

## 6. Diskussion

Die vorliegende Studie zeigt, 1) dass die Vorbehandlung mit dem Hämoglobin-basierten künstlichen Sauerstoffträger DCLHb oder mit der zur Therapie von akuten Porphyrinen eingesetzten Häm-basierten Lösung Häminarginat die HO-1 Proteinexpression in verschiedenen Organen induziert, 2) dass die DCLHb-Vorbehandlung jedoch zu einer Aggravation, dagegen die HAR-Vorbehandlung zu einer Reduktion des Schock-induzierten Organversagens führt.

### 6.1. Problemstellung

Akuter starker Blutverlust mit nachfolgendem Schock stellt trotz verbesserter Therapiemöglichkeiten eine gravierende Erkrankung mit hoher Letalität dar (KEEL 2005). In der Behandlung ist von entscheidender Bedeutung ein adäquater Volumenersatz, der auch den Blutersatz mit Erythrozytenkonzentraten beinhaltet (CARRICIO 2002). Der Einsatz von Blutprodukten ist jedoch aufgrund der notwendigen Kompatibilität zwischen Spender und Empfänger eingeschränkt. Deshalb werden seit mehreren Jahren erhebliche Anstrengungen unternommen, um einen blutgruppen-unabhängigen Sauerstoffträger zu entwickeln (CHANG 1992). Zu diesen Lösungen gehören auch Hämoglobin-basierte Sauerstoffträger wie das DCLHb.

Jedoch zeigten diese in experimentellen klinischen Studien unerwünschte Nebenwirkungen wie renale und myokardiale Toxizität, gastrointestinale Nebenwirkungen und Bildung von toxisch wirkenden freien Sauerstoffradikalen (EVERSE 1997; BURHOP 2001; ALAYASH 1999; SCHUBERT 2002). Darüber hinaus führte die Anwendung von DCLHb in der Therapie von Schlaganfall- (SAXENA 1999) und traumatisierten Patienten (SLOAN 2002) zu einer signifikanten Zunahme der Letalität, weshalb die Phase III-Studien abgebrochen wurden.

Im Gegensatz zu akuten, unvorhersehbaren Blutungen mit der Notwendigkeit einer raschen Erythrozytensubstitution, können im Rahmen von elektiven chirurgischen Eingriffen entsprechende Maßnahmen getroffen werden, um eine Gefährdung des Patienten durch mögliche Blutverluste und die damit hervorgerufene Ischämie zu minimieren. Neben einem adäquaten operativen

Management werden hierzu auch Möglichkeiten zur Präkonditionierung untersucht, um durch präoperative Vorbehandlung eine höhere Stresstoleranz des Gewebes gegenüber nachfolgenden, potentiell schädigenden Ereignissen zu erreichen. Da chirurgische Techniken (KUBULUS 2005) oft schwierig durchzuführen und aufwendig sind, wäre eine effektive pharmakologische Vorbehandlung hierfür von besonderem Interesse.

In diesem Zusammenhang gibt es Hinweise, dass für die durch Präkonditionierung hervorgerufene Gewebeprotektion die Induktion der HO-1 Expression und damit einhergehenden Generierung von vasodilatierenden (CO) und antioxidativen (Biliverdin) Produkten von entscheidender Bedeutung sind (NAITO 2004). Aufgrund der Spezifität des Hämoxygenasesystems zu Häm sind Häm-haltige Lösungen die potentesten Induktoren der HO-1.

Entsprechend könnten Hämoglobin-basierte künstliche Sauerstoffträger die Expression der HO-1 induzieren und somit im Rahmen einer pharmakologischen Präkonditionierung zu einer Gewebeprotektion bei ischämischen Stressereignissen beitragen.

### **6.2. Material und Methoden**

Die Tiere der Vehikel- und der HAR-Gruppen zeigten nach Ende der Präparation, d.h. vor Beginn der Schockphase, bezüglich der Makrohämodynamik und der Blutgase keine signifikant voneinander verschiedenen Werte. Die Werte entsprachen den von BAKER (1979) beschriebenen Normalwerten für Laborratten. Lediglich die mit DCLHb vorbehandelten Tiere wiesen 24 Stunden nach der Vorbehandlung eine signifikante Zunahme des Hämatokrits im Vergleich zu den Vehikel- und HAR-Gruppen auf.

Entsprechend des Schockmodells nach WIGGERS und INGRAM (1946), unterschied sich der mittlere arterielle Blutdruck aller Gruppen während des hämorrhagischen Schocks nicht signifikant voneinander. Während der Schockphase mussten in der Regel noch mehrmals kleinere Mengen Blut (0,2 - 0,4 ml) entnommen werden, um den Blutdruck aufgrund funktionierender endogener Kompensationsmechanismen im gewünschten Niveau (30 - 40 mmHg) zu halten („Phase der Kompensation“). Als Zeichen der irreversiblen Dekompensation gilt nach WIGGERS und INGRAM (1946) in diesem Modell u.a.

das spontane weitere Abfallen des Blutdrucks während der Hypotensionsphase, sowie der, trotz vollständiger Rücktransfusion des vorher entzogenen Blutes, nicht längerfristig ansteigende Blutdruck mit nachfolgend eintretendem Tod des Versuchstieres. Hierbei wiesen die unbehandelten Kontrollen einen mittleren Dekompensationszeitpunkt von 68 min nach Schockbeginn auf. Im Gegensatz dazu führt die DCLHb-Vorbehandlung zu einem deutlich früheren und die HAR-Vorbehandlung zu einem späteren Auftreten des Dekompensationszeitpunktes, so dass in beiden Fällen von substanzspezifischen Auswirkungen auf die Schocktoleranz ausgegangen werden muss.

Die hämorrhagische Hypotension führt zu einem Abfall des Herzzeitvolumens, der wesentlich durch die verminderte Vorlast bedingt ist (KRUCK 1994). Kompensatorisch entwickelt sich dabei eine bei den verwendeten Versuchstieren charakteristische Bradykardie.

Durch den hämorrhagischen Schock entsteht im Organismus eine azidotische Stoffwechsellage. Bedingt ist die Azidose durch den infolge des Sauerstoffmangels vermehrt anaerob ablaufenden Glukosestoffwechsel und das daraus entstehende Laktat (MESSMER 2001). Der während der Schockphase stark absinkende  $\text{pCO}_2$  (im Mittel unter 25 mmHg) reflektiert respiratorische Kompensationsmechanismen. Der Abfall des pH-Wertes bei begleitendem Abfall der Pufferbasen sowie des  $\text{pCO}_2$ , spiegelt daher eine respiratorisch teilkompensierte, metabolische Azidose wieder (LARSEN 1995). Parallel zum sinkenden Kohlendioxidpartialdruck stieg der Sauerstoffpartialdruck während des Schocks an. Eine Rolle spielten hierbei die Zunahme der Ventilation durch Erhöhung der Atemfrequenz und hierdurch ein verbessertes Ventilations-/Perfusionsverhältnis (LARSEN 1995).

Im Anschluss an die 1-stündige Hypotensionsphase führte die Retransfusion von 60% des entnommenen Blutes in der Vehikel- und HAR-Gruppe zu einem zügigen Ansteigen des Blutdrucks auf Ausgangswerte sowie zu einer Normalisierung des Säure-Basenhaushalts, so dass man hierbei von einem kompensierten, voll reversiblen Schockmodell ausgehen kann. Trotzdem weisen die DCLHb-vorbehandelten Tiere nach Retransfusion eine fortbestehende Suppression der Hämodynamik auf, so dass hier auch in Verbindung mit dem deutlich früheren Dekompensationsbeginn ein negativer Einfluss dieser Substanz auf die

physiologischen Regelmechanismen vorliegt, welcher nicht vom gewählten Modell abhängig ist.

Im Gegensatz dazu zeigen nach 2-stündigem Schock alle Gruppen, ausgeprägter auch hier die DCLHb-Tiere, eine hämodynamische Depression während der gesamten Reperfusionphase. Dabei scheint die protrahierte Schockdauer eine entscheidende Determinante zu sein, wobei durch die Vorbehandlung eine zusätzliche positive (HAR) oder negative (DCLHb) Beeinflussung der Rekompensationsfähigkeit stattfindet.

### **6.3. Diskussion der Ergebnisse**

#### **6.3.1. Proteinexpression und Hämoxygenaseaktivität**

24 Stunden nach der Präkonditionierung mit DCLHb oder HAR zeigte die kummulierte Western Blot Analyse eine dosisabhängige Zunahme der HO-1-Proteinexpression in den untersuchten Geweben ohne Induktion einer unspezifischen Stressantwort (HSP 70). Lediglich die Hochdosisbehandlung mit 75 mg HAR/kg Kg führte zu einem Anstieg von HSP 70, begleitet von generalisierten Krämpfen und Leberversagen, was als Hinweis für eine toxische Überdosierung zu werten ist. Entsprechend wurde diese Dosierung in den nachfolgenden Untersuchungen nicht weiter untersucht. Die benutzten Dosierungen von DCLHb und HAR wurden in Übereinstimmung mit anderen Studien (MARTASEK 1991) und klinischen Anwendungen gewählt (MUSTAJOKI 1993, 1996; SCHUBERT 2002; TOKOLA 1986; TENHUNEN 1987).

Der Grund für die selektive Expression von HO-1 scheint das Molekül Häm als Basis beider Lösungen zu sein. HO-1, als Schlüsselenzym der Hämdegradation, stellt als Endprodukte Eisen, Biliverdin und Kohlenmonoxid (CO) zur Verfügung (TENHUNEN 1968; DOCHERTY 1984; KUTTY 1988). Biliverdin, ein Endprodukt des Hämabbaus der durch die Hämoxygenase katalysiert wird, wird durch die Bilirubinreduktase zu Bilirubin reduziert. Entsprechend zeigt sich in der vorliegenden Untersuchung ein dosisabhängiger Bilirubinanstieg im Serum als indirekte Folge einer erhöhten HO-1-Aktivität bei erhöhter Substratverfügbarkeit.

Kohlenmonoxid (CO) besitzt neben seiner Potenz die Plättchenaggregation zu inhibieren (BRÜNE 1987), auch eine vasodilatierenden Wirkung (FURCHGOTT

1991; UTZ 1991; VERMA 1993; MORITA 1995). HO-1 ist in der Lage durch die Generierung von Kohlenmonoxid eine Vasodilatation von Gefäßen zu induzieren (GRASER 1990; LEVERE 1990; JOHNSON 1995; ZAKHARY 1996). Dieses Gas zeigte eine vergleichbare Wirkung wie Stickstoffmonoxid (NO), einem second messenger, der über die Regulierung des zellulären zyklischen Guanosin-Monophosphat (cGMP) den vaskulären Tonus beeinflussen kann (IGNARRO 1987; PALMER 1987; KUBES 1992; SCHMIDT 1992; SUEMATSU 1996). CO aktiviert ebenso das zelluläre cGMP (RAMOS 1989; SCHMIDT 1992; CHRISTODOULIDES 1995; KHARITONOV 1995; MORITA 1995). Die durch cGMP vermittelte Öffnung von Ionenkanälen (SCHMIDT 1992) führt zu einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumionenkonzentration, die eine Verkürzung der kontraktile Elemente in der glatten Gefäßmuskulatur und somit eine Gefäßdilatation nach sich zieht. Diese gefäßerweiternde Eigenschaft wurde vielfach bestätigt (GRASER 1990; LEVERE 1990; JOHNSON 1995; ZAKHARY 1996). Sie ist nicht nur in präkapillären Gefäßen, sondern auch in der Leber auf Höhe der Sinusoide beobachtet worden. Die Erweiterung der Sinusoide, die dem Aufbau und Funktion von Kapillaren entsprechen, wird dabei von den Ito-Zellen vermittelt. Die Ito-Zellen wiederum entsprechen den Pericyten der Kapillaren (SUEMATSU 1996). Pericyten sind perivaskuläre Zellen, welche bereits Ende des 19. Jahrhunderts beschrieben wurden (EBERTH 1871) und von ROUGET (1873, 1879) als solche benannt wurden. Diese Zellen umgeben die Endothelzellen der Kapillaren, wobei sie die Fortführung der glatten Muskelzellen der Arteriolen und Venolen darstellen. Aufgrund ihrer zahlreichen zytoplasmatischen Ausläufer stehen sie mit den umgebenden Zellverbänden in enger Beziehung (HIRSCHI 1996). Ein Pericyt ist damit in der Lage gleich mehrere umliegende Kapillaren zu beeinflussen (WEIBEL 1974; WILLIAMSON 1980; MAZANET 1982). Das Zytoplasma dieser Zellen beinhaltet muskelspezifische Actinfilamente (HERMAN 1985, SKALLI 1989; NEHLS 1991), welche auch cGMP empfindlich sind (JOYCE 1984; KELLEY 1987; HAEFLIGER 1994). Dadurch werden diese Zellen in die Lage versetzt, den kapillären Querschnitt beeinflussen zu können (HIRSCHI 1996). Aktuelle Daten zeigen dass die Hämoxxygenase-1 über die Produktion von CO die Itozell- und Pericytengröße verändern kann. Das wiederum hat eine Dilatation von Kapillaren und Sinusoiden mit nachfolgender Verbesserung des Blutflusses in den Organen zur Folge (RENSING 1999, 2001).

HO-1 selbst bewirkt über eine Immunsuppression (WOO 1998) und Modulation der inflammatorischen Antwort (WILLIS 1996) eine Reduktion der Leukozyten - Endothel Interaktion. Zusätzlich wird durch die anschließende Entfernung des Präoxidants Eisen, sowie die Reduktion von Biliverdin zu antioxidativ wirkendem Bilirubin (STOCKER 1987; NEUZIL 1993,1994) die weitere toxische Zelledestruktion verhindert. Dadurch kann auch einer Endothelschädigung, die wiederum zu einer Zellschwellung und damit Gefäßobliteration führen kann, entgegengewirkt werden.

Eine mögliche Ursache der fehlenden Protektion nach DCLHb-Vorbehandlung könnte möglicherweise in einer zu hohen HO-1 Induktion liegen. Die durch die HO-1 erzeugten Produkte können selbst toxisch wirken (BAUER 2002). Hierzu gehören die toxischen Effekte der Gallepigmente Biliverdin bzw. Bilirubin, der freien Eisen-Ione sowie des Kohlenmonoxides. Biliverdin bzw. Bilirubin können einerseits zu einer neuronalen Störung durch Ablagerung in den Basalganglien führen (SCHENKER 1966), andererseits weisen sie durch Zerstörung der Doppellipidmembranen von Zellen eine generelle zelltoxische Wirkung auf (WENNBERG 1991). Eisen-Ione katalysieren über die Haber-Weiss oder Fenton-Reaktion die Entstehung von Sauerstoffradikalen, vor allem des am stärksten toxisch wirkendem Hydroxyl-Radikals  $\text{OH}^\cdot$  (HALLIWELL 1978). Durch eine verstärkte Eisen-Ionen Produktion kann dadurch die antioxidative Potenz von Bilirubin limitiert (BAUER 2002) sowie eine Zelledestruktion beschleunigt werden (SUTTNER 1999).

HO-1 weist somit sowohl pro- als auch antioxidative Eigenschaften (RYTER 2000) auf. Welche dabei bei der Induktion primär wirken, hängt scheinbar von der Größe des Aktivitätsanstieges ab. So soll eine moderate Proteinexpression von HO-1 eher zum Überwiegen der protektiven, dagegen eine starke, überproportionale eher der destruktiven Eigenschaften führen, wobei aufgrund der komplexen Interaktionen auch Überschneidungen möglich sind (BAUER 2002). In der vorliegenden Untersuchung zeigte sich eine dosisabhängige Letalitätserhöhung nach DCLHb-Präkonditionierung, die möglicherweise mit einem überproportionalen Aktivitätsanstieg der HO-1 und der damit verbundenen negativen Effekte vergesellschaftet ist. Allerdings bleibt in dieser Studie auch bei einem moderaten

HO-1 Anstieg nach DCLHb - Niedrigdosisvorbehandlung eine Protektion aus. Entsprechend scheinen noch andere Mechanismen für die fehlende DCLHb-Protektion verantwortlich zu sein. Als eine Ursache werden die ausgesprochen vasokonstriktiven Eigenschaften zellfreier Hämoglobinlösungen diskutiert, wobei der Pathomechanismus noch nicht vollständig geklärt ist. Möglicherweise spielt hierbei die ausgeprägte NO-Affinität und die Induktion einer Endothelin-1 Expression (starker Vasokonstriktor) eine wichtige Rolle (WINSLOW 1999, 2000, 2003).

### 6.3.2. Hämodynamik

Für eine ausreichende Organdurchblutung ist zwar ein bestimmter Perfusionsdruck erforderlich, jedoch sind die Grenzen für die einzelnen Organe nicht genau definiert. Zusätzlich kann aufgrund möglicherweise vorhandener Autoregulationsmechanismen aus der Höhe des systemischen Blutdrucks selbst nicht ohne weiteres der Blutfluss eines Organs quantifiziert werden. Darüber hinaus kann die Organdurchblutung im Schockzustand wegen der Zentralisation zugunsten lebenswichtiger Organe verschoben werden, so dass trotz suffizienten zentralen Blutdrucks eine Minderversorgung peripherer Organe resultiert. Entsprechend beginnt unter Umständen das Schocksyndrom bei den meisten Schockformen bereits bevor der gemessene systemische Blutdruck kritisch niedrige Werte erreicht. Auch wenn die Mikrozirkulationsstörung heute als das Hauptproblem in der Pathophysiologie des hämorrhagischen Schocks angesehen wird, kann in der initialen Phase ein Schockzustand bei einem Patienten nur aufgrund der Veränderungen des arteriellen Blutdrucks und der Herzfrequenz diagnostiziert und therapiert werden (PEITZMAN 1995).

Die DCLHb-Vorbehandlung führte zu einem signifikant früheren Auftreten des Dekompensationszeitpunktes und insbesondere nach 2 Stunden Schockdauer zu einer persistierenden Kreislaufdepression in der Reperfusionphase und eine signifikante Zunahme der Letalität.

Diese negativen Effekte sind möglicherweise die Folge einer durch DCLHb hervorgerufenen ausgeprägten Vasoakonstruktion, welche im P 50 Wert der

Lösung, in der Interaktion mit druckregulierenden Gefäßen und der hohen NO-Affinität begründet zu sein scheint (WINSLOW 2000). Ein initialer dosisunabhängiger Blutdruckanstieg nach DCLHb-Infusion ist vielfach beschrieben worden. Hierbei führte die Infusion von DCLHb zu einem Anstieg des mittleren arteriellen Blutdrucks um etwa 20 bis 30% bei Hamster (NOLTE 1994), Laborratte (KEIPERT 1993; MALCUM 1994), Schwein (MCKENZIE 1994) und Mensch (AMBERSON 1949; PRZYBELSKI 1997). Zusätzlich zeigte DCLHb in verschiedenen *in vitro* Studien einen kontraktilen Effekt auf einen isolierten Gefäßring (FREAS 1995; HART 1997). Von entscheidender Bedeutung scheint hierbei die ausgeprägte NO-Affinität des Hämoglobins zu sein, wobei die Interaktion des Hämoglobins mit NO auf unterschiedlichen Reaktionswegen stattfinden kann (VEERAMACHANENI 1999):

1. Durch eine kovalente Bindung an Cystein (cys93 $\beta$ ) der beta-Globinkette bildet sich S-Nitrosohämoglobin (SNO-Hb), wodurch Hämoglobin im Kreislaufsystem als NO-Transporter wirkt (JIA 1996).
2. Oxyhämoglobin wird von NO zu Methämoglobin oxidiert (Hb-Fe<sup>3+</sup>). Da diese Reaktion bedeutend schneller abläuft als die Reaktion mit Cysteinresten, wird sie als der Hauptmechanismus der NO-Affinität angesehen (DOHERTY 1998; LIAO 1999). In einer klinischen Studie konnte nach Gabe von DCLHb ein deutlicher Anstieg der Methämoglobinkonzentration im Blut nachgewiesen werden (O'HARA 2001).

Die tatsächliche Bedeutung der Interaktion von NO und Hämoglobin ist Gegenstand aktueller Forschung. Die vom Gefäßendothel gebildete parakrine Substanz NO diffundiert aufgrund des Konzentrationsgradienten sowohl nach luminal als auch abluminal zu den glatten Muskelzellen. An diesen führt NO über eine Guanylatcyclase-abhängige Reaktion zu einer Relaxation der glatten Gefäßmuskelzellen, wodurch eine Gefäßdilatation resultiert. Im Gegensatz zu freiem Hämoglobin interagiert das in Erythrozyten vorhandene Hämoglobin um den Faktor 500-1000 langsamer mit NO (LIAO 1999; Liu 1998), wobei die Ursache dieses Unterschieds nicht hinreichend geklärt ist (VAUHGN 2001). Vaughn et al. konnten an isolierten Mikrogefäßen zeigen, dass die NO-abhängige Dilatation der Gefäße unter Blutflussbedingungen weniger ausgeprägt verhindert werden kann,

wie dies durch in Stase befindlichem Blut möglich ist (LIAO 1999). Das Hämoglobin von in Stase befindlichem Blut besitzt somit eine weit höhere Interaktionsfähigkeit als das in strömenden Erythrozyten gebundene. Im Gegensatz dazu wurde der NO-Verbrauch durch freies Hämoglobin unter Flussbedingungen im Vergleich zu Experimenten ohne Blutfluss nicht gesenkt. Daher wurde von LIAO et al. postuliert, dass der erythrozytenfreie Raum am Rande der Gefäßwand unter Flussbedingungen eine schnelle Interaktion des im Erythrozyten gebundenen Hämoglobins mit dem vom Gefäßendothel freigegebenen NO verhindert.

Freie Hämoglobinlösungen, wie das DCLHb, bestehen jedoch aus einer homogenen, zellfreien Lösung. Dadurch kann DCLHb auch Kapillaren perfundieren, die normalerweise von Erythrozyten nicht passiert werden können (CONHAIM 2000). Zusätzlich führt der direkte Kontakt dieser freien Hämoglobinlösung mit der Gefäßwand zu einer direkten und eben auch verstärkten Reaktion des Hämoglobins mit NO am Entstehungsort (LIAO 1999), so dass hierdurch eine ausgeprägte NO-Affinität mit nachfolgender Vasokonstriktion resultieren könnte.

Neben der beschriebenen NO-Affinität zeigen neuere Untersuchungen, dass freie Hämoglobinlösungen indirekt über die Erniedrigung der NO-Konzentration (SEN 1998) oder direkt über einen Hb-vermittelten Wirkmechanismus (SAXENA 1998) zu einer Induktion der Endothelin (ET)-1 Expression führen. Endothelin-1 - ein aus 21 Aminosäuren bestehendes Polypeptid - ist ein vom Gefäßendothel gebildeter parakriner Vasokonstriktor. Es gehört zu einer Gruppe biochemisch ähnlicher Polypeptide (Endothelin-1, Endothelin-2 und Endothelin-3) und sich nur durch geringfügige Änderungen der Aminosäuresequenz voneinander unterscheiden. Sie besitzen zwei Disulfidbrücken (Cys1-Cys15 und Cys3-Cys11) sowie ein hydrophobes C-terminales Ende mit der Aminosäure Tryptophan an Position 21. Endothelin-1 ist in der Lage eine intensive, lang anhaltende Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur auszulösen. Unter physiologischen Bedingungen steht Endothelin mit dem vasorelaxierenden Faktor NO an der Endothelzelle in einem geregelten Gleichgewicht (RUBANYI 1994). DCLHb könnte jedoch aufgrund der ausgeprägten NO-Affinität und der induzierten ET-1 Expression dieses Gleichgewicht zu Gunsten der Vasokonstriktion verschieben, so dass in der

Summation eine starke Gefäßkonstriktion trotz der HO-1 Induktion und damit eine Störung der Mikrozirkulation resultieren würde.

Obwohl DCLHb eine Plasmahalbwertszeit von etwa 4 Stunden aufweist, kumuliert diese Substanz im Gewebe mit einem Konzentrationsmaximum erst nach 24 Stunden (Keipert 2003 HESS 1993; WINSLOW 2000). Entsprechend scheint die Gewebepersistenz von DCLHb zum Zeitpunkt des hämorrhagischen Schockes verantwortlich für die in dieser Studie beobachteten negativen Auswirkungen einer DCLHb-Präkonditionierung zu sein. Trotz der induzierten HO-1 Expression scheint DCLHb über die Hb-vermittelte Vasokonstriktion eine Störung der Mikrozirkulation zu verursachen, die in einer Verschlechterung der Gewebedurchblutung und damit in einer Verstärkung des schockbedingten Organversagens resultiert. Dieses wiederum hat eine Erhöhung der Letalität zur Folge.

Neben den beschriebenen möglichen negativen, lang anhaltenden Effekten der DCLHb-Präkonditionierung auf die Mikrozirkulation, gibt es Hinweise, dass die Injektion dieser Lösung auch direkt negativen Einfluss auf die hämodynamische Kompensationsfähigkeit ausüben könnte. So führt die Injektion von DCLHb unmittelbar zu einem raschen Anstieg des Blutdrucks, der verschiedene kompensatorische Autoregulationsmechanismen mit dem Ziel einer Blutdrucknormalisierung aktiviert. Dazu gehört die Ausschüttung von Gewebehormonen, wie z.B. ANP (atrial natriuretic peptid), und BNP (brain natriuretic peptid) (SAXENA 1998), welche vasodilatatorisch und natriuretisch-diuretisch (FROSSMANN 1998) wirken. Die Freisetzung der kardialen Gewebehormone erfolgt bei Dehnung der Vorhöfe (McGRATH 2005) oder Kammern (VUOLTEENAHO 2005; SULLIVAN 2005). Hieraus resultiert eine Polyurie (URBAITIS 1992; KEIPERT 2003), wie sie auch in der vorliegenden Untersuchung nach DCLHb-Gabe beobachtet wurde. Als mögliche Konsequenz dieses Phänomens könnte sich eine Dehydratation mit konsekutivem Volumenmangel manifestieren, welcher eine hämodynamische Kompensationsfähigkeit einschränkt. Als indirektes Zeichen eines bestehenden Volumenmangels kann ein erhöhter Hämatokritwert herangezogen werden. Diesen weisen nur die DCLHb-präkonditionierten Tiere vor Schockinduktion auf, so dass in diesen Gruppen von einem vorbestehenden Volumenmangel ausgegangen werden muss. Die hieraus resultierende mögliche Ursache für eine

eingeschränkte Kompensationsfähigkeit könnte wiederum die hämodynamische Instabilität während der Schock- und Reperfusionsphase und somit die erhöhte Letalität in den DCLHb-Gruppen erklären.

Im Gegensatz zu den negativen Folgen einer DCLHb-Präkonditionierung führt die HAR-Präkonditionierung zu einer Verbesserung der hämodynamischen Kompensationsfähigkeit, die sich in einer Zunahme des mittleren Schockvolumens, in einem verspäteten Auftreten des Dekompensationszeitpunktes und einer raschen Normalisierung des MAP in der Reperfusionsphase widerspiegelt. Entsprechend weisen insgesamt die HAR-präkonditionierten Tiere eine Verminderung der schockbedingten Letalität auf.

HAR, bestehend aus Hämin und L-Arginin, weist keine NO-Affinität und damit keine vasokonstriktiven Eigenschaften auf. Im Gegenteil, in höheren Dosierungen führt die HAR-Gabe über eine L-Arginin-vermittelte Freisetzung von NO zu einer Gefäßdilatation und somit Blutdruckerniedrigung (MARTASEK P 1991). Aufgrund des fehlenden initialen Blutdruckanstieges werden auch keine Gegenregulationsmechanismen aktiviert, so dass von einer Normovolämie vor der Schockinduktion ausgegangen werden kann. Auch wenn dadurch die Ausgangsbedingungen der HAR-Gruppen gleichwertig der Vehikel-Gruppen sind, weisen die HAR-präkonditionierten Tiere eine höher hämodynamische Stabilität sowie erniedrigte Letalität auf. Zusätzlich ergeben sich Hinweise auf eine verbesserte Organviabilität, welche möglicherweise die Folge einer besseren Mikrozirkulation und damit Organdurchblutung ist. Wie bereits demonstriert zeigt HAR über die Induktion der HO-1 Expression protektive Eigenschaften, z.B. in Lunge (MAESHIMA 2005) oder Niere (Liu 1998). Auch in der vorliegenden Studie konnte eine spezifische HAR-induzierte HO-1 Expression nachgewiesen werden, so dass die erreichte Verbesserung der Organviabilität und Erniedrigung der Letalität auf die protektiven Eigenschaften dieses Enzyms zurück geführt werden müssen. Die Hypothese wird durch die Beobachtung gestützt, dass die HAR-induzierte Protektion durch die Blockade der HO-Aktivität mit dem kompetitiven Inhibitor SnMP-IX vollständig aufgehoben werden konnte. Die HO-1 führt beim enzymatischen Abbau von Häm unter anderem zur Produktion der potentiell protektiven Endprodukte Biliverdin und Kohlenmonoxid (siehe 5.3.1.). Hierdurch

kann ein antioxidativer Zellschutz vor Schock-induzierten Sauerstoffradikalen generiert werden. Von herausragender Bedeutung scheint jedoch in der vorliegenden Studie die Freisetzung von CO zu sein. Diese Gas führt insbesondere auf mikrozirkulatorischer Ebene, ähnlich wie NO, zu einer Dilatation von Kapillaren und somit zu einer Verbesserung der Organdurchblutung (RENSING 2001). Entsprechend könnte dieser Mechanismus in der vorliegenden Arbeit über die Verbesserung der Mikrozirkulation eine Reduktion des Schock-bedingten Organversagens und damit der Letalität vermitteln.

### **6.3.3. Organdysfunktion**

Ein Schock ist durch ein Missverhältnis von Sauerstoffangebot und Sauerstoffbedarf charakterisiert (MESSNER 2001).

Ein akuter Blutverlust von mehr als 30% des gesamten Blutvolumens bewirkt eine Reduktion der Fähigkeit des Kreislaufes, Sauerstoff in ausreichender Menge für Körperfunktionen zur Verfügung zu stellen. Der entscheidende Mechanismus des hämorrhagischen Schocks ist eine zu geringe Perfusion lebenswichtiger Organe, die entweder durch einen verminderten Blutfluss oder eine ungenügende Verteilung des Blutvolumens im Körper verursacht wird (SHOEMAKER 1995). Diese initialen Mechanismen führen zu verschiedenen neuronalen und biochemischen Antworten, die letztlich eine Dysfunktion der Organe zur Folge haben.

Als indirekte Zeichen eines erniedrigten Blutflusses können die arteriovenöse Sauerstoffgehaltssdifferenz und die arterielle Laktatkonzentration (MESSMER 2001) angesehen werden. Im Schock nimmt die arteriovenöse Sauerstoffgehaltssdifferenz aufgrund einer vermehrten Sauerstoffausschöpfung zu; die arterielle Laktatkonzentration steigt wegen der anaeroben Glykolyse an (GARRIOCH 2004). Bei allen Schocksyndromen besteht eine metabolische Azidose. Sie beruht auf dem anaeroben Stoffwechsel der Gewebe mit Anhäufung von Laktat, der wiederum durch den Sauerstoffmangel der Zellen hervorgerufen wird (MESSMER 2001). Entsprechend weisen in der vorliegenden Arbeit alle Schock-Gruppen einen Anstieg der Laktatkonzentration auf. Dennoch ergeben sich Differenzen durch unterschiedliche Präkonditionierungen. So führt DCLHb zu

## 6. Diskussion

---

einem stärkeren, HAR zu einem schwächeren Anstieg der Laktatwerte im Vergleich zu Vehikel-Gruppen. Der Grund hierfür könnte wie zuvor beschrieben einerseits in der durch DCLHb verursachten NO-Affinität und der damit vermittelten Vasokonstriktion mit konsekutiver Verschlechterung der Mikrozirkulation liegen. Hierdurch kommt es auch zu einer Verstärkung der schock-bedingten Gewebhypoxie. HAR andererseits führt zu einer Abschwächung des Laktatanstieges. Der zugrunde liegende Mechanismus scheint in der HAR-induzierten HO-1 Expression und der damit einhergehenden antioxidativen und vasodilatierenden Wirkung mit entsprechend verbesserter Gewebepfusion und –resistenz gegenüber hypoxischem Schaden begründet zu sein

Mit Beginn des Schocksyndroms wird die Atmung gewöhnlich gesteigert: das Atemminutenvolumen nimmt zu, der  $\text{paCO}_2$  ist erniedrigt (reflektorische Hyperventilation), während der  $\text{paO}_2$  sich zunächst meist nicht verändert. Fällt jedoch das Herzzeitvolumen ab, so wird auch die Durchblutung der Lunge vermindert und das Verhältnis von Belüftung zu Durchblutung in der Lunge und damit auch der pulmonale Gasaustausch erheblich gestört (GARRIOCH 2004). Klinisch manifestiert sich die Störung des pulmonalen Gasaustausches in der Blutgasanalyse als Hypoxie, meist in Verbindung mit initialer Hypokapnie (kompensatorische Hyperventilation). Die wichtigsten Ursachen der Hypoxie sind Mikroateletasen und arteriovenöse Shunts, die sich durch die Störungen der Mikrozirkulation entwickeln. Bereits in der Frühphase des Schocksyndroms treten funktionelle und morphologische Lungenveränderungen auf, die im weiteren Verlauf zu einem akuten Lungenversagen führen können (GARRIOCH 2004). Die vorliegenden Ergebnisse zeigen eine Verschlechterung des pulmonalen Gasaustausches nach DCLHb-Präkonditionierung. Auch hierfür könnten die vasokonstringierenden Eigenschaften dieser Lösung zur Verschlechterung der Oxygenierung entscheidend beitragen. Im Gegensatz dazu konnte durch HAR anscheinend eine Lungenprotektion erreicht werden, wodurch bereits bestehende Ergebnisse bestätigt werden konnten (MAESHIMA 2005).

Der hämorrhagische Schock führt zu einer Mikrozirkulationsstörung der Leber. Der resultierende Gewebeschaden wird einerseits durch die Gewebhypoxie im

Verlauf der Mikrozirkulationsstörung in der Schockphase („no-reflow“) verursacht. Als Ursache für die Minderperfusion der Sinusoide wird ein Anschwellen endothelialer Zellen und intravaskuläre Hämokonzentration als Folge eines Ungleichgewichtes zwischen Endothelin und NO angesehen. Andererseits führt die Reperfusionsphase zur inflammatorischen Reaktion mit der Aktivierung und Dysfunktion von Leukozyten und Kupffer-Zellen („reflow paradox“). In dieser Phase kommt es zur Freisetzung und Aktivierung proinflammatorischer Zytokine (TNF-alpha, IL-1) und Sauerstoffradikale, Aktivierung von Adhäsionsmolekülen und der Interaktion von Leukozyten mit dem Endothel der Leber (MENGER 1999). Im Serum treten je nach Stärke und Lokalisation des Leberschadens charakteristische Enzyme auf. Bei geringem Zellschaden sind vor allem die Aktivitäten zytoplasmatischer Enzyme erhöht (VAN HOEK 2004). In der vorliegenden Studie ist diese Pathophysiologie sicherlich auch für die Erhöhung der leberspezifischen Enzyme Aspartat-Aminotransferase (AST), Alanin-Aminotransferase (ALT) und Glutamat-Dehydrogenase (GLDH) in allen Schock-Gruppen verantwortlich. Interessanterweise führt die HAR-Präkonditionierung trotz einer möglicherweise verbesserten Mikrozirkulation nicht zu einer Reduktion dieser Enzyme im Serum. Ein Grund hierfür könnte die erhöhte Gewebepfusion mit einem dadurch stärkeren Auswaschen der Enzyme in der Reperfusionsphase sein („reflow paradox“) (PAXIAN 2001).

Eine Abnahme des hepatozellulären ATP-Spiegels ist Folge einer verringerten Sauerstoffverfügbarkeit und trägt zu einer Schädigung der Leberzellen und einer daraus resultierenden Dysfunktion bei. Im Verlauf des hämorrhagischen Schocks kommt es durch eine verminderte Sauerstoffzufuhr zur Depletion von ATP im Lebergewebe. Normalerweise kann sich jedoch der ATP-Spiegel wieder bei ausreichender Sauerstoffzufuhr in der Reperfusionsphase erholen (SZABO 1999). Dabei werden aber oft die Ausgangswerte nicht wieder erreicht, was vom Grad der ischämischen Leberschädigung und der No-Reflow-Mechanismen in der Mikrozirkulation abhängt (MARUBAYASHI 1980; KAMIKE 1982; BACH 1996; MENGER 1999). Bei der vorliegenden Untersuchung weisen die DCLHb-präkonditionierten Tiere einen signifikanten stärkeren Abfall des hepatozellulären ATP-Spiegels im Vergleich zu anderen Schock-Gruppen. Ein möglicher Mechanismus für die persistierende ATP-Depletion ist möglicherweise einerseits

eine durch die induzierte Vasokonstriktion weiterhin gestörte mikrovaskuläre Perfusion des Lebergewebes in der Reperfusionsphase. Andererseits könnte auch die erst nach 24 Stunden erreichte maximale Gewebekonzentration von DCLHb (KEIPERT 1994) aufgrund des freien Hb zu einer toxischen Schädigung der Hepatozyten mit Störung der Syntheseleistung beitragen.

### **6.4. Schlussfolgerung**

DCLHb und HAR induzieren selektiv und dosisabhängig das Stressprotein HO-1. Trotzdem führt eine DCLHb-Präkonditionierung nicht zu einer Protektion vor Schock-induziertem Organversagen, sondern im Gegenteil, zu einer Aggravation der Schädigung und letztendlich zu einer Erhöhung der Letalität. Ein Mechanismus könnte die verzögerte Gewebearreicherung mit hoher NO-Affinität und eine erhöhte Endothelin-1 Expression sein, so dass durch die hervorgerufene Vasokonstriktion eine Störung der Mikrozirkulation und damit eine verminderte Organdurchblutung und –viabilität resultiert. Dieser pathophysiologische Zusammenhang könnte möglicherweise auch der erhöhten Letalität der mit DCLHb behandelten Patienten in klinischen Studien zugrunde liegen. Deshalb ist die genaue Kenntnis über die physiologischen Wechselwirkungen dieser Lösungen von entscheidender Bedeutung, um in Zukunft einen wünschenswerten, sicheren, universell einsetzbaren Blutersatzstoff zu entwickeln.

Im Gegensatz zu DCLHb führt die Präkonditionierung mit HAR zu einem Schutz vor schockbedingtem Organversagen und damit zu einer Reduktion der Letalität. Der zugrunde liegende Mechanismus scheint die HO-1 Induktion durch HAR und die damit einhergehende mögliche Verbesserung der mikrozirkulatorischen Gewebepfusion zu sein. Damit könnte eine Vorbehandlung mit Häminarginat im Rahmen einer pharmakologischen Präkonditionierung zu einer Erhöhung der Gewebetoleranz vor einem hämorrhagischen Schockereignis führen.