes, dabei sprunghaftes Ansteigen von MAD und HF) mit

² Flüssigkeitseinstrom aus dem Interstitium zur Kompensation des fehlenden Blutvolumens und damit Anheben des MAD während der Ischämiephase ohne weitere Intervention

³ Auch im klinischen Alltag dauert die Schockphase (Ischämiephase) eine gewisse Zeit. Nach einem entsprechenden Ereignis müssen zunächst die Rettungskräfte vor Ort sein, der Patient aus entsprechenden Notlagen befreit und Richtung Klinik transportiert werden. Zwar werden dabei bereits im Rahmen der Erstversorgung am Unfallort Infusionslösungen verabreicht, bei einem akuten Herzinfarkt beispielsweise entsteht aber der Reperfusionsschaden erst durch die Entfernung eines das Herzkranzgefäß verschließenden Thrombus.

einer entsprechend geringeren Dosis des Narkotikums. Hier besteht ein erster Schwachpunkt im verwendeten Modell, da die Beurteilung des klinischen Zustandes stark vom Untersucher abhängt. Da dieser jedoch während der gesamten Versuchsdauer nicht wechselte, kann innerhalb dieser Studie von entsprechender Vergleichbarkeit ausgegangen werden.

Weiterhin wurde die Körpertemperatur der Versuchstiere während des gesamten Versuchsverlaufes (Kontrolle durch ein rektal gesetztes Thermometer) konstant gehalten. Dies erfolgte ebenfalls aus Gründen der Vergleichbarkeit. Studien zeigten bereits, dass eine Hypothermie protektive Effekte [Lee et al., 2002] auf Organ-, Gewebe- und Zellschäden sowie auf die Überlebenszeit nach hämorrhagischem Schock in Ratten hat. Hinzu kommt noch, dass die applizierten Medikamente im Körper verstoffwechselt und später abgebaut werden müssen. Dies geschieht, wie viele weitere biologische Vorgänge auf zellulärer Ebene und unter Einbeziehung von Enzymen. Da die Enzymaktivität wesentlich von der Temperatur abhängt (Reaktionsgeschwindigkeits-Temperatur-Regel), wäre auch hier die Vergleichbarkeit der Reaktionen der Tiere untereinander und mit anderen Studien gefährdet.

Die Medikamentengabe erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten. BAY 11-7085 wurde 15 min vor Ende der Ischämiephase i.a. appliziert. Dies entspricht einem klinischen Prozedere. Im besten Fall könnte bereits der Notarzt am Einsatzort das Medikament applizieren. Vor geplanten Operationen mit zu erwartenden größeren Blutverlusten könnte das Medikament ebenfalls bereits im Vorfeld verabreicht werden. Pioglitazone dagegen wurde in der Versuchsreihe 12 bis 16 h vor Versuchsbeginn i.p. appliziert, weil sich in Vorversuchen eine direkte toxische Wirkung der i.a. Gabe mit sofortigem Tod des Versuchstieres zeigte. Der Grund könnte hier im verwendeten Lösungsmittel liegen. Laut Herstellerangaben muss Pioglitazone, sollte es anders als oral verabreicht werden, in Dimethylsulfoxid (DMSO) und keinesfalls in Wasser gelöst werden. Da DMSO in konzentrierter Form zytotoxische Wirkungen besitzt, werden gerade bei höheren Konzentrationen lebenswichtige Organe geschädigt, die zum Tod des Organismus führen können. Bei intraarterieller Gabe könnte dieser Umstand die entscheidende Rolle spielen. Durch intraperitoneale Gabe bei gesunden Tieren (die erst 12 bis 16 h später dem Versuch unterzogen werden) führte DMSO trotz der langsameren Resorption im Körper in einigen Fällen zu Durchfällen, die eine Verwendung des Tieres zum Versuch unmöglich machten. Auch dies zeigt die Zytotoxizität des Lösungsmittels an. Daher stellt sich hier die Frage nach der klinischen Verwendbarkeit des Medikamentes im hämorrhagischen Schock. Patienten können frühestens mit Bekanntwerden des Krankheitszustandes erste Medikamente erhalten.⁴ Hier besteht also Forschungsbedarf zu möglichen anderen Verabreichungsformen (bspw.

⁴ Eine orale Verabreichung war in der vorliegenden Studie nicht möglich, da die Tiere narkotisiert waren. Eine orale Gabe am Unfallort gestaltet sich ebenfalls als wenig praktikabel, da die Patienten ebenfalls entweder nicht ansprechbar sind und damit ein oral gegebenes Medikament zu Aspiration führen kann bzw. in Vorbereitung auf anstehende Operationen und des Anästhesierisikos (Aspirationsgefahr) der Patient möglichst nüchtern gehalten werden sollte.

intrabronchial) oder Lösungsmitteln für das Medikament. Theoretisch bestünde die Möglichkeit, das Medikament intraperitoneal 15 min vor Beginn der Reperfusion zu verabreichen. Bei intraperitonealer Gabe dauert die Resorption im Körper allerdings länger als bei intraarterieller Gabe. Hinzu kommt der Wirkmechanismus von Pioglitazone. Dieses wirkt auf zellulärer bzw. im Zellkern, der Wirkungseintritt dauert also einige Zeit. Vor geplanten größeren Operationen dagegen könnte das Medikament bereits oral im Vorfeld appliziert werden, die Zytotoxizität des Lösungsmittels würde entfallen.

Ein letzter zu diskutierender Punkt im benutzten Schockmodell ist die Reinfusion des entnommenen Blutes unter Beachtung verschiedener Studien, welche jeweils andere Ansätze und Lösungsmöglichkeiten aufgezeigt haben. So wird im klinischen Alltag vermehrt eine Kombination aus Blut und anderen Infusionslösungen (hypertonische Kochsalzlösung) verabreicht. [Yada-Langui et al., 2004; Hirano et al., 2006; Lu et al., 2010] Da aber der Reperfusionsschaden eben genau durch das Wiedereintreten der Blutzirkulation in betroffenen Organen hervorgerufen wird, wurde in der vorliegenden Arbeit die alleinige Reinfusion des entnommenen Blutvolumens (mit Heparin versetzt) durchgeführt.

Tabelle 21: Vergleich des eigenen Schockmodells mit den verwendeten in der Literatur

Anti-inflammatorische Strategien beim hämorrhagischen Schock in der Ratte	1	2	3	4	5	6
männliche Ratten	+	+	+	+	+	+
Rattengattung Wistar					+	
Körpergewicht Ratte 275 bis 394 g						+
Narkotisierung mit Pentobarbital i.p. (60 mg/kg KG)		+	+			
Körpertemperatur während des Versuches 37 °C konstant	+	+	+	+	+	+
Spontanatmung während des Versuches	+	+	+	+	+	+
Katheter in Arteria carotis communis mit Messung MAD				+	+	
Blutentnahme und Rückgabe über Katheter in Arteria carotis communis						
Hypotoniephase 60 min						
Hypotoniephase mit MAD 35 bis 40 mmHg		+				+
Heparinisierung des entnommenen Blutes mit 15 I.E., Raumtemperatur				+		
komplette Reperfusion des entnommenen Blutes			+			
keine weitere Reperfusion mit anderen Substanzen	+		+	+		
Nachbeobachtungszeit 180 min						

Legende: 1 Torres Filho et al., 2010

2 Li et al., 2010

3 Suzuki et al., 2002

4 Altavilla et al., 2001

5 Hirano et al., 2006

6 Zou et al., 2009

Übereinstimmung mit der eigenen Studie: +

wenn keine Angabe: keine Übereinstimmung mit der eigenen Studie

6.2 Effekte der Medikamente auf die Überlebensraten und -zeiten

Die vorliegende Studie zeigt für die mit BAY 11-7085 behandelten Tiere nach hämorrhagischem Schock eine Tendenz zu längeren Überlebenszeiten (Mittelwert 186 min) im Vergleich zu den mit NaCl behandelten Tieren (137 min). Dabei überleben 42,9 % der mit dem Medikament versorgten Tiere das Ende der Nachbeobachtungszeit, während nach 170 min (Versuchsdauer insgesamt) alle Tiere der Vehikelgruppe verstorben waren.

Desweiteren zeigt die vorliegende Arbeit signifikant höhere Überlebensraten und -zeiten nach Gabe von Pioglitazone und Induktion des hämorrhagischen Schocks in Ratten. Die mit Pioglitazone behandelten Tiere überlebten zu 57,1 % das Ende der Nachbeobachtungszeit (d.h. 240 min) und zeigten eine durchschnittliche Überlebenszeit von 217 min im Vergleich zur Vehikelgruppe mit 137 min.

Die experimentell ermittelten Überlebenszeiten der Vehikelgruppe sind zum Teil vergleichbar mit den Ergebnissen anderer Studien. So konnten Torres Filho et al. 2010 nach Ende des hämorrhagischen Schocks und einer 70minütigen Nachbeobachtungsphase Überlebensraten von 50 % aufweisen. Anzumerken ist jedoch hier, dass während der Ischämiephase eine schrittweise Reduktion des entnommenen Blutes erfolgte und diese Phase insgesamt nur 30 min andauerte, wobei der MAD nicht unter 40 mmHg sinken sollte und im Falle dieser Abweichung bereits interveniert wurde [Torres Filho et al., 2010]. In der vorliegenden Arbeit dagegen wurde der MAD über 60 min auf Werte zwischen 35 und 40 mmHg eingestellt, was einer schwereren und längeren Schockphase entspricht.

Li et al. konnten 2010 ebenfalls Überlebensraten von 50 % nach hämorrhagischem Schock und einer Nachbeobachtungszeit von 120 min angeben. Auch hier ist zu bemerken, dass eine schrittweise Reduktion des Blutvolumens erfolgte (über 20 min in Abständen von 5 min) und die nach 60 min begonnene Reinfusion des entnommenen Blutes in Verbindung mit kristalloiden Lösungen bzw. mit NaCl-Lösungen höheren Volumens und konstanter Dauer erfolgte [Li et al., 2010].

Suzuki et al. befassten sich 2002 mit dem Einsatz verschiedener Sauerstoffkonzentrationen in der eingeatmeten Luft der Versuchstiere und wählten dazu ein Schockmodell mit einer 120minütigen Ischämiephase (MAD 40 bis 50 mmHg). An die Reinfusion des zuvor entnommenen Blutvolumens folgte eine Nachbeobachtungszeit von 120 min. 43 % der untersuchten Tiere (welche spontan Raumluft während des gesamten Versuches einatmeten) überlebten hier das Ende der Nachbeobachtungszeit. [Suzuki et al., 2002] Auch hier bleibt anzumerken, dass der hämorrhagische Schock zwar länger, jedoch nicht so stark bestand und damit diese höhere Überlebensrate erklären könnte.

Weiterhin wurden in vielen publizierten Studien [Altavilla et al., 2001; Hirano et al., 2006; Zou et al., 2009] Blutvolumenersatzlösungen statt des entnommenen Blutes verabreicht. Da jedoch

Erythrozytenkonzentrationen nach hämorrhagischem Schock trotz vielfältiger Nebenwirkungen lebensrettend sind [Abadi et al., 2011], wurde in der vorliegenden Arbeit dieses Prozedere ausgewählt und kann demzufolge nur bedingt mit diesen anderen Versuchsreihen verglichen werden.

Abschließend lässt sich postulieren, dass die Stärke und Dauer des hämorrhagischen Schocks sowie die zeitliche Durchführung (d.h. Zeitspanne, in welcher das Blutvolumen entnommen und reinfundiert wird) in Ratten einen Einfluss auf die Überlebenszeiten und -raten hat.

Für die Gabe der Medikamente BAY 11-7085 und Pioglitazone lagen zum Zeitpunkt der Veröffentlichung der vorliegenden Arbeit keine vergleichbaren publizierten Studien vor.

6.3 Effekte der Medikamente auf Hämodynamik und Hämatokrit

Verlauf des MAD

Zunächst weisen alle Tiere der verschiedenen Gruppen zu Versuchsbeginn keine größeren Unterschiede der Ausgangswerte des MAD auf, dies spricht für eine identische Ausgangslage. Während der Schockphase zeigen alle Tiere einen gleichartigen Verlauf, es zeigt sich somit eine gleichartige Induktion und Erhaltung des hämorrhagischen Schocks (Dauer und Stärke) sowie identische Bedingungen der Tiere zu Beginn der Reperfusionphase. Dieser Verlauf gleicht den Ergebnissen vergleichbarer Studien mit druckkontrolliertem Schockmodell [Suzuki et al., 2002, Jochem et al., 2003, Yada-Langui et al., 2004, Fernandes et al., 2009, Ganster et al., 2010].

Nach erfolgter Reperfusion kann ein Absinken des MAD bis zu 140 min sowohl in der Vehikelgruppe als auch in den mit BAY 11-7085 behandelten Tiere beobachtet werden. Die mit BAY behandelten Tiere zeigen dann bis zum Versuchsende ein konstantes Niveau des MAD. Bei Tieren der Vehikelgruppe dagegen zeigt sich eine progressive Hypotension, bis alle Tiere zum Zeitpunkt $t=160$ min verstorben sind. Ein Grund für die schon zu Beginn leicht erhöhten Werte des MAD der Vehikel- im Vergleich zur Medikamentengruppe könnte das etwas höhere Ausgangsniveau der Werte zum Ende der Schockphase sein. Eine Studie [Torres Filho et al., 2010] zeigte, dass auch Individuen innerhalb einer Art unterschiedliche Reaktionen auf den hämorrhagischen Schock zeigen. Ein weiterer Grund, warum die mit BAY 11-7085 behandelten Tiere zunächst unter dem Niveau der Vehikelgruppe bleiben, könnte im Lösungsmittel des Medikamentes liegen. BAY 11-7085 wird in absolutem Ethanol gelöst. Nach Applikation (i.a.) kommt es zu einer kurzfristigen Vasodilatation der Gefäße [Baretton, 2004], welche sich in einem niedrigeren MAD zeigen kann. In der Folge überwiegen jedoch die protektiven Effekte des Medikamentes, sodass sich ab 140 min eine Stabilität des MAD verzeichnen lässt.

Im Vergleich zu den Tieren der Vehikelgruppe zeigen die mit Pioglitazone behandelten Tiere bis zum Zeitpunkt 80 min einen etwa gleichwertigen Verlauf des MAD. Ab $t=100$ min sinkt der MAD in der Vehikelgruppe steil ab, während dieser Abfall in der mit Pioglitazone behandelten

Gruppe deutlich schwächer ist. Ab $t=140$ min kann gar von einer Stabilisierung des MAD gesprochen werden. Diese Ergebnisse decken sich mit einer Studie [Zingarelli et al., 2009a], die den Einfluss von Ciglitazone im hämorrhagischem Schock in Ratten untersuchte (3-stündige Schockphase mit Zielwert MAD 50 mmHg). Ciglitazone wurde intraperitoneal, zu Beginn der Reperfusionphase verabreicht. Die Gabe von PPAR- γ -Agonisten kann also einer Depression des MAD nach hämorrhagischem Schock entgegenwirken.

Verlauf der Herzfrequenz

Auch hinsichtlich der Herzfrequenz zeigen alle Versuchstiere zu Beginn keine größeren Unterschiede. In der Schockphase steigt jedoch die Herzfrequenz in den Gruppen nicht an, um den erniedrigten MAD zu kompensieren und damit die Sauerstoffversorgung der Organe aufrecht zu erhalten, die Herzfrequenz sinkt. Ein Grund dafür könnte die erhöhte Zytokinausschüttung (TNF- α) sein. Diese führt konsekutiv zu (v.a. linksventrikulär) herabgesetzter myokardialer kontraktile Funktion bzw. myokardialer Dysfunktion [Peitzman et al., 1995, Meldrum et al., 1997, Buerke et al., 1998, Shahani et al., 2000, Shahani et al., 2001, Pruefer et al., 2002, Buerke et al., 2007].

Nach erfolgter Reperfusion zeigen sich zwischen den mit BAY 11-7085 behandelten und den Vehikeltieren bis $t=100$ min zunächst keine Unterschiede. Die Herzfrequenzen beider Gruppen erreichen die Ausgangslage und verlaufen auf ca. gleich hohem Niveau. Zum Zeitpunkt $t=120$ min zeigt sich jedoch in der Vehikelgruppe ein sprunghafter Anstieg der Herzfrequenz, welcher sich durch einen erhöhten Wert eines Tieres erklären lässt. Dieser kann verschiedene Ursachen haben: Zum einen könnte die Narkose zu flach gewesen sein, sodass das Tier Schmerzen erleidet und durch die damit verbundene Ausschüttung von Katecholaminen Blutdruck und Herzfrequenz ansteigen. Vergleicht man jedoch den zugehörigen MAD zu diesem Zeitpunkt, kann dieser Punkt nicht zutreffen. Eine weitere mögliche Erklärung wäre, dass die Herzfrequenz präfinal erhöht war. Weiter unterlegt werden kann diese These durch den bald folgenden Tod des Versuchstieres sowie den parallel bestehenden MAD von 41 mmHg. Im weiteren Verlauf zeigen sich kaum Unterschiede im Verlauf zwischen den Tieren beider Gruppen. Andere Autoren [McDonald et al., 2001, Shahani et al., 2001] konnten ebenfalls diesen Verlauf verzeichnen, wobei die Schockmodelle vom hier verwendeten abwichen (Dauer der Schockphase). BAY zeigt keinen Einfluss auf die Herzfrequenz nach hämorrhagischem Schock. Im direkten Vergleich der verschiedenen Gruppen wird deutlich, dass die Herzfrequenz der mit Pioglitazone behandelten Tiere sogar höher ist als die der Shamgruppe. Im Vergleich zu den mit NaCl behandelten Tieren zeigt sich ebenfalls eine Stabilisierung der Frequenz auf hohem Niveau. Das Medikament führt also zu einer Stabilisierung der Herzfrequenz im Vergleich zur Vehikelgruppe. Bisher liegen keine vergleichbaren Studien zu diesem Parameter in Verbindung mit dem hier verwendeten Medikament vor.

Verlauf des Hämatokrits

Die Entwicklung des Hämatokrits zeigt in allen Gruppen zwischen t=0 min bis t=100 min einen etwa gleichartigen Verlauf, charakterisiert durch ein stetiges Absinken bis zu t=60 min und ab diesem Zeitpunkt einem Wiederanstieg auf das Ausgangsniveau. Ausnahme bildet hier die mit Pioglitazone behandelte Gruppe, sie erreicht die Ausgangswerte nicht. Das Absinken des Hämatokrits während der Schockphase und kurz danach erklärt sich aus der Tatsache, dass kompensatorisch Wasser aus dem Interstitium abgezogen wird, der Anteil der korpuskulären Bestandteile jedoch gemessen am Gesamtvolumen sinkt. Ähnliche Verläufe zeigen sich auch in anderen Studien [Li et al., 2010, Torres Filho et al., 2010], die zum Teil zwar ein verändertes Schockregime (irreversibler hämorrhagischer Schock) nutzten, jedoch zumindest in der Schockphase mit der vorliegenden Arbeit vergleichbar sind.

Bei den mit BAY 11-7085 behandelten Tieren zeigte sich nach erfolgter Reperfusion ein stabiler Verlauf des Hämatokrit über die gesamte Phase. Zum Messzeitpunkt t=180 min lebt jedoch keines der Vehikeltiere mehr⁵, es kann nur der weitere Verlauf der mit BAY behandelten Gruppe betrachtet werden. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Medikamentengabe im hämorrhagischem Schock dem Abfall des Hämatokrits, ausgelöst durch Zytokine, der darauf folgenden Anlockung von Leukozyten, Neutrophilen Granulozyten und deren Ausschüttung von weiteren Sauerstoffradikalen, welche die Zellmembranpermeabilität verändern, entgegenwirkt. Die Hemmung des Transkriptionsfaktors NF- κ B im hämorrhagischen Schock (schockbedingte Zytokinproduktion) durch BAY 11-7085 wirkt also einer Schrankenstörung entgegen.

Tabelle 22: Bisherige Studienergebnisse BAY 11-7085 und Wirkungen im hämorrhagischen Schock (eigene Ergebnisse)

Wirkungen von BAY 11-7085 via Hemmung von NF-κB		
↓	↓	↓
Zelltod	Inflammation	Ischämie / Reperfusion
Induktion von Apoptose und Nekrose (Nierenzellen - Tumorzellen, Lymphozyten)	Inhibition Proliferation und Apoptose (Endometriose)	verminderte Expression von Zytokinen und proinflammatorischen Proteinen, verminderte Aktivierung von Zellen (Neutrophile Granulozyten) (Mesenterialischämie, Hypoxie Lunge und kardiale Fibroblasten)
↓		
hämorrhagischer Schock (eigene Studie)		
Verbesserung von Outcome und Hämodynamik (MAD, Hämatokrit) Abschwächung Leukozytenakkumulation (Lunge, Herz) Verminderung Expression proinflammatorischer Proteine		

⁵ Andere Studien zeigten jedoch einen größeren Abfall des Hämatokrits bei den nicht überlebenden im Vergleich zu den überlebenden Tieren. (Li et al., 2010; Torres Filho et al., 2010)

Pioglitazone dagegen zeigt keinen messbaren Einfluss auf die schockbedingte Schrankenstörung des Gefäßendothels. Ein Grund könnte in der Applikationsform liegen. Während BAY 11-7085 i.a. injiziert und so alsbald im gesamten Organismus verteilt wurde, wo es die Blutgefäßendothelien erreichte, wurde Pioglitazone 12 bis 16 Stunden vor Schockbeginn i.p. verabreicht. Möglicherweise reagiert das Gefäßendothel besser auf den unmittelbaren, direkten Medikamentenkontakt und hat weniger „Speicherfunktion“ im Vergleich zu Zellen anderer Organe und Gewebe.

Tabelle 23: Bisherige Studienergebnisse Pioglitazone und Wirkungen im hämorrhagischen Schock (eigene Ergebnisse)

Wirkungen von Pioglitazone via Hemmung von NF-kB		
↓	↓	↓
Stoffwechsel	Inflammation	Ischämie und Reperfusion
Insulinsensitizer (Diabetes mellitus)	Verminderung der Zytokin-expression (Myokarditis, Asthma bronchiale, Pankreatitis)	verminderte Expression von Zytokinen und proinflammatorischen Proteinen, verminderte Aktivierung von Zellen (Neutrophile Granulozyten) (chronische Herzinsuffizienz, gastrale Ischämie)
↓		
hämorrhagischer Schock (eigene Studie)		
Verbesserung von Outcome und Hämodynamik (MAD, HF) Abschwächung Leukozytenakkumulation (Niere, Herz, Leber) Verminderung Expression proinflammatorischer Proteine		

6.4 Effekte der Medikamente auf die Proteinexpression

6.4.1 HIF-1 α

Der Transkriptionsfaktor HIF-1 liegt als Heterodimer (eine α - und eine β -Untereinheit) im Zellkern vor. Während HIF-1 β dauerhaft exprimiert wird, wird die Bildung und Stabilität der α -Untereinheit durch die zelluläre Sauerstoffversorgung gesteuert. [Lee et al., 2004, Feinman et al., 2010, Ramadori et al., 2010, Shi et al., 2010, Knudsen et al., 2011] Unter sauerstoffreichen Bedingungen wird diese posttranslational durch sauerstoffabhängige Propylhydroxylasen modifiziert und der Abbau durch ubiquitinierte Proteolyse gefördert. [Semenza, 2000, Hu et al., 2003, Lee et al., 2004, van Uden et al., 2008] Bei Hypoxie werden diese Hydroxylasen inaktiviert, HIF-1 α kann mit der β -Untereinheit ein funktionsfähiges Heterodimer bilden, welches dann an Promotorabschnitte (hypoxia response elements) der Zielgene binden kann, deren Transkription beeinflusst und so zur Anpassung der Zelle an veränderte Sauerstoffbedingungen beiträgt. [Semenza, 2001, Lee et al., 2004, Date et al., 2005, Hsieh et al., 2009, Ramadori et al., 2010, Knudsen et al., 2011] HIF-1-aktivierte Gene schützen vor ROS,

induzieren Erythrozytenproliferation und die Ausbildung von Blutgefäßen, Zielgene sind daher u.a. EPO, Transferrin und VEGF. [Semenza, 2001, Khan et al., 2006, Knudsen et al., 2011]

Auch inflammatorische Zytokine sind in der Lage, die Expression von HIF-1 zu beeinflussen. So erhöht durch NF- κ B verstärkt exprimiertes TNF- α die intranukleäre HIF-1 α – Konzentration [Semenza, 2001, van Uden et al., 2008]. Im hämorrhagischen Schock verstärken sich diese Effekte gegenseitig, es herrscht Hypoxie und das systemische inflammatorische Geschehen wird durch verschiedene Zytokine, NF- κ B und andere Transkriptionsfaktoren weiter getriggert. Aus diesem Grund stellt sich die Frage, ob die Expression von HIF-1 α durch Hemmung des NF- κ B (durch BAY 11-7085 bzw. Pioglitazone) in den verschiedenen Schockorganen vermindert ist.

In der vorliegenden Studie konnte HIF-1 α nur in Zellen der Leber mittels Western Blot nachgewiesen werden. Andere Studien konnten einen Nachweis in Herz- [Date et al., 2005, Maloyan et al., 2005, Hsieh et al., 2009] und Nierenzellen [Olmos et al., 2007] erbringen. Dabei wurden jedoch nur Zellkulturen verwendet, während in der vorliegenden Studie der Gesamtorganismus betrachtet wurde. Werden Zellkulturen einer Hypoxie ausgesetzt, erfolgt die Veränderung der Sauerstoffbedingungen direkt über das Kulturmedium bzw. die Umgebung, ein hämorrhagischer Schock wirkt nicht zeitgleich auf andere Zellen bzw. Organe des Gesamtorganismus ein und weitere Störfaktoren können somit ausgeschaltet werden.

Die veränderte Expression von HIF-1 α wurde weiterhin in vielen Studien nur für chronische Hypoxiezustände, wie chronische Lungenerkrankungen und bösartige Neubildungen [Lee et al., 2004], nachgewiesen. Der hämorrhagische Schock dagegen ist ein akutes Krankheitsbild, welches innerhalb kurzer Zeit zum Tode führen kann. Die Nachbeobachtungsphase von 180 min reichte möglicherweise nicht aus, um in allen Organen eine nachweisbar veränderte Proteinexpression zu induzieren. Weiterhin spielt die Sauerstoffhomöostase für die Leberfunktion eine tragende Rolle und das Organ zeigt im Zuge solcher Geschehen möglicherweise als erstes eine veränderte Proteinexpression an. Eine vergleichbare Studie [Kan et al., 2008c] konnte ebenfalls nur in der Leber eine erhöhte HIF-1 α – Expression in der Vehikelgruppe nach hämorrhagischem Schock nachweisen.

Der NF- κ B gilt als direkter Regulator der HIF-1 α -Expression [van Uden et al., 2008]. Wird dieser Faktor nun durch BAY 11-7085 irreversibel gehemmt, müsste sich eine signifikant niedrigere Proteinexpression zeigen. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden.

Der PPAR- γ -Agonist Pioglitazone wirkt ebenfalls über verschiedene Mechanismen auf den NF- κ B ein, es müsste sich ebenfalls eine verringerte Proteinexpression nachweisen lassen, was in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden konnte. Die Shamgruppen zeigten die geringste Expression des Proteins. Da diese Tiere keiner Hypoxie ausgesetzt waren, war dieses Ergebnis vorhersehbar.

6.4.2 VEGF

Der vascular endothelial growth factor (VEGF), ein potentes Mitogen und wichtiger Angiogenesefaktor, ist ein stressinduziertes Glykoprotein, welches als Antwort auf bestimmte Zustände der Zelle (Hypoxie, inflammatorische Zytokine wie IL-6) vermehrt produziert wird. Die im Zuge des hämorrhagischen Schocks auftretende Hypoxie und die Produktion proinflammatorischer Zytokine führen dabei über einen NF-kB-abhängigen Signalweg via Erhöhung der HIF-1 α – Expression⁶ zu erhöhter VEGF-Expression. [Stein et al., 1995, Ferrara und Davis-Smyth, 1997, Vannay et al., 2004, Godzich et al., 2006, Manoilescu et al., 2011]

In der vorliegenden Arbeit konnte VEGF in Herz, Lungen und Nieren der Versuchstiere nachgewiesen werden. Ausgehend von den Western Blots zu HIF-1 α müsste VEGF jedoch ebenfalls in der Leber nachweisbar sein. Möglicherweise steigt in der vorliegenden (und damit zeitlich zu knapp gewählten) Reperfusionphase nur das m-RNA-Level an, während die Translation noch nicht vollständig ablaufen und das Protein mittels Western Blot noch nicht nachgewiesen werden konnte. Eine Studie, welche sich allerdings mit der Expression von VEGF in postischämischen Rattennieren ohne Induktion des hämorrhagischen Schocks im Gesamtorganismus beschäftigte [Vannay et al., 2004], konnte diesen Sachverhalt unterlegen. Weiterhin konnte in anderen Studien gezeigt werden, dass die Expression von VEGF im Western Blot erst 24 Stunden nach Reperfusion ihren Höhepunkt erreicht [Vannay et al., 2004]. Es könnte also für die vorliegende Arbeit angenommen werden, dass die Dauer der Reperfusionphase zu kurz gewählt wurde.⁷ Eine vergleichbare Studie zur VEGF – Expression in der Rattenleber nach hämorrhagischem Schock im Gesamtorganismus fehlt bisher.

Ausgehend von der erhöhten Expression von VEGF über den NF-kB – abhängigen Signalweg müsste nach hämorrhagischem Schock die Expression von VEGF in der Vehikelgruppe signifikant am höchsten sein. Demzufolge dürften Tiere der Shamgruppe die signifikant geringste Expression des Glykoproteins aufweisen. Für Herz und Nieren konnte diese These bestätigt werden. Studien mit Zellkulturen beider Zelltypen zeigten das gleiche Ergebnis [Ferrara und Davis-Smyth, 1997, Vannay et al., 2004, Date et al., 2005, Manoilescu et al., 2011]. Anzumerken ist jedoch die eingeschränkte Vergleichbarkeit mit der vorliegenden Studie. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei, den Transkriptionsfaktor NF-kB beeinflussende Medikamente untersucht. Der irreversible NF-kB – Inhibitor BAY 11-7085 hemmt direkt die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-kB und sollte deshalb zu einer signifikant verringerten Proteinexpression von VEGF führen. Für die Organe Herz und Nieren der

⁶ Dieser Aktivierungsweg wurde in humanen Lungenkrebszellen (Zellkulturen) nachgewiesen. Weiterhin konnte aber eine parallel ablaufende direkte Stimulation der Expression von VEGF durch Zytokine (hier IL-1 β) ohne Einbeziehung des HIF-1 α dargestellt werden. [Stein et al., 1995, Jung et al., 2003]

⁷ In einigen Studien wurde beispielsweise in humanen Lungenkrebszellen die erhöhte Expression von VEGF erst 7 Stunden nach Reperfusion nachgewiesen, während der Nachweis von HIF-1 α bereits 3 Stunden nach Reperfusion gelang. [Stein et al., 1995, Jung et al., 2003]

Versuchstiere konnte diese These in der vorliegenden Studie bestätigt werden. Dieser Nachweis gelang ebenfalls für Pioglitazone. Insgesamt kann also bestätigt werden, dass die Inhibierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B zur verminderten Proteinexpression von VEGF in Herz und Nieren der Versuchstiere führt. Leider fehlen aktuell vergleichbare Studien.

Auch in der Lunge der Versuchstiere sollte durch Hemmung des NF- κ B die Expression von VEGF im Vergleich zur Vehikelgruppe erniedrigt sein, die Shamgruppe sollte die geringste Expression von VEGF aufweisen. Dies ist hier jedoch nicht der Fall. Für die mit BAY 11-7085 behandelten Tiere weist die Shamgruppe die höchste und die Medikamentengruppe die niedrigste Expression von VEGF auf. In der mit Pioglitazone behandelten Gruppe dagegen weist zwar ebenfalls die Shamgruppe die höchste Expression auf, aber die niedrigste Expression ist in der Vehikelgruppe zu finden, was gegen die oben aufgestellte These spricht. Dieser Punkt wurde bereits in anderen Studien diskutiert [Belotti et al., 2003, Godzich et al., 2006, Flister et al., 2009]. Diese zeigten erst nach vierstündiger Ischämiephase ohne nachfolgende Reperfusion einen signifikanten Anstieg in der VEGF – Expression. Als möglicher Grund wurde diskutiert, dass ein Anstieg der VEGF – Rezeptorkonzentration (VEGF – Rezeptor von Typ II) ohne Änderung der totalen Lungenkonzentration von VEGF die Ursache sein könnte. In der vorliegenden Arbeit könnte dieser Punkt für die Behandlung mit BAY 11-7085 neben dem Versuchsmodell die entscheidende Rolle spielen. Für die Behandlung mit Pioglitazone kann eine andere Möglichkeit in Betracht kommen. Pioglitazone hemmt über insgesamt drei verschiedene Mechanismen die Expression und Funktion des NF- κ B. Möglicherweise sind diese Hemmungswege zumindest in Zellen der Lunge zu schwach, um in der Versuchszeit eine deutliche Veränderung der VEGF – Konzentration nachweisen zu können.

Die Shamgruppen beider Medikamentenversuchsreihen weisen jeweils die höchste Konzentration an VEGF auf. Möglicherweise wird hier die Expression von VEGF in der Lunge durch den Stress der Operation und Vorbereitung mehr getriggert als in anderen Organen.

6.4.3 I κ B- α

Das zur Gruppe der Rel/Ankyrin – Familie von Transkriptionsfaktoren gehörende I κ B- α (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor alpha) interagiert mit dem NF- κ B und kontrolliert dessen DNA-Bindung⁸. [Ito et al., 1994] Nach Stimulation durch Zytokine (TNF- α) erfolgt die Phosphorylierung, I κ B- α wird aktiviert und vom NF- κ B getrennt. Nun kann NF- κ B in den Nucleus der Zelle wandern und die Transkription von Zielgenen beeinflussen. Eines dieser Zielgene ist wiederum I κ B- α , die Steigerung der

⁸ Neben I κ B- α existieren noch andere Inhibitorproteine dieser Familie, bspw. I κ B- β . Da dieses jedoch sehr viel hochpotentere Stimuli zur Aktivierung benötigt und die Dissoziation von den Untereinheiten des NF- κ B sehr langsam erfolgt [Ito et al., 1994, Meldrum et al., 1997], wurde in der vorliegenden Studie nur die Expression von I κ B- α per Western Blot untersucht.

Transkriptionsrate des hemmenden Proteins wirkt im Sinne einer negativen Rückkopplung, überschießende Reaktionen werden gedrosselt. [Ito et al., 1994, Yamamoto und Gaynor, 2004, Ganster et al., 2010, Majdalawieh und Ro, 2010]

Das nicht-phosphorylierte Protein konnte mittels Western Blot in Herz und Leber der Versuchstiere nachgewiesen werden. Vergleichbare Arbeiten zum Proteinnachweis des nicht-phosphorylierten I κ B- α nach hämorrhagischem Schock auch in anderen Organen fehlen bisher. BAY 11-7085 ist ein irreversibler Inhibitor der Phosphorylierung von I κ B- α , hemmt damit die Aktivierung des NF- κ B und die nachfolgende Erhöhung der Transkription von I κ B- α . Die Vehikelgruppe müsste daher die signifikant höchste Proteinexpression aufweisen. Nach Induktion des hämorrhagischen Schocks erfolgte keine Behandlung, sodass die Aktivierungsvorgänge von NF- κ B und anschließende Steigerung der Transkription der Zielgene (auch I κ B- α) ungehindert vonstatten gehen sollte. Dies konnte bestätigt werden.

Die Shamgruppe dürfte die signifikant geringste Proteinexpression aufweisen, die Tiere waren keinem hämorrhagischen Schock ausgesetzt, die Aktivierung von NF- κ B unterbleibt und damit auch nachfolgende Reaktionen. Zudem wurde BAY 11-7085 verabreicht, welches ebenfalls einer Aktivierung von NF- κ B entgegenwirkt. Diese These konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden.

Die mit dem Medikament BAY 11-7085 behandelten Ratten müssten von der nachgewiesenen Proteinexpression im Western Blot zwischen der Vehikel- und Shamgruppe liegen. Die Tiere waren einem hämorrhagischen Schock ausgesetzt und erhielten BAY 11-7085, welches direkt Einfluss auf die Aktivierungsvorgänge des NF- κ B nimmt. Diese These kann für die vorliegende Studie bestätigt werden (im Herz signifikant, für die untersuchten Proben der Leber zeigte sich der Trend zu verminderter I κ B- α – Expression gegenüber der Vehikelgruppe). Vergleichbare Arbeiten, die sich mit der Gabe von BAY 11-7085 und dessen Auswirkungen auf die Proteinexpression von nicht-phosphoryliertem I κ B- α im hämorrhagischen Schock beschäftigen, fehlen bisher.

Pioglitazone hat keine direkte Wirkung auf I κ B- α . Trotzdem müsste auch für diese Shamgruppe die Expression von I κ B- α signifikant am niedrigsten sein. Dies ist sowohl im Herz als auch in der Leber der Fall. Gleichwohl müsste die Vehikelgruppe die signifikant höchste Menge an nachgewiesenem Protein aufweisen, dies ist jedoch nur in der Leber der Fall. Für das Organ Herz zeigt sich die höchste Proteinexpression für nachgewiesenes I κ B- α in der Medikamentengruppe. Grund für diese Abweichung könnten die verschiedenen (hemmenden) Wirkmechanismen des Medikamentes auf NF- κ B sein. Diese sind eher indirekter Art, möglicherweise war die gewählte Ischämiezeit für die Wirkweise von Pioglitazone in Zellen des Herzens nicht ausreichend. Leider fehlen auch hier vergleichbare Studien.

6.4.4 p38

Das zu den mitogen-activated protein kinases (MAPK) gehörende p38⁹ ist eine Serin/Threonin-Kinase, welche durch eine Vielzahl von Stimuli (Zytokine, Hypoxie) aktiviert wird. [Pearson et al., 2001, Hommes et al., 2003, Kan et al., 2008b] In inflammatorischen Signalkaskaden ist p38 neben NF-kB einer der Hauptvermittler zwischen den äußeren Bedingungen und dem Nucleus der Zelle, diese Funktion ist unerlässlich für die Zelldifferenzierung, -proliferation und auch den Zelltod.¹⁰ [Gardner et al., 2003, Jarrar et al., 2003, Hommes et al., 2003] Dabei ist p38- α die meist aktivierte Isoform [Hommes et al., 2003], aus diesem Grund wurde hier ein monoklonaler Antikörper gegen diese Isoform (nicht-phosphoryliert) gewählt.

Das Protein konnte in allen entnommenen Organen nachgewiesen werden. Eine vergleichbare Studie zum Gesamtorganismus nach hämorrhagischem Schock fehlt. Es konnten jedoch vergleichbare Schockmodelle eine Expression in den isolierten Organen Herz, Leber bzw. Lunge nachweisen [Kyriakis und Avruch, 2001, Hsu et al., 2007, Kan et al., 2008b, Kochanek et al., 2011, Sato et al., 2012, Liu et al., 2013].

Zunächst muss angemerkt werden, dass nach Studien das Proteinlevel in seiner Gesamtheit in allen Zellen eines Organs gleich ist. Lediglich in der Expression von phosphoryliertem und damit aktiviertem p38 finden sich Unterschiede in den einzelnen Zellen nach hämorrhagischem Schock. [Pearson et al., 2001, Hommes et al., 2003, Kochanek et al., 2011] In der vorliegenden Arbeit zeigten sich jedoch Unterschiede in der Expression von nicht-phosphoryliertem p38 in den einzelnen Organen. Diese könnten sich aufgrund des verwendeten Schockmodells ergeben. Dem gegenüber stehen verschiedene Studienergebnisse, die keinen Unterschied im Gesamtproteinlevel nach verschiedenen Schockmodellen (druck- und volumenkontrolliert, Rückgabe des verlorenen Volumens mittels Ringer-Laktat) aufzeigen konnten. [Pearson et al., 2001, Hommes et al., 2003, Hsu et al., 2007, Kan et al., 2008b, Liu et al., 2013]

In den Herzen der mit BAY 11-7085 behandelten Versuchstiere zeigte sich die stärkste Proteinexpression in der Vehikel-, die niedrigste in der Medikamentengruppe. Dies würde der aufgestellten These, dass der hämorrhagische Schock keinen Einfluss auf das Level an nicht-phosphoryliertem p38 in der Zelle hat, widersprechen. Als möglicher Grund könnte diskutiert werden, dass NF-kB die Expression von p38 erhöht. Wird NF-kB durch BAY 11-7085 gehemmt, ist das Gesamtproteinlevel damit geringer als in den Vehikeltieren, welche keine medikamentöse Intervention erfuhren. Shamtiere sind keinem hämorrhagischem Schock ausgesetzt, sodass eine mögliche NF-kB-abhängige Aktivierung erhöhter Expression von nicht-

⁹ Es existieren vier Isoformen der p38 MAPK: p38- α , - β , - γ und - δ . Diese unterscheiden sich u.a. in ihrem Vorkommen, der Sensibilität für bestimmte Hemmstoffe und ihrer übergeordneten MAPK-Kinase.

¹⁰ Die Vermittlung der Informationen erfolgt über die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren. Die MAPK selbst werden dabei ebenfalls durch Phosphorylierungswege kontrolliert, eine übergeordnete MAPK-Kinase-Kinase (MEKK) phosphoryliert die MAPK-Kinase (MEK 3, 6), welche wiederum MAPK aktiviert.

phosphoryliertem p38 unterbleibt. Möglicherweise ist die Hemmung des NF- κ B im Schock durch das Medikament stärker als bei Tieren ohne Induktion des hämorrhagischen Schocks.

Für Pioglitazone konnte die signifikant höchste Proteinexpression in der Medikamenten-, die signifikant niedrigste in der Vehikelgruppe nachgewiesen werden. Shamtiere wiesen eine höhere Expression als Vehikeltiere auf. Pioglitazone hemmt NF- κ B über andere Mechanismen als BAY 11-7085, sodass es im hämorrhagischen Schock möglicherweise zu verminderter Hemmung von NF- κ B und damit verstärkter Expression von nicht-phosphoryliertem p38 kommt. Vielleicht führt Pioglitazone durch Hemmung von MAPK [Zingarelli und Cook, 2005] sogar zu einer reaktiv verstärkten Expression von p38 auch ohne Schockinduktion.

In der Leber der Versuchstiere zeigte sich für beide Medikamente die höchste Proteinexpression in der Sham-, die Vehikelgruppe wies dagegen die geringste Proteinexpression auf. Möglicherweise haben sowohl BAY 11-7085 als auch Pioglitazone bzw. deren Abbau- oder Umbauprodukte in der Leber einen erhöhenden Einfluss auf die Proteinexpression von nicht-phosphoryliertem p38, unabhängig, ob Tiere dem hämorrhagischen Schock ausgesetzt waren oder nicht. Vergleichbare Studien fehlen zum aktuellen Zeitpunkt.

Zum Nachweis der Expression von nicht-phosphoryliertem p38 in der Lunge existiert eine vergleichbare Studie [Kochanek et al., 2011] mit volumenkontrolliertem Schockmodell und wachen Tieren. Die Expression wurde 1, 4 und 20 Stunden nach Induktion des hämorrhagischen Schocks untersucht. Diese ist zu allen Zeitpunkten in allen Versuchsgruppen gleich, während in der vorliegenden Studie die Expression von p38 in beiden Medikamentengruppen am höchsten, in den Shamgruppen am niedrigsten ist. Möglicherweise hat die Wahl des Schockmodells selbst Einfluss auf die Proteinexpression im Sinne einer Erhöhung dieser. Weiterhin ist es möglich, dass beide Medikamente selbst unabhängig von der Schockinduktion die Expression von nicht-phosphoryliertem p38 positiv beeinflussen.

Vergleichbare Studien zum Nachweis von nicht-phosphoryliertem p38 in der Niere fehlen aktuell. Für die mit BAY 11-7085 behandelten Tiere wies die Medikamentengruppe die höchste, die Vehikelgruppe die niedrigste Proteinexpression auf. Für die mit Pioglitazone behandelten Tiere wies dagegen die Shamgruppe die höchste, die Vehikelgruppe die niedrigste Expression auf. Auch hier kann vermutet werden, dass beide Medikamente unabhängig von der Schockinduktion die Expression von p38 positiv beeinflussen.

6.4.5 T-bet

Der hämorrhagische Schock induziert eine Dysfunktion des Immunsystems, an welcher auch die zellvermittelte Immunantwort einen großen Anteil hat. Durch Einschwemmung von T-Lymphozyten kommt es in den Schockorganen zur Zytokinausschüttung. In T-Lymphozyten sind dabei zwei Transkriptionsfaktoren für deren Produktion von essentieller Bedeutung: NF- κ B

und der T-Box-Transkriptionsfaktor (T-bet)¹¹ [Hohler et al., 2005, Hwang et al., 2005, Lu et al., 2007, Zhang et al., 2012]. In der vorliegenden Studie wurde daher die Expression (nicht phosphoryliertes Protein) mittels Western Blot in den einzelnen Schockorganen untersucht. Für die Leber gelang der Nachweis nicht. Vergleichbare Studien fehlen bisher.

BAY 11-7085 als irreversibler NF-kB – Inhibitor soll die exzessive Zytokinproduktion nach hämorrhagischem Schock hemmen. Deshalb müsste auch die Aktivierung von T-Lymphozyten sowie die Expression von T-bet in den Organen vermindert sein. Tiere der Shamgruppe müssten die geringste Expression von T-bet aufweisen. Demgegenüber müsste die Vehikelgruppe die höchste Proteinexpression aufweisen. Für die Lunge konnte die aufgestellte These bestätigt werden. In Niere und Herz zeigte dagegen die Medikamentengruppe die geringste, die Vehikelgruppe die höchste Expression. Vielleicht war in diesen Organen die NF-kB-Hemmung durch BAY 11-7085 nach Aktivierung der Zytokinproduktion durch den induzierten hämorrhagischen Schock stärker als ohne (Shamtiere). Vergleichbare Studien fehlen bisher.

Pioglitazone hemmt über insgesamt drei bekannte Wirkmechanismen ebenfalls die Aktivierung des NF-kB und damit die Lymphozytenaktivierung. Demzufolge müsste auch hier die Shamgruppe die niedrigste Expression von T-bet aufweisen, die Vehikelgruppe die höchste. Dies trifft in der vorliegenden Arbeit jedoch für keines der untersuchten Organe zu. Im Herz ist die Expression von T-bet in der Vehikelgruppe am höchsten, am niedrigsten jedoch in der mit dem Medikament behandelten Gruppe. Da aber hier nur minimale Unterschiede zwischen Sham- und Medikamentengruppe bestehen, könnten diese vernachlässigt werden. Für die Organe Niere und Lunge kann dieser Kompromiss nicht geschlossen werden. In der Niere weist die mit Pioglitazone behandelte Gruppe die höchste Proteinexpression auf, die Vehikelgruppe die niedrigste. In den Lungen der Versuchstiere dagegen weist die Shamgruppe die höchste Expression auf, die Vehikelgruppe wiederum die signifikant niedrigste. Ein möglicher Grund für diese Abweichungen könnte im Wirkmechanismus von Pioglitazone liegen. Möglicherweise erhöht dieser eher die T-bet-Expression in den Organen. Vergleichbare Arbeiten fehlen.

6.4.6 Zusammenfassung

Die erwarteten Wirkungen des hämorrhagischen Schocks isoliert bzw. in Kombination mit Behandlung mit einem der beiden Medikamente (BAY 11-7085, Pioglitazone Hydrochloride) auf die einzelnen Transkriptionsfaktoren und Proteine sind im folgenden in Form einer Tabelle zur Veranschaulichung aufgeführt. Veränderungen der Expression verschiedener Proteine sind nur aufgeführt, wenn sie den zu erwarteten Veränderungen in dieser Studie entsprachen.

¹¹ Diese zwei Transkriptionsfaktoren interagieren miteinander. Ein Beispiel ist die Produktion von IL-2. Die Phosphorylierung von T-bet führt dabei zur Interaktion mit der RelA-Domäne des NF-kB. Durch Heterodimerisation kommt es zur Bindung von RelA an den IL-2 – Promotor, die Transkriptionsrate des Zytokins wird gesteigert. (Hohler et al., 2005; Hwang et al., 2005)

Tabelle 24: Wirkung des hämorrhagischen Schocks alleine bzw. in Kombination mit beiden Medikamenten auf die Expression der unterschiedlichen Proteine

häm. Schock / häm. Schock + BAY 11-7085 / häm. Schock + Pioglitazone			
NF-kB ↑ ↓ ↓	(P) IκB-α ↑ ↓ ↓	p38 ↑ ↓	(P) T-bet ↑
HIF-1α ↑ ↓ Le ↓ Le	NF-kB ↑ ↓ ↓	NF-kB ↑ ↓ ↓	NF-kB ↑ ↓ ↓
VEGF ↑ ↓ H, N ↓ H, N	IκB-α ↑ ↓ H, Le ↓ Le	p38 ↑ ↓ H ↓ H, Lu	T-bet ↑ ↓ Lu (↓) H

Legende: (P) = Phosphorylierung, H = Herz, N = Niere, Lu = Lunge, Le = Leber
 Farbe: schwarz = hämorrhagischer Schock isoliert
 blau = hämorrhagischer Schock und BAY 11-7085
 grün = hämorrhagischer Schock und Pioglitazone

6.5 Effekte der Medikamente auf die MPO – Aktivität

Die MPO-Aktivität ist ein Maß für die Invasion von Neutrophilen Granulozyten und charakteristisch für inflammatorische Geschehen. [Pruefer et al., 2002, Kan et al., 2008b, Kochanek et al., 2011] Zunächst gelang eine MPO-Aktivitätsbestimmung in allen entnommenen Organen. Vergleichbare Publikationen mit Induktion des hämorrhagischen Schocks und Bestimmung von MPO in den verschiedenen Organen fehlen derzeit. Lediglich eine Studie zur Aktivitätsbestimmung von MPO in Darm, Lunge und Leber existiert. [Zakaria et al., 2007] Diese zeigte unter anderem, dass die Gewebeeinfiltration mit Neutrophilen Granulozyten zeitabhängig und gewebespezifisch ist und u.a. auch vom entnommenen und lysierten Gesamtorgangewicht abhängt. [Zakaria et al., 2007] Verschiedene weitere Studien [Mullane et al., 1985, Hirano et al., 2006, Zakaria et al., 2007, Kan et al., 2008b, Kochanek et al., 2011, Liu et al., 2013] konnten in isolierten Organen ebenfalls eine MPO-Bestimmung durchführen. In Tabelle 25 werden die eigenen Ergebnisse vergleichend mit diesen Studien dargestellt.

Tabelle 25: Vergleich eigene Ergebnisse MPO-Bestimmung mit anderen Studien

<u>Organ</u>	<u>BAY 11-7085</u>	<u>Pioglitazone</u> <u>Hydrochloride</u>	<u>Hirano et</u> <u>al., 2006</u>	<u>Kan et al.,</u> <u>2008 b</u>	<u>Kochanek et</u> <u>al., 2011</u>	<u>Liu et al.,</u> <u>2013</u>
Leber	S < V < B	S = P < V				S < V
Lunge	S = B < V	V < P < S			S < V	
Herz	S < B < V	S < P < V		S < V		
Niere	S < V < B	S < P < V	S < V			

Legende: BAY 11-7085 – eigene Ergebnisse
 Pioglitazone Hydrochloride – eigene Ergebnisse
 S – Sham
 V – Vehikel, hämorrhagischer Schock + Gabe von NaCl
 B – hämorrhagischer Schock + Gabe von BAY 11-7085 (100 µM)
 P – hämorrhagischer Schock + Gabe von Pioglitazone Hydrochloride (10 mg/kg KG)

Dabei zeigten diese Studien, dass die MPO-Aktivität in der Vehikelgruppe höher war als in der Shamgruppe.¹² Damit führt die Induktion des hämorrhagischen Schocks zur Gewebeeinfiltration mit Neutrophilen Granulozyten und damit ansteigender MPO-Aktivität. Auch in der vorliegenden Studie konnte für die Organe Herz, Leber und Niere diese These bestätigt werden. Lediglich für das Organ Lunge (Pioglitazone) zeigt sich in der vorliegenden Arbeit eine Abweichung, hier ist die MPO-Aktivität für die Sham- höher als die der Vehikelgruppe. Ein Grund könnte im für die Bestimmung genutzten Organgewicht liegen. Es wurde für alle entnommenen Schockorgane eine möglichst gleiche Organmenge zur MPO-Bestimmung genutzt. Wie eine Studie [Zakaria et al., 2007] jedoch zeigte, ist für die MPO-Bestimmung in der Lunge ein Organgewicht von 50 mg ausreichend, während beispielsweise für die Leber 100 mg Organgewicht benötigt wird, möglicherweise verfälscht ein zu hohes Organgewicht (Lunge) hier das Ergebnis. Ein weiterer Grund könnte in der inhomogenen Verteilung der Neutrophilen Granulozyten liegen. Dies konnte in einer Studie für Herzgewebe gezeigt werden. [Mullane et al., 1985] In der vorliegenden Studie wurde der komplette rechte Lungenflügel entnommen. Möglicherweise existieren nicht nur Unterschiede in den einzelnen Bestandteilen der Organe, sondern auch lageabhängige Unterschiede (die Nähe zum Myokard).

BAY 11-7085 müsste durch die Verminderung der Freisetzung inflammatorischer Zytokine und damit geringeren chemokinen Effekten (Anlockung von Leukozyten) zu einer verminderten MPO-Aktivität im Vergleich zur Vehikelgruppe führen. Es existiert lediglich eine vergleichbare Studie für den Darm nach Ischämie (durch Abklemmen der Mesenterialarterie) und Reperfusion mit signifikant verminderter MPO-Aktivität nach Medikamentengabe. [Mullane et al., 1985] In der vorliegenden Studie konnte dies in den Organen Lunge und Herz im Vergleich zur Vehikelgruppe nachgewiesen werden. In Niere und Leber jedoch zeigte sich trotz Therapie mit BAY 11-7085 eine im Vergleich zur Vehikelgruppe erhöhte MPO-Aktivität. Eine Ursache könnte die bereits weiter oben angesprochene organ-, zeit- und ortsspezifische Leukozyteninfiltration darstellen [Zakaria et al., 2007]. Ein weiterer Grund für den Unterschied zwischen Leber und den Organen Herz und Lunge könnte in einer bisher noch nicht untersuchten organspezifischen Wirkungsstärke des Medikamentes liegen. In der Leber erfolgt für sehr viele Medikamente der erste Schritt der Entgiftung und des Abbaus. Möglicherweise ist dies der Grund für die geringere Wirkung des Medikamentes in diesem Organ.

In der Niere zeigt sich ebenfalls die höchste MPO-Aktivität in der Medikamentengruppe. Vergleichbare Studien fehlen. Es existieren lediglich Arbeiten, bei denen experimentell eine Pyelonephritis induziert wurde und anschließend die MPO-Aktivität bestimmt wurde. [Ormrod et al., 1987] Dabei konnte gezeigt werden, dass neben den entnommenen Organanteilen (Rinde

¹² Eine absolute Vergleichbarkeit der Gruppen untereinander ist jedoch nicht gegeben. Die Infiltration von Neutrophilen Granulozyten ist zeitabhängig, Vehikeltiere verstarben jedoch zum Teil schon sehr viel früher als Tiere der Medikamenten- oder Shamgruppe. (Limitation der vorliegenden Studie)

und Mark) vor allem exogenes, zu einem Anteil auch zellgebundenes MPO bei Kontakt mit Nierengewebe inaktiviert wird. Möglicherweise verhindert BAY 11-7085 diese auch in normalem Gewebe vorhandene MPO-Inaktivierung durch Nierenzellen, sodass die MPO-Aktivität nur scheinbar höher als in Vehikeltieren ist.

Pioglitazone sollte ebenfalls zur Reduktion der MPO-Aktivität führen. Demzufolge müsste in der Vehikelgruppe eine größere MPO-Aktivität als in der Medikamentengruppe für die einzelnen Organe nachgewiesen werden. Dieser Sachverhalt ist für die Organe Leber, Herz und Niere gegeben. Eine vergleichbare Studie existiert leider nicht. Lediglich das Organ Lunge weicht von dieser These in der vorliegenden Studie ab. Hier zeigt sich eine höhere MPO-Aktivität in der Medikamentengruppe im Vergleich zur Vehikelgruppe. Ursache könnte der entnommene Gewebeanteil bzw. der organspezifische Unterschied sein [Ormrod et al., 1987, Zakaria et al., 2007].

7 Limitationen der Studien

Die vorliegende Studie induzierte den hämorrhagischen Schock im Tiermodell auf der Basis eines druckkontrollierten Schockmodells. Diese Form wurde bereits erfolgreich in vielen weiteren Studien verwendet [Suzuki et al., 2002, Jochem et al., 2003, Yada-Langui et al., 2004, Fernandes et al., 2009, Ganster et al., 2010], sodass von einem etablierten Modell ausgegangen werden kann. Jedoch kann das Tiermodell Ratte nicht gefahrlos auf den Menschen übertragen werden. Zum einen konnte in der vorliegenden Studie nur eine begrenzte Anzahl von Tieren aufgrund der Tierschutzbestimmungen zur Induktion des Schocks und anschließenden Auswertung herangezogen werden, daher ergibt sich eine größere Schwankungsbreite (durch einzelne Ausreißer) der ermittelten Werte, als dies bei einer größeren Anzahl Tiere der Fall sein würde. Weiterhin wurden nur männliche Ratten der Gattung Wistar zu Studienzwecken benutzt. Der Einfluss von Östrogenen auf den hämorrhagischen Schock, die Genaktivierung sowie die Ansammlung von Neutrophilen Granulozyten wurde dabei außer Acht gelassen und sollte in weiteren tierexperimentellen Studien zunächst weiter untersucht werden. Auch die Kontrolle der Narkosetiefe sowie die Nachinjektion von Pentobarbital lässt untersucherabhängig Schwankungen zu. Der Untersucher wechselte zwar während der Versuchsreihe nicht, jedoch ist das Setzen des Schmerzreizes und die Interpretation der Reaktion sowie die Dosierung von Narkosemittel kaum standardisierbar und damit auch nicht objektivierbar bzw. nur schwer mit anderen Studien vergleichbar. Auch in der Medikamentengabe sowie der Darreichungsform ergeben sich Limitationen der durchgeführten Studien. Das Lösungsmittel für die intraarterielle Gabe von BAY 11-7085 (Ethanol) erscheint in der klinischen Situation schwierig, ebenso die intraperitoneale Gabe von in DMSO gelöstem Pioglitazone. Beide Lösungsmittel sind per se schon toxisch, sodass vor allem im Hinblick auf diesen Ansatz weiterer Forschungsbedarf besteht. Auch die intraperitoneale Gabe von Pioglitazone vor Induktion des hämorrhagischen Schocks erscheint für die klinische Akutsituation nicht durchführbar. Erst nach Auftreten von Symptomen des Schocks kann dieser diagnostiziert und therapiert werden. Hier besteht ein weiterer Ansatz nach der bspw. endobronchialen Verabreichung von Pioglitazone in der Ischämiephase. Für elektive Eingriffe dagegen scheint die vorherige Verabreichung möglich. Bezüglich der Durchführung und Auswertung der Western Blots und der MPO-Bestimmung wurden jeweils drei Tiere einer Versuchsgruppe gewählt und über die Ermittlung des Mittelwertes versucht, mögliche Schwankungen durch Messfehler auszugleichen.

Obwohl antiinflammatorische Effekte für BAY 11-7085 und Pioglitazone in Studien veröffentlicht wurden, beschäftigte sich bisher keine Studie mit den Auswirkungen der Medikamentengabe auf den Gesamtorganismus sowie auf die Proteinexpression und die MPO-Aktivität in den Organen Leber, Lunge, Herz und Niere im hämorrhagischen Schock, was die Vergleichbarkeit dieser Arbeit mit anderen Studienergebnissen erschwert.

8 Zusammenfassung und Ausblick

Der hämorrhagische Schock führt zur Entwicklung eines systemischen Entzündungsgeschehens, einen bedeutenden Aktivierungsweg stellt dabei der Transkriptionsfaktor NF- κ B dar. Ziel der vorliegenden Studie war es, zwei die Aktivierung von NF- κ B hemmende Medikamente und ihre Wirkung auf Outcome, Hämodynamik, die Expression verschiedener Proteine sowie die Leukozytenakkumulation im Gewebe im hämorrhagischen Schock in der Ratte zu untersuchen. BAY 11-7085 ist ein irreversibler Inhibitor der TNF- α – assoziierten I κ B- α – Phosphorylierung und damit ein direkter Hemmer der NF- κ B-Aktivierung. Pioglitazone, ist ein PPAR- γ -Agonist und hemmt über verschiedene Wege ebenfalls die NF- κ B-Aktivierung. Für beide Medikamente sollte es zu einer Verbesserung des Outcome, der Hämodynamik sowie zu einer verminderten Leukozytenakkumulation im Gewebe kommen. Die inflammatorische Reaktion des Organismus sollte abgeschwächt werden. Vergleichbare Studienergebnisse fehlen bisher.

In der vorliegenden Studie wurde der hämorrhagische Schock mittels eines druckkontrollierten Modells (mit Rückgabe des entnommenen Blutes) induziert. 100 μ M BAY 11-7085 wurde dabei 15 min vor Reperfusion i.a., Pioglitazone in der Konzentration 10 mg/kg KG 12 bis 16 h vor Versuchsbeginn i.p. verabreicht. Nach maximal 3 Stunden Nachbeobachtungszeit wurden Herz, Lunge, Leber und Niere entnommen. Pro Medikament wurden drei Gruppen gebildet: eine Shamgruppe (nur Medikament), eine Vehikelgruppe (Schock + NaCl) sowie eine Medikamentengruppe (Schock + Medikament). Diese wurden hinsichtlich der Parameter MAD, HF, PRI und Hämatokrit beobachtet, anschließend die Proteinexpression sowie die MPO-Aktivität in den entnommenen Organen bestimmt.

Für BAY 11-7085 zeigte sich eine Tendenz zur Verbesserung des Outcomes sowie Erhöhung des MAD und Abschwächung der schockbedingten Schrankenstörung. Das Medikament verringert signifikant die Expression von HIF-1 α in der Leber, VEGF in Herz und Niere sowie I κ B- α im Herz. Die MPO-Aktivität wird tendenziell in Lunge und Herz verringert.

Pioglitazone führt zu einer signifikanten Verbesserung des Outcomes und zeigt eine Tendenz zur Erhöhung von MAD und HF. Eine schockbedingte Schrankenstörung wird nicht beeinflusst. Die Expression von VEGF in der Niere wird signifikant verringert, die Expression von p38 im Herz sowie T-bet in der Lunge signifikant erhöht. Die MPO-Aktivität in Niere, Herz und Leber wird tendenziell vermindert.

Zusammenfassend zeigt BAY 11-7085 im hämorrhagischen Schock antiinflammatorische Effekte, scheint jedoch auf Outcome und hämodynamische Parameter wenig Einfluss zu haben, für Pioglitazone kann dagegen ein protektiver Effekt auf Outcome, klinische Parameter und das inflammatorische Geschehen angenommen werden. Pioglitazone scheint daher besser protektiv als BAY 11-7085 zu wirken. Eine Anwendung im hämorrhagischen Schock scheint denkbar. Es stellt sich das Problem des Lösungsmittels und der Applikation, hierzu sollten weitere

tierexperimentelle Studien durchgeführt werden. Für elektive Eingriffe mit erwartetem hohem Blutverlust stellt Pioglitazone jedoch trotzdem eine Option dar. Eine kombinierte Gabe beider Wirkstoffe wäre auch vorstellbar, um die antiinflammatorischen Effekte zu verstärken und das Outcome zu verbessern.

9 Literaturverzeichnis

Abadi U, Butenero G, Kogan T, Ziv O, Paran H, Ellis MH (2011) Prolonged Blood Storage Does Not Effect Survival in an Animal Model of Hemorrhagic Shock. *Transfus Med Hemother* 38(4):272-276.

Abdelrahman M, Collin M, Thiemermann C (2004) The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand 15-deoxyDelta12,14 prostaglandin J2 reduces the organ injury in hemorrhagic shock. *Shock* 22(6):555-561.

Altavilla D, Saitta A, Guarini S, Galeano M, Squadrito G, Santamaria LB, Venuti FS, Bazzani C, Bertolini A, Squadrito F (2001) Nuclear factor-kappaB as a target of cyclosporin in acute hypovolemic hemorrhagic shock. *Cardiovasc Res* 52(1):143-152.

Belotti D, Paganoni P, Manenti L, Garofalo A, Marchini S, Taraboletti G, Giavazzi R (2003) Matrix metalloproteinases (MMP9 and MMP2) induce the release of vascular endothelial growth factor (VEGF) by ovarian carcinoma cells: implications for ascites formation. *Cancer Res* 63(17):5224-5229.

Bradley PP, Christensen RD, Rothstein G (1982) Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. *Blood* 60(3):618-622.

Bradley PP, Priebat DA, Christensen RD, Rothstein G (1982) Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol* 78(3):206-209.

Buerke M, Pruefer D, Dahm M, Oelert H, Meyer J, Darius H (1998) Blocking of classical complement pathway inhibits endothelial adhesion molecule expression and preserves ischemic myocardium from reperfusion injury. *J Pharmacol Exp Ther* 286:429-38.

Buerke M, Pruefer D, Sankat D, Carter JM, Buerke U, Russ M, Schlitt A, Friedrich I, Borgermann J, Vahl CF and others (2007) Effects of aprotinin on gene expression and protein synthesis after ischemia and reperfusion in rats. *Circulation* 116:1121-6.

Buerke U, Pruefer D, Carter JM, Russ M, Schlitt A, Prondzinsky R, Makowski J, Rohrbach S, Niemann B, Schulze C, Dahm M, Vahl CF, Werdan K, Buerke M (2008) Sodium/hydrogen exchange inhibition with cariporide reduces leukocyte adhesion via P-selectin suppression during inflammation. *Br J Pharmacol* 153(8):1678-1685.

Carden DL, Granger DN (2000) Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol* 190(3):255-266.

Date T, Mochizuki S, Belanger AJ, Yamakawa M, Luo Z, Vincent KA, Cheng SH, Gregory RJ, Jiang C (2005) Expression of constitutively stable hybrid hypoxia-inducible factor-1alpha protects cultured rat cardiomyocytes against simulated ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Cell Physiol* 288(2):C314-320.

Efrati S, Berman S, Ben Aharon G, Siman-Tov Y, Averbukh Z, Weissgarten J (2008) Application of normobaric hyperoxia therapy for amelioration of haemorrhagic shock-induced acute renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 23(7):2213-2222.

Feinman R, Deitch EA, Watkins AC, Abungu B, Colorado I, Kannan KB, Sheth SU, Caputo FJ, Lu Q, Ramanathan M, Attan S, Badami CD, Doucet D, Barlos D, Bosch-Marce M, Semenza GL, Xu DZ (2010) HIF-1 mediates pathogenic inflammatory responses to intestinal ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 299(4):G833-843.

Fernandes CI, Llimona F, Godoy LC, Negri EM, Pontieri V, Moretti AI, Fernandes TR, Soriano FG, Velasco IT, Souza HP (2009) Treatment of hemorrhagic shock with hypertonic saline solution modulates the inflammatory response to live bacteria in lungs. *Braz J Med Biol Res* 42(10):892-901.

Ferrara N, Davis-Smyth T (1997) The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 18(1):4-25.

Ferrari RS, Andrade CF (2015) Oxidative Stress and Lung Ischemia-Reperfusion Injury. *Oxid Med Cell Longev*:590987.

Flister MJ, Wilber A, Hall KL, Iwata C, Miyazono K, Nisato RE, Pepper MS, Zawieja DC, Ran S (2009) Inflammation induces lymphangiogenesis through up-regulation of VEGFR-3 mediated by NF-kappaB and Prox1. *Blood* 115(2):418-429.

Ganster F, Burbán M, de la Bourdonnaye M, Fizanne L, Douay O, Loufrani L, Mercat A, Cales P, Radermacher P, Henrion D, Asfar P, Meziani F (2010) Effects of hydrogen sulfide on hemodynamics, inflammatory response and oxidative stress during resuscitated hemorrhagic shock in rats. *Crit Care* 14(5):R165.

Gardner OS, Dewar BJ, Earp HS, Samet JM, Graves LM (2003) Dependence of peroxisome proliferator-activated receptor ligand-induced mitogen-activated protein kinase signaling on epidermal growth factor receptor transactivation. *J Biol Chem* 278(47):46261-46269.

Godzich M, Hodnett M, Frank JA, Su G, Pespeni M, Angel A, Howard MB, Matthay MA, Pittet JF (2006) Activation of the stress protein response prevents the development of pulmonary edema by inhibiting VEGF cell signaling in a model of lung ischemia-reperfusion injury in rats. *FASEB J* 20(9):1519-1521.

Hierholzer C, Kalff JC, Omert L, Tsukada K, Loeffert JE, Watkins SC, Billiar TR, Tweardy DJ (1998) Interleukin-6 production in hemorrhagic shock is accompanied by neutrophil recruitment and lung injury. *Am J Physiol* 275(3 Pt 1):L611-621.

Hightower CM, Intaglietta M (2007) The use of diagnostic frequency continuous ultrasound to improve microcirculatory function after ischemia-reperfusion injury. *Microcirculation* 14(6):571-582.

Hirano ES, Mantovani M, Morandin RC, Brito J, Pavani L (2006) Total hepatic ischemia and reperfusion after state controlled hemorrhagic shock, with used of different solutions: effects of neutrophils sequestration in kidney of rats. *Acta Cir Bras* 21(1):31-37.

Hohler T, Reuss E, Adams P, Bartsch B, Weigmann B, Worns M, Galle PR, Victor A, Neurath MF (2005) A genetic basis for IFN-gamma production and T-bet expression in humans. *J Immunol* 175(8):5457-5462.

Hommel DW, Peppelenbosch MP, van Deventer SJ (2003) Mitogen activated protein (MAP) kinase signal transduction pathways and novel anti-inflammatory targets. *Gut* 52(1):144-151.

Hsieh CH, Nickel EA, Hsu JT, Schwacha MG, Bland KI, Chaudry IH (2009) Trauma-hemorrhage and hypoxia differentially influence kupffer cell phagocytic capacity: role of hypoxia-inducible-factor-1alpha and phosphoinositide 3-kinase/Akt activation. *Ann Surg* 250(6):995-1001.

Hsu JT, Hsieh YC, Kan WH, Chen JG, Choudhry MA, Schwacha MG, Bland KI, Chaudry IH (2007) Role of p38 mitogen-activated protein kinase pathway in estrogen-mediated cardioprotection following trauma-hemorrhage. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292(6):H2982-2987.

Hu CJ, Wang LY, Chodosh LA, Keith B, Simon MC (2003) Differential roles of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in hypoxic gene regulation. *Mol Cell Biol* 23(24):9361-9374.

Hu X, Janssen WE, Moscinski LC, Bryington M, Dangsupa A, Rezai-Zadeh N, Babbin BA, Zuckerman KS (2001) An I kappa B alpha inhibitor causes leukemia cell death through a p38 MAP kinase-dependent, NF-kappa B-independent mechanism. *Cancer Res* 61:6290-6.

Hurt RT, Zakaria el R, Matheson PJ, Cobb ME, Parker JR, Garrison RN (2009) Hemorrhage-induced hepatic injury and hypoperfusion can be prevented by direct peritoneal resuscitation. *J Gastrointest Surg* 13(4):587-594.

Hwang ES, Hong JH, Glimcher LH (2005) IL-2 production in developing Th1 cells is regulated by heterodimerization of RelA and T-bet and requires T-bet serine residue 508. *J Exp Med* 202(9):1289-1300.

Ichikawa H, Naito Y, Takagi T, Tomatsuri N, Yoshida N, Yoshikawa T (2002) A specific peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma) ligand, pioglitazone, ameliorates gastric mucosal damage induced by ischemia and reperfusion in rats. *Redox Rep* 7(5):343-346.

Ito CY, Kazantsev AG, Baldwin AS, Jr. (1994) Three NF-kappa B sites in the I kappa B-alpha promoter are required for induction of gene expression by TNF alpha. *Nucleic Acids Res* 22(18):3787-3792.

Jarrar D, Kuebler JF, Rue LW, 3rd, Matalon S, Wang P, Bland KI, Chaudry IH (2002) Alveolar macrophage activation after trauma-hemorrhage and sepsis is dependent on NF-kappa B and MAPK/ERK mechanisms. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283(4):L799-805.

Jochem J, Zwirska-Korcza K, Gwozdz B, Walichiewicz P, Josko J (2003) Cardiac and regional haemodynamic effects of endothelin-1 in rats subjected to critical haemorrhagic hypotension. *J Physiol Pharmacol* 54(3):383-396.

Jung YJ, Isaacs JS, Lee S, Trepel J, Neckers L (2003) IL-1beta-mediated up-regulation of HIF-1alpha via an NFkappaB/COX-2 pathway identifies HIF-1 as a critical link between inflammation and oncogenesis. *FASEB J* 17(14):2115-2117.

Kan WH, Hsieh CH, Schwacha MG, Choudhry MA, Raju R, Bland KI, Chaudry IH (2008) Flutamide protects against trauma-hemorrhage-induced liver injury via attenuation of the inflammatory response, oxidative stress, and apoptosis. *J Appl Physiol* (1985) 105(2):595-602.

Kan WH, Hsu JT, Ba ZF, Schwacha MG, Chen J, Choudhry MA, Bland KI, Chaudry IH (2008) p38 MAPK-dependent eNOS upregulation is critical for 17beta-estradiol-mediated cardioprotection following trauma-hemorrhage. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294(6):H2627-2636.

Kan WH, Hsu JT, Schwacha MG, Choudhry MA, Raju R, Bland KI, Chaudry IH (2008) Selective inhibition of iNOS attenuates trauma-hemorrhage/resuscitation-induced hepatic injury. *J Appl Physiol* (1985) 105(4):1076-1082.

Khadaroo RG, He R, Parodo J, Powers KA, Marshall JC, Kapus A, Rotstein OD (2004) The role of the Src family of tyrosine kinases after oxidant-induced lung injury in vivo. *Surgery* 136(2):483-488.

Khan Z, Michalopoulos GK, Stolz DB (2006) Peroxisomal localization of hypoxia-inducible factors and hypoxia-inducible factor regulatory hydroxylases in primary rat hepatocytes exposed to hypoxia-reoxygenation. *Am J Pathol* 169(4):1251-1269.

Klotz L, Schmidt M, Giese T, Sastre M, Knolle P, Klockgether T, Heneka MT (2005) Proinflammatory stimulation and pioglitazone treatment regulate peroxisome proliferator-activated receptor gamma levels in peripheral blood mononuclear cells from healthy controls and multiple sclerosis patients. *J Immunol* 175(8):4948-4955.

Knudsen AR, Kannerup AS, Gronbaek H, Andersen KJ, Funch-Jensen P, Frystyk J, Flyvbjerg A, Mortensen FV (2011) Effects of ischemic pre- and postconditioning on HIF-1alpha, VEGF and TGF-beta expression after warm ischemia and reperfusion in the rat liver. *Comp Hepatol* 10(1):3.

Kochanek AR, Fukudome EY, Li Y, Smith EJ, Liu B, Velmahos GC, deMoya M, King D, Alam HB (2011) Histone deacetylase inhibitor treatment attenuates MAP kinase pathway activation and pulmonary inflammation following hemorrhagic shock in a rodent model. *J Surg Res* 176(1):185-194.

Konturek PC, Dembinski A, Warzecha Z, Burnat G, Ceranowicz P, Hahn EG, Dembinski M, Tomaszewska R, Konturek SJ (2005) Pioglitazone, a specific ligand of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, protects pancreas against acute cerulein-induced pancreatitis. *World J Gastroenterol* 11(40):6322-6329.

Krug EG, Sharma GK, Lozano R (2000) The global burden of injuries. *Am J Public Health* 90(4):523-526.

- Kyriakis JM, Avruch J (2001) Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 81(2):807-869.
- Lee JJ, Burckart GJ (1998) Nuclear factor kappa B: important transcription factor and therapeutic target. *J Clin Pharmacol* 38(11):981-993.
- Lee KR, Chung SP, Park IC, Kim SH (2002) Effect of induced and spontaneous hypothermia on survival time of uncontrolled hemorrhagic shock rat model. *Yonsei Med J* 43(4):511-517.
- Lee JW, Bae SH, Jeong JW, Kim SH, Kim KW (2004) Hypoxia-inducible factor (HIF-1)alpha: its protein stability and biological functions. *Exp Mol Med* 36(1):1-12.
- Li T, Zhu Y, Hu Y, Li L, Diao Y, Tang J, Liu L (2010) Ideal permissive hypotension to resuscitate uncontrolled hemorrhagic shock and the tolerance time in rats. *Anesthesiology* 114(1):111-119.
- Liu FC, Yu HP, Hwang TL, Tsai YF (2013) Protective effect of tropisetron on rodent hepatic injury after trauma-hemorrhagic shock through P38 MAPK-dependent hemoxygenase-1 expression. *PLoS One* 7(12):e53203.
- Lu YQ, Cai XJ, Gu LH, Fan YJ, Wang Q, Bao DG (2005) Effects of three fluid resuscitation methods on apoptosis of visceral organs in rats with hemorrhagic shock. *J Zhejiang Univ Sci B* 6(9):907-912.
- Lu YQ, Cai XJ, Gu LH, Mu HZ, Huang WD (2007) Hypertonic saline resuscitation maintains a more balanced profile of T-lymphocyte subpopulations in a rat model of hemorrhagic shock. *J Zhejiang Univ Sci B* 8(1):70-75.
- Lu YQ, Gu LH, Huang WD, Mou HZ (2008) Effect of hypertonic saline resuscitation on heme oxygenase-1 mRNA expression and apoptosis of the intestinal mucosa in a rat model of hemorrhagic shock. *Chin Med J (Engl)* 123(11):1453-1458.
- Majdalawieh A, Ro HS (2010) Regulation of IkappaBalpha function and NF-kappaB signaling: AEBP1 is a novel proinflammatory mediator in macrophages. *Mediators Inflamm* 2010823821.
- Maloyan A, Eli-Berchoer L, Semenza GL, Gerstenblith G, Stern MD, Horowitz M (2005) HIF-1alpha-targeted pathways are activated by heat acclimation and contribute to acclimation-ischemic cross-tolerance in the heart. *Physiol Genomics* 23(1):79-88.
- Manoilescu I, Telesman S, Cojocaru E, Mihaila D, Plamadeala P (2011) Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the lung in toxic septic shock. *Rom J Morphol Embryol* 52(1 Suppl):309-313.
- Marchant DJ, Boyd JH, Lin DC, Granville DJ, Garmaroudi FS, McManus BM (2012) Inflammation in myocardial diseases. *Circ Res* 110:126-44.
- McDonald MC, Mota-Filipe H, Paul A, Cuzzocrea S, Abdelrahman M, Harwood S, Plevin R, Chatterjee PK, Yaqoob MM, Thiernemann C (2001) Calpain inhibitor I reduces the activation of nuclear factor-kappaB and organ injury/dysfunction in hemorrhagic shock. *FASEB J* 15(1):171-186.

McKenna S, Wright CJ (2015) Inhibiting IkappaBbeta-NFkappaB signaling attenuates the expression of select pro-inflammatory genes. *J Cell Sci* 128:2143-55.

Meldrum DR, Shenkar R, Sheridan BC, Cain BS, Abraham E, Harken AH (1997) Hemorrhage activates myocardial NFkappaB and increases TNF-alpha in the heart. *J Mol Cell Cardiol* 29(10):2849-2854.

Meng ZH, Dyer K, Billiar TR, Tweardy DJ (2001) Essential role for IL-6 in postresuscitation inflammation in hemorrhagic shock. *Am J Physiol Cell Physiol* 280(2):C343-351.

Mullane KM, Kraemer R, Smith B (1985) Myeloperoxidase activity as a quantitative assessment of neutrophil infiltration into ischemic myocardium. *J Pharmacol Methods* 14(3):157-167.

Naito Y, Takagi T, Katada K, Tomatsuri N, Mizushima K, Handa O, Kokura S, Yagi N, Ichikawa H, Yoshikawa T (2011) Gastric peroxisome proliferator activator receptor-gamma expression and cytoprotective actions of its ligands against ischemia-reperfusion injury in rats. *J Clin Biochem Nutr* 48:170-7.

Olmos G, Conde I, Arenas I, Del Peso L, Castellanos C, Landazuri MO, Lucio-Cazana J (2007) Accumulation of hypoxia-inducible factor-1alpha through a novel electrophilic, thiol antioxidant-sensitive mechanism. *Cell Signal* 19(10):2098-2105.

Ormrod DJ, Harrison GL, Miller TE (1987) Inhibition of neutrophil myeloperoxidase activity by selected tissues. *J Pharmacol Methods* 18(2):137-142.

Park SJ, Lee KS, Kim SR, Min KH, Choe YH, Moon H, Chae HJ, Yoo WH, Lee YC (2009) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist down-regulates IL-17 expression in a murine model of allergic airway inflammation. *J Immunol* 183:3259-67.

Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH (2001) Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 22(2):153-183.

Peitzman AB, Billiar TR, Harbrecht BG, Kelly E, Udekwu AO, Simmons RL (1995) Hemorrhagic shock. *Curr Probl Surg* 32(11):925-1002.

Pierce JW, Schoenleber R, Jesmok G, Best J, Moore SA, Collins T, Gerritsen ME (1997) Novel inhibitors of cytokine-induced IkappaBalpha phosphorylation and endothelial cell adhesion molecule expression show anti-inflammatory effects in vivo. *J Biol Chem* 272:21096-103.

Pruefer D, Makowski J, Dahm M, Guth S, Oelert H, Darius H, Buerke M (2003) Aprotinin inhibits leukocyte-endothelial cell interactions after hemorrhage and reperfusion. *Ann Thorac Surg* 75:210-5; discussion 215-6.

Ramadori P, Ahmad G, Ramadori G (2010) Cellular and molecular mechanisms regulating the hepatic erythropoietin expression during acute-phase response: a role for IL-6. *Lab Invest* 90(9):1306-1324.

Sangeetha M, Pillai MS, Philip L, Lakatta EG, Shivakumar K (2011) NF-kappaB inhibition compromises cardiac fibroblast viability under hypoxia. *Exp Cell Res* 317:899-909.

Santone DJ, Shahani R, Rubin BB, Romaschin AD, Lindsay TF (2008) Mast cell stabilization improves cardiac contractile function following hemorrhagic shock and resuscitation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294(6):H2456-2464.

Sato H, Kasai K, Tanaka T, Kita T, Tanaka N (2008) Role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta on lung dysfunction following hemorrhagic shock in rats. *Med Sci Monit* 14(5):BR79-87.

Sato H, Tanaka T, Tanaka N (2012) The effect of p38 mitogen-activated protein kinase activation on inflammatory liver damage following hemorrhagic shock in rats. *PLoS One* 7(1):e30124.

Semenza GL (2000) HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol* (1985) 88(4):1474-1480.

Semenza GL (2001) HIF-1, O(2), and the 3 PHDs: how animal cells signal hypoxia to the nucleus. *Cell* 107(1):1-3.

Shahani R, Marshall JG, Rubin BB, Li RK, Walker PM, Lindsay TF (2000) Role of TNF-alpha in myocardial dysfunction after hemorrhagic shock and lower-torso ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278(3):H942-950.

Shahani R, Klein LV, Marshall JG, Nicholson S, Rubin BB, Walker PM, Lindsay TF (2001) Hemorrhage-induced alpha-adrenergic signaling results in myocardial TNF-alpha expression and contractile dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281(1):H84-92.

Shi J, Shao W, Yang D, Zhao L, Deng L, Wang X, Sun B (2010) Hydrodynamics-based transfection of plasmid encoding receptor activator for nuclear factor kappa B-Fc protects against hepatic ischemia/reperfusion injury in mice. *Liver Transpl* 16(5):611-620.

Shimizu T, Szalay L, Hsieh YC, Suzuki T, Choudhry MA, Bland KI, Chaudry IH (2006) A role of PPAR-gamma in androstenediol-mediated salutary effects on cardiac function following trauma-hemorrhage. *Ann Surg* 244(1):131-138.

Shiomi T, Tsutsui H, Hayashidani S, Suematsu N, Ikeuchi M, Wen J, Ishibashi M, Kubota T, Egashira K, Takeshita A (2002) Pioglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist, attenuates left ventricular remodeling and failure after experimental myocardial infarction. *Circulation* 106(24):3126-3132.

Sourbier C, Danilin S, Lindner V, Steger J, Rothhut S, Meyer N, Jacqmin D, Helwig JJ, Lang H, Massfelder T (2007) Targeting the nuclear factor-kappaB rescue pathway has promising future in human renal cell carcinoma therapy. *Cancer Res* 67:11668-76.

Stein I, Neeman M, Shweiki D, Itin A, Keshet E (1995) Stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by hypoxia and hypoglycemia and coregulation with other ischemia-induced genes. *Mol Cell Biol* 15(10):5363-5368.

Suzuki A, Iwamoto T, Sato S (2002) Effects of inspiratory oxygen concentration and ventilation method on a model of hemorrhagic shock in rats. *Exp Anim* 51(5):477-483.

Takata Y, Kitami Y, Yang ZH, Nakamura M, Okura T, Hiwada K (2002) Vascular inflammation is negatively autoregulated by interaction between CCAAT/enhancer-binding protein-delta and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Circ Res* 91(5):427-433.

Taniguchi Y, Ooie T, Takahashi N, Shinohara T, Nakagawa M, Yonemochi H, Hara M, Yoshimatsu H, Saikawa T (2006) Pioglitazone but not glibenclamide improves cardiac expression of heat shock protein 72 and tolerance against ischemia/reperfusion injury in the heredity insulin-resistant rat. *Diabetes* 55:2371-8.

Torres Filho IP, Torres LN, Pittman RN (2010) Early physiologic responses to hemorrhagic hypotension. *Transl Res* 155(2):78-88.

Torres LN, Torres Filho IP, Barbee RW, Tiba MH, Ward KR, Pittman RN (2004) Systemic responses to prolonged hemorrhagic hypotension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286(5):H1811-1820.

van Uden P, Kenneth NS, Rocha S (2008) Regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by NF-kappaB. *Biochem J* 412(3):477-484.

Vannay A, Fekete A, Adori C, Toth T, Losonczy G, Laszlo L, Vasarhelyi B, Tulassay T, Szabo A (2004) Divergence of renal vascular endothelial growth factor mRNA expression and protein level in post-ischaemic rat kidneys. *Exp Physiol* 89(4):435-444.

Viswakarma N, Jia Y, Bai L, Vluggens A, Borensztajn J, Xu J, Reddy JK (2010) Coactivators in PPAR-Regulated Gene Expression. *PPAR Res* 2010.

Xing B, Xin T, Hunter RL, Bing G (2008) Pioglitazone inhibition of lipopolysaccharide-induced nitric oxide synthase is associated with altered activity of p38 MAP kinase and PI3K/Akt. *J Neuroinflammation* 54.

Yada-Langui MM, Anjos-Valotta EA, Sannomiya P, Rocha e Silva M, Coimbra R (2004) Resuscitation affects microcirculatory polymorphonuclear leukocyte behavior after hemorrhagic shock: role of hypertonic saline and pentoxifylline. *Exp Biol Med (Maywood)* 229(7):684-693.

Yamamoto Y, Gaynor RB (2001) Therapeutic potential of inhibition of the NF-kappaB pathway in the treatment of inflammation and cancer. *J Clin Invest* 107(2):135-142.

Yamamoto Y, Gaynor RB (2004) I kappa B kinases: key regulators of the NF-kappaB pathway. *Trends Biochem Sci* 29(2):72-79.

Yang G, Abate A, George AG, Weng YH, Dennery PA (2004) Maturation differences in lung NF-kappaB activation and their role in tolerance to hyperoxia. *J Clin Invest* 114:669-78.

Younger JG, Sasaki N, Waite MD, Murray HN, Saleh EF, Ravage ZB, Hirschl RB, Ward PA, Till GO (2001) Detrimental effects of complement activation in hemorrhagic shock. *J Appl Physiol* (1985) 90(2):441-446.

Yuan Z, Liu Y, Zhang J, Kishimoto C, Wang Y, Ma A, Liu Z (2005) Cardioprotective effects of peroxisome proliferator activated receptor gamma activators on acute myocarditis: anti-inflammatory actions associated with nuclear factor kappaB blockade. *Heart* 91:1203-8.

Zakaria el R, Campbell JE, Peyton JC, Garrison RN (2007) Postresuscitation tissue neutrophil infiltration is time-dependent and organ-specific. *J Surg Res* 143(1):119-125.

Zhang Q, Lu YQ, Jiang JK, Gu LH, Mou HZ (2012) Early changes of CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells and Th1/Th2, Tc1/Tc2 profiles in the peripheral blood of rats with controlled hemorrhagic shock and no fluid resuscitation. *Chin Med J (Engl)* 125(12):2163-2167.

Zhang WY, Schwartz EA, Permana PA, Reaven PD (2008) Pioglitazone inhibits the expression of inflammatory cytokines from both monocytes and lymphocytes in patients with impaired glucose tolerance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28(12):2312-2318.

Zingarelli B, Sheehan M, Hake PW, O'Connor M, Denenberg A, Cook JA (2003) Peroxisome proliferator activator receptor-gamma ligands, 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J2 and ciglitazone, reduce systemic inflammation in polymicrobial sepsis by modulation of signal transduction pathways. *J Immunol* 171(12):6827-6837.

Zingarelli B, Cook JA (2005) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a new therapeutic target in sepsis and inflammation. *Shock* 23(5):393-399.

Zingarelli B, Chima R, O'Connor M, Piraino G, Denenberg A, Hake PW (2009) Liver apoptosis is age dependent and is reduced by activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in hemorrhagic shock. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 298(1):G133-141.

Zingarelli B, Hake PW, O'Connor M, Burroughs TJ, Wong HR, Solomkin JS, Lentsch AB (2009) Lung injury after hemorrhage is age dependent: role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Crit Care Med* 37(6):1978-1987.

Zou L, Attuwaybi B, Kone BC (2003) Effects of NF-kappa B inhibition on mesenteric ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 284(4):G713-721.

Zou L, Yang S, Champattanachai V, Hu S, Chaudry IH, Marchase RB, Chatham JC (2009) Glucosamine improves cardiac function following trauma-hemorrhage by increased protein O-GlcNAcylation and attenuation of NF- κ B signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 296(2):H515-523.

Bücher (Verfasserwerke):

Janssen J, Laatz W: Statistische Datenanalyse mit SPSS. 7. Aufl. Springer, Hamburg, 2009, S. 688-702.

Buchbeiträge (Herausgeberwerke):

Baue, A: The Multiple Organ Or System Failure Syndrome. In: Schlag G, Redl H (ed): Pathophysiology of Shock, Sepsis and Organ failure, Springer, Telos, 1993, pp. 1004-1018.

Baretton G: Gefäße. In: Böcker W, Denk H, Heitz Ph (Hrsg): Pathologie. 3. Aufl. Urban & Fischer, 2004, S. 481-504.

Beerthuisen, G: Response of the Microcirculation: Tissue Oxygenation. In: Schlag G, Redl H (ed): Pathophysiology of Shock, Sepsis and Organ failure, Springer, Telos, 1993, pp. 230-241.

Bültmann B: Allgemeine Kreislaufpathologie. In: Böcker W, Denk H, Heitz Ph (Hrsg): Pathologie. 3. Aufl. Urban & Fischer, 2004, S. 219-249.

Brüning A: Wasser- und Elektrolythaushalt. In: Renz-Polster H, Kautzig S, Braun J (Hrsg): Basislehrbuch Innere Medizin. 3. Aufl. Urban & Fischer, Hamburg, 2004, S. 952-999.

Dinges H: Morphology of the Liver in Shock. In: Schlag G, Redl H (ed): Pathophysiology of Shock, Sepsis and Organ failure, Springer, Telos, 1993, pp. 257-264.

Traber D: Cardiac Function During Hypovolemia. In: Schlag G, Redl H (ed): Pathophysiology of Shock, Sepsis and Organ failure, Springer, Telos, 1993, pp. 194-214.

Online-Zitate:

Gebrauchsinformation zu Pioglitazon der EMA 2011:

http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000285/human_med_000624.jsp&murl=menues/medicines/medicines.jsp am 15.11.2015 um 15:45 Uhr

Strukturformel BAY 11-7085:

<https://www.caymanchem.com/app/template/Product.vm/catalog/14795> am 15.11.2015 um 16:00 Uhr

Strukturformel Pioglitazone:

<http://arznei-news.de/pioglitazon/> am 15.11.2015 um 16:10 Uhr

Zusammenfassung des EPAR für Pioglitazon Accord 2011:

http://www.ema.europa.eu/docs/de_DE/document_library/EPAR_Summary_for_the_public/human/002277/WC500126046.pdf am 15.11.2015 um 15:51 Uhr

10 Thesen

1. Das druckkontrollierte Schockmodell Ratte ist für die Erforschung der Wirkung der Medikamente BAY 11-7085 und Pioglitazone im hämorrhagischen Schock geeignet.
2. Die intraarterielle Gabe von BAY 11-7085 im hämorrhagischen Schock 15 min vor Reperfusion des entnommenen Blutes zeigt die Tendenz zur Verbesserung von Überlebensrate und Überlebenszeit, des weiteren erhöht die Gabe von BAY 11-7085 im hämorrhagischen Schock tendenziell den MAD der Versuchstiere, die HF wird dagegen nicht eindeutig beeinflusst.
3. Mit BAY 11-7085 behandelte Ratten weisen im hämorrhagischen Schock eine Abschwächung der schockbedingten Schrankenstörung auf, was sich an einer Stabilisierung des Hämatokrits zeigt.
4. BAY 11-7085 schwächt die Leukozytenakkumulation im hämorrhagischen Schock ab, behandelte Tiere zeigen eine Tendenz zu verminderter MPO-Aktivität in Lunge und Herz.
5. Durch Hemmung des NF- κ B durch BAY 11-7085 wird signifikant die Expression der proinflammatorischen Proteine HIF-1 α in der Leber, VEGF in Herz und Niere sowie I κ B- α im Herz vermindert.
6. Die intraperitoneale Gabe von Pioglitazone 12 bis 16 Stunden vor Induktion des hämorrhagischen Schocks führt zu einer signifikanten Verbesserung des Outcome der Tiere, gemessen an Überlebensrate und Überlebenszeit, des weiteren erhöht die Behandlung mit Pioglitazone vor Induktion des hämorrhagischen Schocks tendenziell MAD und HF der Versuchstiere.
7. Der schockbedingten Schrankenstörung im hämorrhagischen Schock wirkt Pioglitazone nicht entgegen, eine Stabilisierung des Hämatokrit kann durch Behandlung mit dem Medikament nicht erreicht werden.
8. Mit Pioglitazone behandelte Tiere zeigen die Tendenz zur Verringerung der Leukozytenakkumulation in den Organen Niere, Herz und Leber, was sich an einer verminderten MPO-Aktivität zeigt.
9. Pioglitazone hemmt NF- κ B über verschiedene Mechanismen und vermindert signifikant die Expression des proinflammatorischen Proteins VEGF in der Niere. Die Expression von p38 im Herz sowie T-bet in der Lunge wird dagegen signifikant erhöht.
10. Pioglitazone scheint im hämorrhagischen Schock besser protektiv als BAY 11-7085 zu wirken. Bezüglich Lösungsmittel und Applikation sollten weitere tierexperimentelle Studien durchgeführt werden.

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Alle Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis wurden eingehalten; es wurden keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Merseburg, den 06.11.2019

Cathleen Klappstein

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Dissertationsschrift weder vollständig noch teilweise einer anderen Fakultät mit dem Ziel vorgelegt wurde, einen akademischen Grad zu erwerben.

Weiterhin erkläre ich, dass ich mich an keiner anderen Hochschule einem Promotionsverfahren unterzogen bzw. eine Promotion begonnen habe.

Merseburg, 06.11.2019

Cathleen Klappstein

Curriculum Vitae

Name: Cathleen Klappstein, geb. Beyer

Geburtsdatum: 27.03.1984

Geburtsort: Leipzig

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schul- und Ausbildung: August 1994 bis Juli 2002
Max-Klinger-Gymnasium Leipzig

August 2002 bis September 2005
Ausbildung und Abschluss zur Diplom-Betriebswirtin Fachrichtung
Bankwirtschaft (Berufsakademie)

Hochschulausbildung: Oktober 2005 – März 2013
Studium der Humanmedizin
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Approbation als Ärztin am 10.12.2012

Tätigkeit als Ärztin: April 2013 – Dezember 2014
Assistenzärztin Medizinische Klinik I
Carl-von-Basedow-Klinikum Saalekreis GmbH

Januar 2015 – April 2016
Assistenzärztin Klinik für Notfall- und Intensivmedizin
Carl-von-Basedow-Klinikum Saalekreis GmbH

April 2016 – Mai 2017
Mutterschutz und Elternzeit

Juni 2017 –
Assistenzärztin Medizinische Klinik I und III
Carl-von-Basedow-Klinikum Saalekreis GmbH

Merseburg, den 06.11.2019

Cathleen Klappstein

Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen und zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Michael Buerke, der mir das Thema dieser Arbeit vorgeschlagen hat, mich in der Durchführung und selbstständigen Bearbeitung unterstützt und mir in vielen Diskussionen beratend zur Seite gestanden hat. Vielen Dank auch für die Korrekturvorschläge des Manuskriptes.

Weiterhin danke ich recht herzlich Herrn Prof. Dr. med. Werdan, dem früheren Direktor der Universitäts- und Poliklinik für Innere Medizin III des Universitätsklinikums Halle (Saale) sowie Herrn Prof. Dr. med. Frantz als aktuellem Direktor für die Möglichkeit der Durchführung und Vollendung der Dissertation.

Frau Doris Schulz möchte ich recht herzlich für die Einweisung in die Laborarbeit und die tatkräftige Unterstützung bei der Erstellung der Western Blots und Durchführung des Myeloperoxidasenachweises danken.

Meinen Freunden und lieben Kollegen Frau Monika Erlenkamp und Herrn Dr. med. Wolfgang Schmitt danke ich recht herzlich für die zahlreichen Verbesserungsvorschläge und moralische Unterstützung bei der Erstellung der Promotion.

Meinen Eltern möchte ich ebenfalls für ihre stetige Hilfsbereitschaft, für ihre moralische Unterstützung, Geduld und nicht zuletzt für die finanzielle Unterstützung während meines Studiums danken.

Außerdem möchte ich mich auch bei meinem Ehemann Fabian bedanken, der mir die Möglichkeit und den entsprechenden Freiraum zur Vollendung der Promotion gegeben hat und mir bei Problemen jederzeit helfend zur Seite stand.