

Aus der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie

der Universität Würzburg

Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Dr. h.c. Norbert Roewer



**Die Rolle der Mangansuperoxiddismutase bei der Kohlenstoffmonoxid vermittelten
Protektion in der systemischen Inflammation im murinen Maustiermodell**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Jürgen Brugger

aus Donaueschingen

Würzburg, Juni 2015

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Christian Wunder

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Ingo Klein

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 29. Juli. 2016

Der Promovend ist Arzt

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1. Systemische Inflammation und Sepsis | 1 |
| 1.1.1. Definition | 1 |
| 1.1.2. Pathophysiologie der Systemischen Inflammation..... | 2 |
| 1.1.3. Therapeutische Optionen | 4 |
| 1.2. Anatomie und Physiologie der Leber | 5 |
| 1.2.1. Anatomie der Leber..... | 5 |
| 1.2.2. Sinusoidale Endothelzellen | 7 |
| 1.2.3. Makro- und Mikrozirkulation der Leber | 7 |
| 1.2.4. Pathophysiologie der Leberschädigung unter systemischer Inflammation | 9 |
| 1.3. Oxidativer Stress..... | 12 |
| 1.3.1. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)..... | 13 |
| 1.3.2. ROS in der Leber | 14 |
| 1.4. Antioxidative Systeme | 15 |
| 1.4.1. Antioxidative Enzyme (AOEs) | 15 |
| 1.4.2. Katalase (CAT)..... | 16 |
| 1.4.3. Gluthationperoxidase (GPx) | 16 |
| 1.4.4. Superoxiddismutasen..... | 17 |
| 1.4.4.1. Kupferzinksuperoxiddismutasen (CuZnSOD)..... | 18 |
| 1.4.4.2. Extracelluläre Superoxiddismutase (EcSOD)..... | 18 |
| 1.4.4.3. Mangansuperoxiddismutase (MnSOD)..... | 19 |
| 1.4.5. Weitere Antioxidanzien..... | 21 |
| 1.4.6. Das Hämoxygenasesystem..... | 21 |
| 1.4.6.1. Das Biliverdinsystem..... | 22 |
| 1.4.6.2. Die Rolle des Kohlenstoffmonoxid (CO) | 22 |
| 1.5. Karbonylierung..... | 25 |
| 1.6. Zielsetzung dieser Arbeit und Fragestellung: | 26 |
| 2. Material und Methoden..... | 27 |
| 2.1. Material | 27 |
| 2.1.1. Versuchstiere | 27 |
| 2.1.1.1. Physiologische Werte der Maus | 27 |
| 2.1.2. Reagenzien..... | 28 |
| 2.2. Versuchsablauf | 30 |
| 2.2.1. Narkoseführung..... | 30 |
| 2.2.2. Instrumentierung | 30 |
| 2.2.3. Ischämie/Reperfusion..... | 30 |
| 2.3. Methoden | 31 |
| 2.3.1. Hemmung der Hämoxygenase..... | 31 |
| 2.3.2. In-vivo Fluoreszenzmikroskopie | 32 |
| 2.3.3. Separierung der parenchymalen von den mikrovaskulären Zellen..... | 32 |
| 2.3.3.1. Verfahren nach Seglen | 32 |
| 2.3.3.2. Separierung der parenchymalen Zellen..... | 33 |
| 2.3.3.3. Separierung der mikrovaskulären Zellen | 33 |
| 2.3.4. Laborchemische Parameter | 34 |
| 2.3.5. Quantitative Analyse der Sauerstoffradikale..... | 34 |
| 2.3.6. Quantifizierung der Fettsäureoxidation durch Bestimmung der Malondealdehyde..... | 34 |
| 2.3.7. Bestimmung von GSH und GSSG..... | 35 |
| 2.3.8. Bestimmung der MnSOD | 35 |
| 2.3.9. Quantifizierung der Karbonylierung | 36 |
| 2.3.10. Messung der HO-Aktivität..... | 36 |

| | |
|--|-----------|
| 2.4. Graphische Darstellung und Statistik..... | 37 |
| 3. Ergebnisse | 38 |
| 3.1. Oxidativer Stress:..... | 38 |
| 3.1.1. Intravitalmikroskopie..... | 38 |
| 3.1.2. Fettsäureoxidation..... | 40 |
| 3.2. MnSOD | 43 |
| 3.3. Karbonylierung..... | 45 |
| 4. Diskussion..... | 47 |
| 4.1. Ischämie-Reperfusion-Modell..... | 47 |
| 4.2. Malondialdehyd | 49 |
| 4.3. DHR-Fluoreszenz..... | 50 |
| 4.4. GSH/GSSG | 51 |
| 4.5. CO hat antiinflammatorische Effekte | 51 |
| 4.6. Die Rolle der Mangansuperoxiddismutase..... | 54 |
| 4.6.1. Die Aktivität der MnSOD ist nur in den sinusoidalen Zellen erniedrig | 54 |
| 4.7. Karbonylierung..... | 56 |
| 4.7.1. Durch I/R wird die Karbonylierung der MnSOD erhöht. | 56 |
| 4.7.2. Durch die Applikation von CO wird die Karbonylierung der MnSOD reduziert..... | 57 |
| 5. Zusammenfassung | 62 |
| 6. Literaturverzeichnis..... | 64 |
| Abkürzungsverzeichnis | |
| Danksagung..... | |
| Lebenslauf | |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1: Zelluläre Komponenten und Mediatoren der hepatischen Entzündungsreaktion im SIRS. | 6 |
| Abbildung 2: Intravitalmikroskopische Visualisierung der DHR Fluoreszenz..... | 39 |
| Abbildung 3: Darstellung der Quantifizierten DHR-Fluoreszenz:..... | 40 |
| Abbildung 4: Ischämie/Reperfusion der Hinterläufe resultiert in einem signifikanten Anstieg der Fettsäureperoxidation verglichen mit der Kontroll-, als auch der Sham-Gruppe. | 41 |
| Abbildung 5: Ischämie/Reperfusion führt zu einer signifikanten Reduktion des hepatischen Gesamtmenge an GSH+GSSG und zu einem signifikanten Anstieg von GSSG im Vergleich zu den Sham-Tieren. | 43 |
| Abbildung 6 Darstellung der MnSOD Aktivität. Unter Applikation von CO zeigt sich eine Erholung der MnSOD Aktivität auf Sham-Niveau..... | 44 |
| Abbildung 7 Darstellung der Karbonylierung. | 45 |
| Abbildung 8 Verhältnis der Karbonylierten zur gesamten MnSOD | 46 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle 1: Übersicht der wichtigsten Superoxiddismutasen im menschlichen Organismus..... | 17 |
| Tabelle 2: Verwendete Reagenzien | 28 |
| Tabelle 3: Verwendeter Perfusionspuffer | 28 |
| Tabelle 4: Verwendeter Digestionspuffer | 29 |
| Tabelle 5: Verwendeter Suspensions Puffer | 29 |
| Tabelle 6: Verwendeter Proteaseinhibitor Cocktail (2.4 µl/250 µl sample) | 29 |
| Tabelle 7: Aufteilung der randomisierten Versuchstiere auf die verschiedenen Versuchsgruppen | 30 |

1. Einleitung

1.1. Systemische Inflammation und Sepsis

Das wohl häufigste Krankheitsbild auf Intensivstationen stellt das „systemic inflammatory response Syndrome“ (SIRS) dar ¹.

Schwere Traumen, sowohl durch äußere Verletzungen als auch operative, sowie septische Geschehen sind die Hauptursachen. Insbesondere die verschiedenen Formen des Schocks gelten als Auslöser des SIRS ². Weiterhin wurde die Auslösung einer systemischen Inflammation nach Ischämie und Reperfusion beschrieben, welche zum Beispiel nach Herzoperationen unter extrakorporaler Zirkulation, bei Eingriffen an der Leber, insbesondere in der Transplantationschirurgie, auftreten. Weitere Ursachen sind Massivtransfusionen und Brandverletzungen.

1.1.1. Definition

Im Jahr 2004 schlossen sich mehrere Fachgesellschaften zur „sepsis campaign“ zusammen um Leitlinien zur Therapie dieses schweren Krankheitsbildes zu erarbeiten, um durch die Wissensgenerierung die Mortalität senken zu können. Bereits im Jahr 1992 wurde die Bezeichnung „systemic inflammatory response syndrome“ (SIRS) eingeführt. Damit wurde ein Krankheitsbild beschrieben, welches mindestens zwei der folgenden Kriterien erfüllt ³:

Körpertemperatur $>38^{\circ}\text{C}$ oder $<36^{\circ}\text{C}$,

Herzfrequenz $>90/\text{min}$,

Atemfrequenz $>20/\text{min}$ oder $p_{\text{a}}\text{CO}_2 <32\text{mmHg}$,

Leukozytenzahl $>12000/\mu\text{l}$ oder $<4000/\mu\text{l}$ oder $>10\%$ stabkernige Granulozyten

Im Rahmen der International Sepsis Definitions Conference wurden im Jahr 2001 zusätzliche klinisch diagnostische Parameter als Kriterien für ein SIRS definiert. Werden als Ursache Bakterien, Viren oder Pilze vermutet, so spricht man von Sepsis ⁴.

Aktuelle Studien deuten daraufhin, dass in naher Zukunft laborchemische Marker, wie z.B. Interleukin-6 (IL-6) und Procalcitonin eine zunehmende Rolle in der Diagnostik des SIRS und der Sepsis spielen werden ⁵⁻⁷.

1.1.2. Pathophysiologie der Systemischen Inflammation

Erfüllt ein Patient drei oder mehr Kriterien, so ist es sehr wahrscheinlich, dass im weiteren Verlauf ein Versagen eines oder mehrerer Organsysteme zu erwarten ist. Knapp ein Drittel aller Patienten, welche alle vier SIRS-Kriterien erfüllen, erleiden das Vollbild eines septischen Schocks. Trotz aller bisherigen Bemühungen und zeitnaher verbesserter Therapieregime liegt laut Literaturangaben die Mortalität bei diesen Patienten bei 55% ^{8,9}.

Durch die Beeinträchtigung der Makrozirkulation kommt es auch im Bereich der Mikrozirkulation zu einer starken Verminderung und somit zu einer Sauerstoffmangelversorgung. Durch diese, sowie durch die Bildung radikaler Sauerstoffmetabolite (ROS) und Entzündungsmediatoren kommt es zu einer weiteren Schädigung der Zellen.

Die systemische Inflammation stellt auch die Endstrecke der Sepsis dar. Die Induktion der Inflammation erfolgt durch die Bindung von Endotoxinen an das LPS-bindende Protein. Dies führt zur Bindung sowohl an den CD14-Rezeptor, als auch an Toll-like Rezeptoren TLR4 ¹⁰ bzw. bei grampositiven Bakterien an Toll-like Rezeptoren TLR2 ¹¹. Es erfolgt die Aktivierung des nukleären Faktors κ -B (NF- κ B) ¹². Somit werden Zytokine und andere pro-inflammatorische Mediatoren initiiert. Auf weitere Aktivierungsvorgänge soll an dieser Stelle nicht eingegangen werden. Die Zytokine TNF- α und IL-1 werden innerhalb der ersten Stunde von aktivierten Makrophagen und CD4-T-Zellen ausgeschüttet. Durch diese primären Mediatoren werden verschiedene sekundäre Mediatoren ausgeschüttet. Hiermit wird eine Signalverstärkung erreicht. Ein weiterer wichtiger Schritt in der Signalverstärkung ist die Aktivierung des Komplementsystems.

Weiterhin wird die Immunantwort durch den „macrophage migration inhibitory factor“ (MIF) verstärkt; dieser wird von Makrophagen, Monozyten, T-Zellen und hypophysären Zellen gebildet und ist ab circa 8 Stunden nach Beginn der Infektion nachweisbar. MIF aktiviert wiederum Makrophagen und T-Zellen. In der weiteren Pathogenese der Sepsis bilden Makrophagen das high-mobility group B protein“ (HMGB) welches unter anderem NF- κ B aktiviert ¹³.

Neben den proinflammatorischen Mediatoren aktiviert der Organismus auch antiinflammatorische Moleküle wie IL-4 und IL-10. IL-1 Rezeptorantagonisten und gelöste TNF-Rezeptoren werden freigesetzt. Somit soll die überschüssige Reaktion der Sepsismediatoren gebremst werden. Ein anderer Mechanismus stellt der durch autodestructive Freisetzung von Proteasen induzierte programmierte Zelltod, Apoptose, dar. Apoptotische Zellen können auch die Funktion immunkompetenter Zellen beeinträchtigen ¹⁴.

Diese anti-inflammatorischen Prozesse laufen parallel zu den proinflammatorischen Vorgängen ab. Eine Restitutio ist nur dann möglich, wenn die Fähigkeit zur Immunreaktion erhalten bleibt ¹⁴.

Durch die generalisierte Ausschüttung von Entzündungsmediatoren wird insbesondere auch das kardiovaskuläre System stark kompromittiert. Neben einer verminderten Ejektionsfraktion, einer Dilatation des linken Ventrikels konnte auch eine Erhöhung des linksventrikulären enddiastolischen Volumens nachgewiesen werden. In der Sepsis werden höhere Füllungsdrücke benötigt um ein vergleichbares Schlagvolumen zu erzeugen ¹⁵. Durch die Aktivierung der NO-Synthase durch TNF α und IL-1 wird an verschiedenen Stellen der Kardiomyozyten die kardiale Dysfunktion verursacht ¹⁶. Die NO-Synthase (NOS) wird neben anderen vasoaktiven Mediatoren im Endothel synthetisiert. Die verstärkte NO-Produktion führt zu einer ausgeprägten Vasodilatation ¹⁷. Diese führt zu einem Pooling des Blutes in den peripheren Gefäßen und einem verminderten Rückstrom zum Herzen.

Durch Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche von Endothelzellen kommt es zur Adhäsion von Leukozyten. Die adhären und

aktivieren Leukozyten produzieren zytotoxische Substanzen, wie zum Beispiel Elastase, Myeloperoxidase und Sauerstoffradikale. Diese als „respiratory burst“ bezeichnete Reaktion schädigt nicht nur spezifische Mikroorganismen, sondern auch körpereigene Zellen. Durch den Endothelzellschaden entstehen Kapillarlecks. Durch die Schädigung dieser Barriere kommt es zum Flüssigkeitsaustritt nach extravaskulär und somit zur Ödembildung. Dies führt wiederum zu einer Potenzierung des intravasalen Volumenmangels und somit zu einem weiteren Abfall der kardialen Vorlast.

Die systemische und undifferenzierte Vasodilatation verhindert eine suffiziente Verteilung des Herzzeitvolumens auf die verschiedenen Organe und somit zu einer Einschränkung der Mikrozirkulation ¹⁸.

Bei Patienten mit Sepsis wird trotz eines suffizienten systemischen Sauerstoffangebotes eine Laktatazidose in Kombination mit einer niedrigen Sauerstoffextraktion beobachtet. Die genauen Mechanismen sind bisher unklar. Eine Ursache stellt die Hemmung des mitochondrialen Energiestoffwechsels dar ¹⁹. Veränderungen des mikrovaskulären Blutflusses und der Oxygenierung der Zellen sind daran beteiligt. Eine intakte und funktionsfähige Mikrozirkulation ist essentiell für eine effiziente Gewebeoxygenierung. In der Sepsis wird durch verschiedene pro-inflammatorische Mediatoren die Mikrozirkulation beeinträchtigt. Die genauen Mechanismen sind bisher ungeklärt, jedoch konnte eine Reduktion der perfundierten Kapillaren, eine verminderte Deformierbarkeit der Erythrozyten, eine Dysfunktion der Endothelzellen mit einer vermehrten Permeabilität und Apoptose, ein erhöhter vasomotorischer Tonus, und eine erhöhte Anzahl aktivierter neutrophiler Granulozyten festgestellt werden ²⁰. Durch die erhöhte Expression von Adhäsionsmolekülen kommt es zu einer erhöhten Interaktion mit Leukozyten. Außerdem kommt es zur Aktivierung der Gerinnungskaskade mit Fibrinablagerungen. Es resultieren Mikrothromben, sowie ein Zellödem ²¹.

1.1.3. Therapeutische Optionen

Die therapeutischen Ansätze gliedern sich in kausale, supportive und adjunktive Therapie. Ein wichtiger Aspekt ist die frühzeitige Einleitung der antimikrobiellen

und kreislaufstabilisierenden Therapie. Um dem Kliniker eingängig die komplexen Zusammenhänge zwischen Art und Zeitpunkt darzustellen wurden durch die Surviving Sepsis Campaign mehrere Sepsisbündel erstellt ²². Ziel dieser Maßnahmen ist die systemische inflammatorische Reaktion mit ihren negativen Folgen für den Organismus zu beherrschen und gleichzeitig die nutritive (Sauerstoff und Substrate) Versorgung und den Stoffwechsel aller Organe und Gewebe aufrechtzuerhalten.

1.2. Anatomie und Physiologie der Leber

1.2.1. Anatomie der Leber

Die Leber ist das zentrale Stoffwechselorgan im Organismus von Säugetieren. Neben ihrer Synthesefunktion, ist sie eine wichtige exokrine Drüse. Außerdem ist sie das wichtigste Organ zur Entgiftung körpereigener und körperfremder Verbindungen und ein zentrales Speicherorgan. Die Leber liegt größtenteils intraperitoneal. Sie wird in einen rechten, Lobus dexter, und einen linken, Lobus sinister, Leberlappen unterteilt. Durch die H-förmig angeordneten Furchen grenzen sich am rechten Leberlappen noch zwei weitere kleine Lappen, der Lobus quadratus und der Lobus caudatus ab. Wird die Leber nach ihrer Durchblutung funktionell eingeteilt, so gliedert sie sich in neun Segmente ²³.

Die Leber zählt zu den Organen, welche bei Minderperfusion, z.B. durch eine Erniedrigung des Herzzeitvolumens, mit einer Funktionseinschränkung reagieren. Dies kann u.a. auch im Rahmen einer systemischen Entzündungsreaktion auftreten. Das Ausmaß dieser Leberzellschädigung stellt einen bedeutenden Faktor im Bezug auf Morbidität und Mortalität dieser Patienten dar. Hiervon sind insbesondere die Leberparenchymzellen betroffen. Die Sinusoide der Leber regulieren die Mikrozirkulation größtenteils durch lokale Regulationsmechanismen. Hierbei spielen Stickstoffmonoxid und Kohlenmonoxid neben anderen Faktoren eine wesentliche Rolle ²⁴.

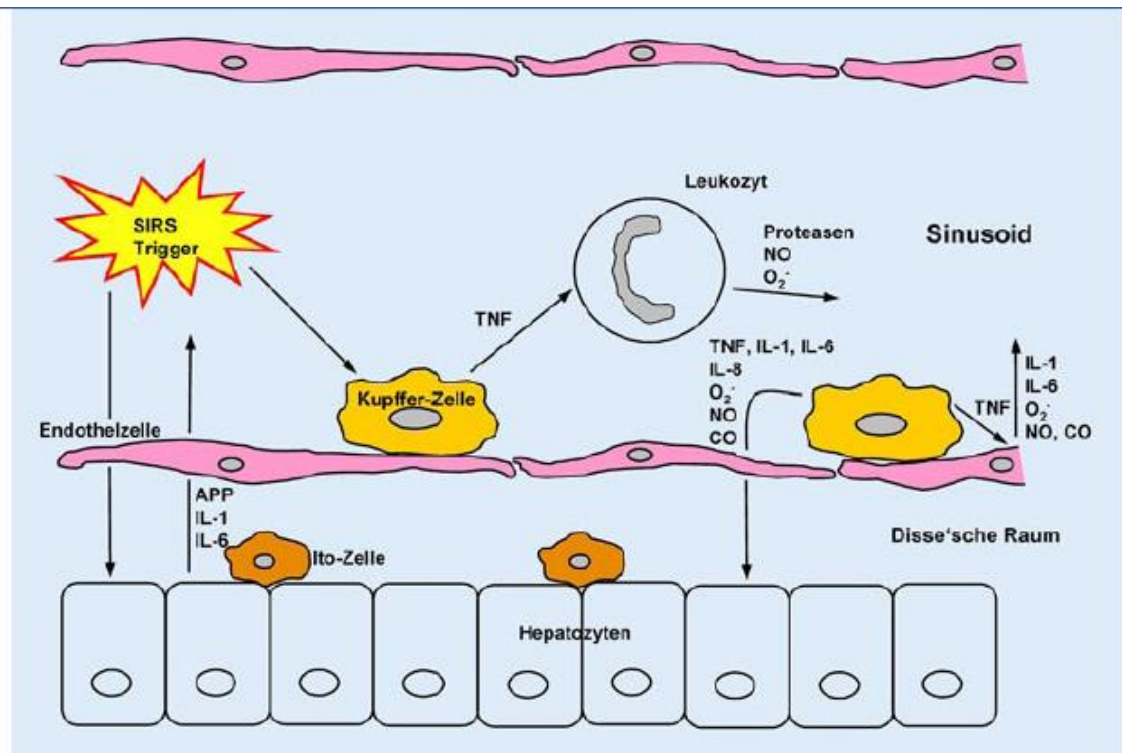


Abbildung 1: Zelluläre Komponenten und Mediatoren der hepatischen Entzündungsreaktion im SIRS.

Durch den SIRS-Trigger (Ischämie-Reperfusion, Trauma, Verbrennung usw.) erfolgt die Aktivierung sowohl der Kupfer-Sternzellen als auch der Hepatozyten. Die Folge ist eine Reaktionskaskade mit Bildung u. a. von TNF- α , Interleukinen, Sauerstoffanionen, Stickstoffmonoxid und Kohlenmonoxid durch aktivierte Kupfer-Sternzellen. Tumor-Nekrose-Faktor- α aktiviert die Endothelzellen der Lebersinusoide und immunkompetente Zellen, wie Leukozyten. Es resultiert Bildung weiterer inflammatorischer Mediatoren. *APP* Akutphaseprotein, wie z. B. α_1 -Antitrypsin; *IL-1* Interleukin-1; *IL-6* Interleukin-6; *IL-8* Interleukin-8; *TNF* Tumor- Nekrose-Faktor- α ; *NO* Stickstoffmonoxid; *CO* Kohlenmonoxid; O_2^- Sauerstoffsuperoxid. Größenverhältnisse der Abb. sind nicht maßstabsgetreu²⁴.

Weitere Zellen der Leber sind die Kupferzellen, welche als ortsständige Makrophagen verstanden werden und an der Innenseite der Sinusoide haften. Außerdem befinden sich in der Leber so genannte Ito-Zellen, welche neben ihrem Einfluss auf die Mikrozirkulation hauptsächlich zur Fett- und Vitamin-A Speicherung benötigt werden.

Die Leber nimmt im Metabolismus des Organismus verschiedene Aufgaben wahr. Hierzu zählen Entgiftungsaufgaben, Proteinbiosynthese, die Regulation des Blutzuckerspiegel und des Lipoproteinstoffwechsels, Biotransformation sowie Aufgaben im Bereich der Immunabwehr.

1.2.2. Sinusoidale Endothelzellen

In der Leber adulter Säugetiere sind ca. 65 % der Zellen Hepatozyten, die übrigen sind nichtparenchymale, hauptsächlich sinusoidale Zellen. Die Sinusoide enthalten neben den Endothelzellen (LSEC = Leber-sinusoidale Endothelzellen) vor allem leberresidente Makrophagen, genannt Kupfferzellen, und Ito Zellen, die auch als fettspeichernde Zellen bezeichnet werden. Des Weiteren findet man in der Leber residente DCs und Lymphozyten. Die hepatischen Sinusoide mit einem Durchmesser von 5-7 μm werden von einem Endothel ausgekleidet, welches sich morphologisch und phänotypisch von vaskulärem Endothel anderer Organe unterscheidet. An den Rändern überlappen sich die Endothelzellen ohne jedoch zonulae occludentes auszubilden. Die LSEC sind nur durch den 0,3 μm breiten, flüssigkeitsgefüllten Disse'schen Raum von den darunterliegenden Hepatozyten getrennt, da die typische Basalmembran fehlt. Die LSEC haben Fenestrae mit einem Durchmesser von ca. 100 μm , die in Clustern, sogenannten Siebplatten, angeordnet sind. Größere Lücken zwischen den Endothelzellen sind selten, so dass man von einem kontinuierlichen Endothel vom fenestrierten Typ spricht. Die meisten Fenestrae sind nicht durch Diaphragmen verschlossen. Somit können alle nicht partikulären Blutbestandteile durch die Fenestrae in den Disseschen Raum eindringen²³. Diese sorgen zwischen dem sinusoidalen Lumen und dem Parenchym für einen intensiven Austausch von Stoffen. Zusammen mit den phagozytierenden Kupfferzellen sind die LSEC aufgrund der rezeptorvermittelten Pinozytose ein wichtiger Teil des angeborenen Immunsystems, indem sie an der Entsorgung zirkulierender Makromoleküle beteiligt sind²⁵.

1.2.3. Makro- und Mikrozirkulation der Leber

Die Leber zählt zu den bestdurchbluteten Organen, circa 30% des zirkulierenden Blutvolumens fließen durch die Leber. Dies ist, um die mannigfaltigen Aufgaben wahrnehmen zu können, von immanenter Bedeutung. Die Leber erhält das nährstoffreiche, venöse Blut aller unpaaren Bauchorgane. Sie ist das Bindeglied zwischen Vena portae und Vena cava inferior. Dies

nimmt etwa 75% des durch die Leber fließenden Blutes ein. Die restlichen 25% dienen der Eigenversorgung. Sie wird mit sauerstoffreichem Blut aus der Arteria hepatica via Truncus coeliacus aus der Aorta abdominalis versorgt. Die Vena portae und die Arteria hepatica treten zusammen mit dem Ductus choledochus an der Leberpforte in die Leber ein, bevor sie sich wieder auf die einzelnen Leberlappen und Segmente aufteilen. Diese drei Strukturen bestimmen auch die mikroskopische Anatomie der Leber. Sie treten ubiquitär als Glissonsche Trias in den einzelnen Leberläppchen auf. Circa 1-1,5 Millionen Leberläppchen sind in der Leber zu finden. Diese hexagonalen Lobuli werden sternförmig von den gefensterten kapillären Endstrecken von Vena portae und Arteria hepatica, den sogenannten Sinusoiden durchzogen. In den Sinusoiden mischt sich venöses Pfortaderblut mit arteriellem Blut der Leberarterie. Dadurch wird erreicht, dass radial ausgerichtete Leberzellen zwischen den Sinusoiden liegen. Die basolaterale Seite der Hepatozyten hat durch die gefensterten Sinusoide freien Kontakt mit dem Blut, so dass sie ihre mannigfaltigen Aufgaben erbringen kann. Der regelmäßige Bau der Lämpchen hat zur Folge, dass die von den Blutsinus durchlaufene Strecke von der Oberfläche des Lämpchens bis zur Mündung in die Zentralvene überall etwa gleich lang ist und ca. 0,5-0,6 mm misst. Auf dieser Strecke erfolgt der gesamte Stoffaustausch. Die Gallenkanälchen liegen an der entgegengesetzten Seite der Leberzelle und nehmen die synthetisierte Gallenflüssigkeit auf. Der Abfluss des Blutes aus der Leber erfolgt aus den Zentralvenen über die Lebervenen, die Vena cava inferior in den rechten Vorhof.

Im Gegensatz zur Makrozirkulation beschreibt die Mikrozirkulation den Blutfluss in den feinsten Blutgefäßen mit einem Durchmesser kleiner als 100µm. Bezogen auf die Durchblutung der Leber wird hiermit der Blutfluss in den Sinusoiden beschrieben. Einen wesentlichen Anteil an der Regulation des Blutflusses im Bereich der Sinusoide stellt die Autoregulation dar. Diese kann unterteilt werden in prä-, intra- und postsinusoidale Regulation. Im Bereich der prä- und der postsinusoidalen Regulation spielen die glatten Zellen der Gefäßmuskulatur der Pfortader bzw. der Zentralvenen eine wesentliche Rolle. Intrasinusoidal erfolgt die Regulation durch Endothelzellen (LSEC), sowie die in

enger Nachbarschaft liegenden Ito-Zellen. Ito-Zellen umgreifen mit ihren langen Armen die Sinusoide und regulieren durch Kontraktion deren Lumen²³. Diese beiden Zelltypen kommunizieren eng miteinander und beeinflussen sich gegenseitig²⁵. Der Einfluss verschiedenster vasoaktiver Substanzen wurde in der Vergangenheit in zahlreichen Studien erforscht. Während durch Endotheline, Angiotensin 2, Prostaglandine und Vasopressin eine Kontraktion induziert werden konnte, sorgen Stickstoffmonoxid (NO), Kohlenstoffmonoxid (CO) und Prostaglandin E2 zu einer Relaxation der Ito-Zellen²⁶.

Neben den autoregulativen Prozessen der zellulären Komponenten scheint auch eine übergeordnete Regulation über das vegetative Nervensystem eine Rolle zu spielen. Dies ist gegenwärtig Gegenstand verschiedener Untersuchungen.

1.2.4. Pathophysiologie der Leberschädigung unter systemischer Inflammation

Die Perfusion der Leber wurde bisher nur in wenigen Studien an Menschen erforscht. Fong injizierte Freiwilligen Endotoxin und konnte einen erhöhten Blutfluss im Hepato-Splanchnikusgebiet nachweisen. Ähnliche Ergebnisse erzielte Dahn nach Volumentherapie bei septischen Patienten. Trotz verbesserter Perfusion und geringer niedriger hepatischer venöser Sättigung, blieb das Lebergewebe weiterhin ischämisch. Dies wird durch einen hohen Sauerstoffverbrauch im Bereich des Splanchnikusgebietes und einer Dysproportion des Sauerstoffangebotes und des durch den hepatischen Hypermetabolismus erhöhten Sauerstoffbedarfes, der nur insuffizient durch eine erhöhte Sauerstoffextraktion kompensiert werden kann, erklärt²⁷.

Veränderungen des mikrovaskulären Blutflusses stellen eine wichtige Ursache des Sepsis induzierten Multiorganversagens dar. Die Mechanismen sind mannigfaltig und beinhalten neben einer Reduktion der Kapillardichte und einer Deformität der Erythrozyten eine erhöhte Permeabilität der Endothelzellen, sowie deren Apoptose. Weiterhin wurde ein veränderter vasomotorischer Tonus, mit Eröffnung von arterio-venösen Shunts, eine vermehrte Adhäsion von Thrombozyten nachgewiesen. Aktivierte neutrophile Granulozyten führen zu einer Erhöhung von Adhäsionsmolekülen an der Endotheloberfläche, sowie zu

einer Aktivierung der Gerinnungskaskade und somit zur Bildung von Mikrothromben²⁸.

Das Zusammenspiel all dieser Prozesse resultiert in einer Gewebehypoxie. Ursächlich sind eine kompromittierte Mikrozirkulation als auch durch eine mitochondriale Dysfunktion. Klinisch zeigt sich dies in einer vermehrten Sauerstoffextraktion (Ausschöpfung).

Durch systemische Inflammation werden verschiedenste Veränderungen der Mikrozirkulation aller Organe des Splanchnikusgebietes verursacht, welche nicht durch globale Änderungen des Blutflusses vorhergesagt werden können²⁹.

Während einer systemischen Inflammation reduziert sich der Fluss, sowohl systemisch, als auch in der Arteria mesenterica superior sowie die Mikrozirkulation der Leber um ca. 50%. Durch Volumensubstitution kann der Blutfluss systemisch und in der Arteria mesenterica gesteigert werden. Dies gilt jedoch nur marginal für die Mikrozirkulation. Innerhalb der Leber kommt es zu einer Umverteilung des Blutflusses von den kontrahierten zu den dilatierten Gefäßen, wodurch eine Reduktion perfundierter Sinusoide resultiert³⁰.

Sinusoidale Endothelzellen und Kupfferzellen sind die ersten Leberzellen, welche mit Entzündungsmediatoren und Erregern, und deren Produkten via Blut aus der Portalvene und der Arteria hepatica in Kontakt kommen. Abhängig von der Funktionsfähigkeit dieses "Siebes" korreliert die Aktivierung und Induktion von Kupfferzellen mit dem Vorhandensein dieser Stimuli³¹.

Die Stimulation von Kupfferzellen bewirkt eine Vielzahl verschiedener inflammatorischer, toxischer und vasoaktiver Substanzen, welche direkt oder indirekt zum Zellschaden führen. Sinusoidale Endothelzellen wiederum produzieren vasoaktive Substanzen, beispielhaft seien an dieser Stelle Prostacycline und NO genannt. Diese wirken sowohl makro- als auch mikrozirkulatorisch modulierend auf den Gefäßtonus. Des Weiteren werden die LSEC strukturellen und funktionellen Veränderungen unterzogen. Durch Schwellung, Überdehnung und Zerreißen der LSEC kommt es zur Leckage und zum Eindringen von Albumin, Plasma und inflammatorischen Zellen ins Interstitium, welches wiederum in einer direkten Schädigung des Gewebes

resultiert. Aktivierte LSEC verlieren außerdem ihre antikoagulatorischen Fähigkeiten und exprimieren Oberflächenadhäsionsmoleküle, welche zur vermehrten Anlagerung von Thrombozyten und Leukozyten führt³².

Letztlich kommt es zur Flussreduktion in den Sinusoiden, welche sich zur sowieso schon reduzierten Perfusion der Sinusoide aufsummiert. In Anwesenheit unkontrollierter Inflammation und fortschreitender Koagulopathie führt dies zur Ischämie und Dysfunktion und als Endstrecke zum Leberversagen.

Während bei der Sepsis eine definierte Noxe für den Organismus vorliegt, ist diese beim SIRS eher unspezifisch. Die Reaktion des Organismus scheint aber für alle Noxen gleich abzulaufen. Die klassische Entzündungsreaktionskaskade beginnt mit der Bildung von TNF- α , gefolgt durch die Bildung von IL-1, IL-6 und IL-8. Diese Mediatoren aktivieren Phagozyten, Monozyten, Thrombozyten und Gewebsmakrophagen. Weiterhin werden Komplementfaktoren und das Gerinnungssystem hochreguliert. Im Zuge dieser ersten Phase werden in der Leber diese Mediatoren gebildet und aktiviert. Somit ist die Leber nicht nur Bildungsort, sondern auch Zielorgan. Durch den hohen Anteil am zirkulierenden Blutvolumen und der großen Anzahl an gewebsständigen Makrophagen nimmt die Leber eine Schlüsselposition in der Reaktion auf eine Noxe ein. Zu Beginn einer systemischen Entzündungsreaktion konnte in verschiedenen Tiermodellen gezeigt werden, dass Kupferzellen u.a. durch TNF- α aktiviert werden. Hierdurch wird die Entzündungsreaktion verstärkt, da in den Kupferzellen die Bildung von Sauerstoffradikalen, TNF- α , Proteasen und Stickstoffmonoxid induziert wird. Im weiteren Verlauf kommt es somit in der Leber zur Akkumulation von Leukozyten. Diese aktivierten Leukozyten sind zu einem bedeutenden Teil mitverantwortlich an der Leberschädigung im Rahmen einer SIRS^{33,34}.

Eine Vielzahl von pro-inflammatorischen Mediatoren aktivieren die sinusoidalen Endothelzellen. Somit werden in den Sinusoiden vermehrt Adhäsionsmoleküle exprimiert. Damit wird die Bindung von aktivierten Leukozyten erleichtert³⁵.

Die genauen Pathomechanismen sind noch weitestgehend unverstanden. Insbesondere den sinusoidalen Endothelzellen scheint eine bedeutende Rolle in der Reaktion auf eine systemische Inflammation zuzukommen. Welche Mechanismen hierbei genau eine Rolle spielen ist Gegenstand aktueller Forschung. Die Exprimierung verschiedener Adhäsionsmoleküle an der Oberfläche spielt eine gewisse Rolle, verschiedene Arbeiten konnten jedoch nachweisen, dass auch ohne Adhäsionsmoleküle eine Durchwanderung der Endothelzellen und eine Immobilisierung stattfindet ³⁶. Daraus resultiert eine weitere Einschränkung der Mikrozirkulation.

1.3. Oxidativer Stress

Freie Radikale führen zur Schädigung von DNA, RNA, Proteinen, Lipiden und Carbohydraten. Unter Freien Radikalen werden Molekülteile verstanden, welche an ihren Bruchstücken ein Atom mit einem ungepaarten Elektron haben. Die Oxidation von DNA kann zu Einzel- oder Doppelstrangbrücken, Crosslinks, Mutationen und Verkürzung der Telomere führen und hat somit weitreichende Folgen im Organismus. Oxidantien wirken sowohl in der nukleären, als auch in der mitochondrialen DNA. Dies ist jedoch unerheblich für den Basenreparaturvorgang, welcher nur den ersten Defekt reparieren kann. Die Akkumulation von Defekten der mitochondrialen DNA, führen zu altersabhängiger Abnahme der mitochondrialen Funktion ³⁷. RNA scheinen weniger schwerwiegende Schädigungen zur Folge zu haben. Sie sind nicht vererblich, in mehreren Kopien vorhanden und erneuerbar. Die oxidative Schädigung scheint unter anderem in der Pathogenese des Morbus Alzheimer eine Rolle zu spielen ³⁸. Ein Großteil des Organismus besteht aus Proteinen. Durch Oxidation kommt es zum Entfalten der Proteinstruktur und durch die Konformitätsänderung zur Reduktion der Funktion. Durch die Oxidation von Seitengruppen oder Proteingerüsten können auch neue Sauerstoffradikale entstehen. Meist werden die beschädigten Proteine jedoch nicht repariert, sondern durch Proteasen abgebaut ³⁹.

Lipide sind die wichtigsten Bestandteile der Zellmembranen und somit sehr oft Ziel der Oxidation. Die Beschädigung ist hierbei Teil einer Kettenreaktion der

Peroxidation. Daher kann bereits die Oxidation von wenigen Molekülen zu einem relevanten Zellschaden führen⁴⁰.

Die relevanten reaktiven Spezies in biologischen Systemen werden unterteilt in reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und reaktive Stickstoffspezies (RNS), wobei Spezies wie Peroxynitrit sowohl ROS als auch RNS zugeordnet werden können⁴¹.

Nachfolgend werden die in biologischen Systemen bedeutsamen ROS vorgestellt.

1.3.1. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

Es gibt eine zunehmende Evidenz, dass sowohl stationäre Makrophagen, wie z.B. Kupferzellen, als auch aktivierte Monozyten und Neutrophile ursächlich für eine Schädigung der Leber sein können. Als Auslöser kommen exemplarisch Ischämie/Reperfusion, Sepsis, Trauma und hämorrhagischer Schock in Betracht. Die Hauptaufgabe von Makrophagen und Neutrophilen ist die Zerstörung von eindringenden Mikroorganismen und die Entsorgung von nekrotischem Zellmaterial. Hierzu bedienen sie sich verschiedenster Werkzeuge. Die Bildung von ROS, wie zum Beispiel Superoxiden, Hydrogenperoxiden und Hypochlorsäuren, sowie die Abgabe von Proteasen, zählen dazu.

ROS stellen wichtige Mediatoren für Signaltransduktionswege dar, wirken jedoch auch zytotoxisch. Sie werden insbesondere durch gewebeständige Phagozyten und Makrophagen gebildet. Außerdem ist eine Bildung von ROS in allen Typen von Leberzellen nach Stimulation mit Zytokinen möglich. ROS sind durch massive Lipidperoxidation in der Lage Zellen zu zerstören. In vielen Fällen modulieren ROS verschiedene Signaltransduktionswege durch Wirkung auf redoxsensitive Enzyme, Transkriptionsfaktoren und Mitochondrien. Auf diese Weise sind ROS in der Lage Apoptose und nekrotischen Zelltod zu induzieren, sowie zu regulieren. Auf indirektem Wege beeinflussen ROS die Proteasenaktivität durch eine Inaktivierung der Antiproteasen, weiterhin wird die Bildung von Adhäsionsmolekülen und pro-inflammatorischen Mediatoren moduliert.

Die Effekte der ROS im Organismus sind mannigfaltig. Sie sind essentiell für die Abwehrfunktion der Makrophagen. In der systemischen Inflammation kommt es unter anderem zu einer überschießenden Bildung von ROS. Auch in der Pathophysiologie der Inflammation der Leber spielen ROS durch ihre zytotoxischen und mediatorvermittelten Schädigungen eine Rolle. So werden durch ROS unter anderem der sinusoidale Blutfluss und die Leberzellregeneration moduliert ⁴².

1.3.2. ROS in der Leber

Unter physiologischen Bedingungen generiert die Leber geringe Mengen an ROS, insbesondere werden in den Mitochondrien Superoxide und Hydrogenperoxide durch diverse Oxidasen gebildet ^{42,43}.

Durch die hohe Kapazität der Mitochondrien Elektronen von Komplex 1 zu Komplex 3 zu verlieren, stellen sie quantitativ die größten intrazellulären Bezugsquelle für ROS dar ⁴⁴. ROS verursachen auf verschiedenen Wegen Zellschäden; durch die Oxidation von ungesättigten Lipopolysacchariden der Zellmembran, Sulfhydrylgruppen von Proteinen und DNA-Basen. Daher existieren mannigfaltige zelluläre Abwehrmechanismen. Jede Leberzelle ist in der Lage verschiedene Sauerstoffradikalfänger zu produzieren. An dieser Stelle seien die Superoxiddismutasen (SOD) erwähnt, welche sich wiederum in zwei Untergruppen aufteilen. Die SOD1 wurde im Zytosol nachgewiesen, in den Mitochondrien der Subtyp 2 (SOD2). Weitere Abwehrmechanismen stellen die Gluthationperoxidase, welche im Zytosol und in den Mitochondrien vorkommt, die Katalase, in den Peroxisomen, die Thioredoxins (Trx1 im Zytosol, Trx2 in den Mitochondrien), Peroxiredoxins (PRX-I, II, IV im Cytosol; PRX-III, V in den Mitochondrien ⁴⁵. Außerdem verfügen Leberzellen in allen Zellkompartimenten über Gluthation, Antioxidantien wie z.B. Vitamin E in der Zellmembran, sowie redoxaktives Eisen. Aufgrund dieser mannigfaltigen Abwehrmechanismen der Leberzellen, insbesondere der Hepatozyten, verfügt die Leber über ein großes Potential ROS zu metabolisieren und zu inaktivieren, sowie Schäden durch oxidativen Stress zu reparieren. Somit ist der Zelluntergang durch ROS unter physiologischen Bedingungen eine Ausnahme. Wird jedoch diese Abwehrkapazität gegenüber ROS gestört oder überschreitet der oxidative

Stress diese, so kommt es zum Ungleichgewicht und ROS können zytotoxisch wirken ^{42,44}.

Kommt es zu einer systemischen Inflammation, wie z.B. durch Ischämie-Reperfusion, Endotoxämie, Sepsis oder Cholestase, ist in der Leber eine Störung des oxidativen Gleichgewichts die Folge ⁴⁶.

Ein Gewebetrauma (ischämische Verletzung) führt zur Ausschüttung von sogenannten „damage-associated molecular patterns“ (DAMPs), welche wiederum das Komplementsystem aktivieren und direkte Liganden der toll-like-Rezeptoren darstellen ^{47,48}.

Zu den DAMPs werden „high mobility group box protein“ (HMGB1), Hitzeshockproteine (HSPs), Formyl Peptide und mitochondriale und nukleäre DNA-Fragmente. Kombinationen von DAMPs sind hochpotent und inflammatorisch wirksam ⁴⁷. Aktivierte Complementfragmente aktivieren die ROS Bildung via NADPH-Oxidase. Werden in den Gefäßen der Leber ROS gebildet, so handelt es sich hauptsächlich um Superoxide und Hydrogenperoxide. Diese können durch aus den Leberzellen freigesetzten GSH-Molekülen extrazellulär unschädlich gemacht werden. Kommt es jedoch zu einem exzessiven Anfall von ROS zum Beispiel durch inflammatorische Prozesse, erfolgt eine Diffusion von ROS in die Hepatozyten und zum intrazellulären oxidativen Stress, welcher zur Zellschädigung und zum Zelluntergang führen kann ⁴⁹.

1.4. Antioxidative Systeme

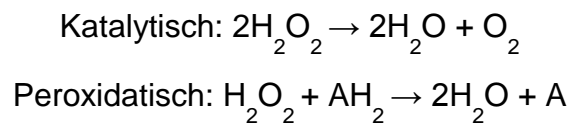
1.4.1. Antioxidative Enzyme (AOEs)

Oxidativer Stress ist ubiquitär und tritt im gesamten Organismus auf. Sowohl intrazellulär, als auch in Mitochondrien entstehen schon unter physiologischen Bedingungen geringe Mengen an reaktiven Sauerstoffmetaboliten, insbesondere von Superoxiden und hydrogen Peroxiden durch oxidative Prozesse. Dies gilt insbesondere für das Organ Leber ⁵⁰. Die Zellen verfügen daher unter physiologischen Bedingungen über verschiedene

Abwehrmechanismen. Die bedeutendsten AOE's sind die Superoxiddismutasen, Katalasen und Gluthationperoxidasen. Diese AOE's verfügen über eine hohe Potenz ROS einzufangen, zu neutralisieren und zu transformieren.

1.4.2. Katalase (CAT)

Katalase ist ein tetrameres Hämoprotein, welches die Reaktion von Hydrogenperoxiden zu Wasser katalysiert. Dies geschieht auf zwei unterschiedlichen Wegen.



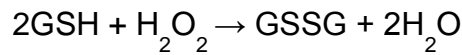
Die Degradation von Wasserstoffperoxid via Katalase stellt eine Reaktion erster Ordnung dar⁵¹. Somit ist die Reaktionsgeschwindigkeit nur linear von der Konzentration des zerfallenden Stoffes abhängig. Das Molekulargewicht beträgt 240 kDa und beinhaltet im aktiven Teil Fe³⁺-Ionen. Sie kommt hauptsächlich in Erythrozyten, Hepatozyten, Nieren und gut oxygenierten Muskeln vor⁵². Auf subzellulärer Ebene befinden sich die CAT im Zytoplasma, den Peroxisomen und in geringerer Konzentration auch in den Mitochondrien⁵³⁻⁵⁵. Die Expression der Katalase wird durch Hyperoxie, Oxidantien und Zytokine getriggert^{56,57}. Die genaue Rolle der CAT in der systemischen Inflammation ist noch weitestgehend ungeklärt.

1.4.3. Gluthationperoxidase (GPx)

Ein weiterer wichtiger Baustein in der Detoxifikation von Peroxiden ist die Gluthationperoxidase. Die GPx ist im Cytoplasma und in den Mitochondrien nachweisbar.

Diese Oxidation wandelt Peroxide und reduziertes Gluthation (GSH) als Elektronendonator katalysiert durch GPx in Gluthationdisulfid und Wasser um. Durch die Gluthationreductase (GR) wird unter Verbrauch von NADPH GSH

regeneriert ⁵⁸.



GR+NADPH

Es existieren 4 GPx, welche alle eine Selencysteingruppe im aktiven Teil haben. Die bestuntersuchte ist die cytosolische (cGPx). Sie ist ein homotetramerisches Protein mit einem Molekulargewicht von 85 kDa, das aus 4 Untereinheiten mit jeweils 22-23 kDa und einer Selencysteinkomponente besteht ⁵⁹.

GPx1-Bildung wird durch Hyperoxie gesteigert ⁶⁰. Bei GPx1 knock-out Mäusen konnte Ho unter normalen Bedingungen keine Unterschiede zu den Wildtypmäusen im Bezug auf oxidative Schäden an Proteinen und Lipiden feststellen. Auf Ischämie/Reperfusion jedoch sind die Knockout-Mäuse anfälliger im Bezug auf Apoptose und Infarktgröße ^{61,62}.

Eine Überexpression wiederum führt zu einer erhöhten Resistenz gegenüber Hyperoxie, Ischämie/Reperfusion und Paraquat ⁶².

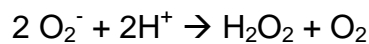
1.4.4. Superoxiddismutasen

| Superoxid-dismutase (SOD) | MW (kDa) | Zahl der Untereinheiten | Aktive Metallionen | Lokalisation |
|---------------------------|----------|-------------------------|--|---|
| CuZnSOD (SOD1) | 32 | 2 | 2 Atome Cu ²⁺ 2 Atome Zn ²⁺ | Cytoplasma, Nucleus, Lysosome, Peroxisome, Mitochondrien Intermembranärer Raum |
| MnSOD (SOD2) | 88 | 4 | 4 Atome Mn ²⁺ | Mitochondrien, Matrix |
| EcSOD (SOD3) | 135 | 4 | 44 Atome Zn ²⁺ | Plasmamembran |

Tabelle 1: Übersicht der wichtigsten Superoxiddismutasen im menschlichen Organismus

1.4.4.1. Kupferzinks-superoxiddismutasen (CuZnSOD)

Die CuZnSOD dismutiert, eine chemische Reaktion mit Ligandenaustausch (aus einer Verbindung werden mehrere Verbindungen), Superoxide zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff:



Das SOD1 Gen besteht aus fünf Exons und ist auf dem Chromosom 21q22.1 lokalisiert ⁶³.

CuZnSOD besteht aus zwei identischen Untereinheiten, welche durch eine Disulfidbrücke verbunden sind. Das Molekulargewicht beträgt 32,500 Dalton und besteht aus Kupfer- und zwei Zinkatomen im aktiven Bereich. Kupfer ist essentiell für die enzymatische Aktivität, während Zink für die Stabilität des Proteins notwendig ist ^{64,65}.

CuZnSOD findet sich in erster Linie im Zytosol, wobei auch geringere Mengen in den Peroxisomen, den Lysosomen, dem Nucleus und im intermembranösen Spalt der Mitochondrien nachgewiesen wurde ⁶⁶⁻⁶⁹.

Die CuZnSOD ist in allen Geweben von Säugetieren nachweisbar, wobei die höchste Dichte in der Leber, den Erythrozyten, dem Gehirn und den Neuronen besteht. Unter physiologischen Bedingungen spielt dieses Enzym jedoch keine Rolle für die normale Funktion und das Überleben der Mäuse. Dies konnte Tsan an Knockout-Mäusen zeigen, die keinerlei Anzeichen für oxidativen Stress zeigten und auch das Erwachsenenalter erreichten. Sie zeigten nur eine verkürzte Lebensdauer und eine erhöhte Inzidenz für Hepatome ^{70,71}.

Die Überexpression dieses Enzyms vermindert den Ischämie/Reperfusionsschaden von Gehirn und Herz ^{72,73}, jedoch führt zum Beispiel eine Überexpression der CuZnSOD zu einer frühzeitigen Alterung von Individuen mit Trisomie 21 ⁷⁴.

1.4.4.2. Extracelluläre Superoxiddismutase (EcSOD)

Die extrazelluläre Superoxiddismutase, auch SOD3 genannt, dismutiert ebenfalls Superoxidradikale zu Wasserstoffperoxide und Sauerstoff. EcSOD

beim Menschen und bei der Ratte zeigen eine hohe Übereinstimmung der DNA-Sequenzen und der Aminosäurefolgen zur CuZnSOD, die EcSOD kodiert bei Menschen auf Chromosom 4⁷⁵. Sie existiert aus vier Untereinheiten und hat ein Molekulargewicht von 135 kDa⁷⁶. Sie beinhaltet an der aktiven Seite Kupfer und Zink-Ionen. Die Expression der SOD3 erfolgt unter anderem durch Interferon γ oder LPS und kann durch TNF α , TGF- β oder IL 1 α reduziert werden^{77,78}. Diese Dismutase wurde im Uterus, den Umbilikalgefäßen, Arterien, der Placenta, dem Serum, genauso wie zerebrospinal, im Aszites und in der Synovialflüssigkeit nachgewiesen^{79,80}. Die höchste Expression konnte jedoch im Lungengewebe detektiert werden, in welchem sie eine wichtige Rolle in der Abwehr der Toxizität des Sauerstoffs darstellt. Eine Überexpression reduziert die Effekte einer Hyperoxämie im Maustiermodell⁸¹. Bei EcSOD Knockout-Mäusen konnte eine erhöhte Anfälligkeit für ein akutes Lungenversagen nachgewiesen werden⁸². Außerdem wird noch ein Einfluss der EcSOD auf den NO-Stoffwechsel diskutiert⁸³.

1.4.4.3. Mangansuperoxiddismutase (MnSOD)

Die Mangansuperoxiddismutase oder SOD2 gilt als eines der wichtigsten intrazellulären, anti-oxidativen Enzymen. Sie stellt die erste Abwehrhürde gegen ROS dar und neutralisiert diese direkt an ihrem Entstehungsort. Sie ist auf einem nuklearen Gen kodiert, während das Protein in der mitochondrialen Matrix lokalisiert ist. Die SOD2 ist ein tetramerisches Enzym mit Manganionen im aktiven Zentrum und einem Molekulargewicht von 88 kDa. Die MnSOD wird als 26 kDa Präkusormolekül synthetisiert und im Anschluss an den Transport in die Mitochondrien zu einem 24 kDa Monomer gespalten, welches dann zum tetramerischen Enzym verbunden wird. Die MnSOD stellt circa 10-15% der absoluten SOD-Aktivität der meisten Gewebe dar und scheint essentiell für das Überleben von Organismen⁷¹. Bei Knockout-Mäusen konnte gezeigt werden, dass ein Fehlen der MnSOD zu einem früheren Ableben der Tiere führt. Schon kurz nach der Geburt konnte eine Retardierung und eine schlechte körperliche Verfassung der Tiere beobachtet werden. Post mortem wurden eine dilatative Kardiomyopathie, eine myokardiale Hypertrophie, eine endokardiale Fibrose, sowie Lipidablagerungen in Leber und Skelettmuskel nachgewiesen werden.

Das Intestinum war verkalkt. Überraschender Weise wurden im Gehirn keine Veränderungen nachgewiesen. Die Lipidperoxidation war weder verstärkt noch wurden morphologische Änderungen in den Mitochondrien nachgewiesen. Durch eine Überexpression von CuZnSOD konnten die obengenannten Effekte nicht vermindert werden. Diese Ergebnisse unterstreichen die zentrale Rolle der MnSOD für eine ungestörte Zellphysiologie ⁸⁴.

Van Remmen konnte an MnSOD^{+/-} Mäusen eine Reduktion von 30 bis 80% der MnSOD nachweisen und keinerlei kompensatorische Hochregulation von anderen anti-oxidativen Enzymen. Erstaunlicherweise waren diese Tiere lebensfähig und zeigen keine wesentlichen Anomalitäten. Bei genauerer Untersuchung wurde eine Reduktion der MnSOD um 50% im Gehirn und um 80% in Herz und Leber festgestellt. Der Quotient aus reduziertem zu oxidiertem Gluthation war bei diesen Tieren reduziert. Dies gilt als Indikator für oxidativen Stress ⁸⁵.

Als Mechanismen dieser Beobachtung konnte in den Mitochondrien ein erhöhter 8-Hydroxyguanosine-Spiegel in der mitochondrialen DNA, eine verminderte Aktivität von Enzymen mit Eisenschwefelkomplex in den Komplexen I und II und ein erhöhter Protonenmangel, sowie eine Inhibition der Atmungskette in den Mitochondrien gemessen werden ⁸⁶. Diese Prozesse waren bei älteren Tieren ausgeprägter und waren stets mit einer Hochregulierung der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung vergesellschaftet ⁸⁷. Zusätzlich konnte Van Remmen noch eine erhöhte Carbonylierung von Proteinen nachweisen ⁸⁸. Der DNA-Schaden in den Mitochondrien war in allen Arbeiten größer als im Nucleus. Im Vergleich mit den Wildtypmäusen war die Apoptoserate erhöht und es wurden erhöhte Spiegel an oxidiertem LDL nachgewiesen. Dies dient als Erklärungsansatz und Nachweis einer Schädigung der Bilayermembran der Zellen. Zusammenfassend deuten alle diese Daten auf eine zentrale Rolle der MnSOD in der Abwehr von oxidativem Stress im Organismus hin.

1.4.5. Weitere Antioxidanzien

Nebst den oben beschriebenen antioxidativen Enzymen verfügt der Organismus von Säugetieren über andere verschiedene Mechanismen zur Abwehr von oxidativem Stress. Zu diesen gehören zum einen weitere Enzymsysteme als auch organische Komponenten. Neben dem Hämoxygenasesystem sei an dieser Stelle das Thioredoxin (Trx) erwähnt. Auf das Hämoxygenasesystem und seine antioxidativen Produkte Biliverdin, Fe^{3+} und CO wird in Abschnitt 1.4.6 eingegangen. Thioredoxine sind kleine Proteine von ca. 12 kDa mit zwei benachbarten Schwefelgruppen. Diese bilden bei der Reduktion von oxidierten Cysteingruppen Disulfidbrücken. Das oxidierte Trx wird unter Verbrauch von NADPH katalysiert durch die Thioredoxinreduktase reduziert. Die wichtigsten Thioredoxine sind Trx-1, welches im Zytoplasma und im Zellkern nachgewiesen wurde und Trx-2, welches in den Mitochondrien vorkommt ⁸⁹. Neben den obengenannten Proteinen spielen im Organismus weitere Proteine eine mehr oder weniger wichtige Rolle als Sauerstoffradikalfänger, so hat auch Plasma eine wichtige Rolle als Oxidanzienabsorber ⁹⁰. Der Vollständigkeit halber seien noch niedermolekulare Antioxidanzien erwähnt. Dazu werden die Metallothioneine ⁹¹, Vitamin A, C, E, Flavonoide ⁹², Anthocyanine ⁹³, Cystein ⁹⁴, Harnsäure ⁹⁵ und Melatonin gezählt ^{96,97}.

1.4.6. Das Hämoxygenasesystem

Die Hämoxygenase (HO) ist das geschwindigkeitslimitierende Enzym für die äquimolare Konversion von Häm in Biliverdin, freies Eisen (Fe^{2+}) und Kohlenstoffmonoxid. Bisher wurden drei Subtypen identifiziert. Die Hämoxygenase 1, auch als Hitzeschockprotein (HSP) 32 bekannt, gilt als induzierbar; dagegen wird Hämoxygenase 2 konstitutiv gebildet. Die Hämoxygenase 3 stellt einem verwandten, jedoch zum aktuellen Zeitpunkt noch schlecht erforschten Subtypen dar. Unter physiologischen Bedingungen exprimieren Gewebe von Säugetieren, insbesondere im Gehirn und in den Testis, hauptsächlich HO-2. Im Kontrast dazu wird unter physiologischen Bedingungen die HO-1 nur in geringen Mengen gebildet.

1.4.6.1. Das Biliverdinsystem

Biliverdin und Bilirubin leisten ebenfalls ihren Beitrag zu den protektiven Effekten der HO-1. Die Evidenz hierfür ist unstrittig⁹⁸⁻¹⁰¹. Es konnte an Ratten in mehreren Versuchen durch exogene Zufuhr von Biliverdin oder Bilirubin positive Effekte auf die Ausprägung und Schwere verschiedener Erkrankungen nachgewiesen werden. Zu diesen Erkrankungen zählen unter anderem Ischämie und Reperfusion, Organabstoßung und systemische Inflammation durch Endotoxine. Außerdem besteht eine umgekehrte Assoziation zwischen erhöhten Plasmabilirubinkonzentrationen und dem Auftreten von Artherosklerose bei Menschen. Insbesondere Patienten mit dem Gilbert-Syndrom, einem Gendefekt. Patienten mit Gilbertsyndrom sind gekennzeichnet durch hohe Spiegel an unkonjugiertem Bilirubin. Diese Patienten sind gegen diverse Erkrankungen geschützt, bei welchen auch in anderen Untersuchungen eine Protektion durch eine erhöhte Expression von HO-1 gezeigt werden konnte. Dies scheint die Vermutung zu belegen, dass Bilirubin ein potentes Antioxidans darstellt, welchem bei bestimmten Erkrankungen, insbesondere bei der Atherosklerose und der systemischen Inflammation zum Beispiel durch Ischämie und Reperfusion eine wichtige Rolle zukommt. Eher überraschend erscheint jedoch, dass die protektiven oder therapeutischen Effekte des Bilirubins und des Biliverdins mit einer geringen Erhöhung des Bilirubinspiegels auf das 2,5 bis dreifache vergesellschaftet ist. Eine wichtige Rolle für die protektiven Effekte des Biliverdin scheint die Biliverdinreduktase zu sein. Dieses Enzym katalysiert die Konversion von Biliverdin zu Bilirubin. Durch die antioxidative Wirkung von Bilirubin werden destruktive Prozesse und durch freies Häm erzeugten oxidativen Stress reduziert. Somit kann die Progression oder das Ausbrechen diverser Erkrankungen verhindert werden¹⁰².

1.4.6.2. Die Rolle des Kohlenstoffmonoxid (CO)

Kohlenstoffmonoxid (CO) ist ein farbloses, geruchsloses Gas, welches mit hoher Affinität an die Hämgruppen diverser Hämoleküle bindet. Als Beispiel sei an dieser Stelle das Hämoglobin genannt. Unter physiologischen Bedingungen stellt CO jedoch ein essentielles Regulatormolekül dar, welches

unter anderem inflammatorische Reaktionen des Organismus reguliert. In verschiedenen Versuchen konnte eine deutliche Verbesserung des Outcome durch CO im Rahmen systemischer inflammatorischer Prozesse gezeigt werden.

In Säugetieren entsteht endogenes Kohlenstoffmonoxid hauptsächlich durch die Degradation von Häm mittels der Hämoxxygenase. In hohen Dosen ist Kohlenstoffmonoxid aufgrund seiner hohen Bindungsaffinität zu Hämoglobin und Myoglobin und der daraus resultierenden Minderversorgung der Gewebe mit Sauerstoff toxisch. Demgegenüber wurden unter CO-Applikation, in erster Linie durch Verbesserung der Mikrozirkulation, auch positive Effekte beobachtet. Es wird gemutmaßt, dass die Signaltransduktionswege von CO ähnlich denen von NO den Stoffwechselweg der gelösten Guanylatcyclase (sGC) – zyklische Guaninmonosphosphat (cGMP) involvieren. In der Tat aktiviert CO die sGC und erhöht den intrazellulären cGMP-Spiegel, führt zur endothelabhängigen Vasodilatation und zur Inhibition der Thrombozytenaggregation¹⁰³. Bei CO-Überproduktion durch HO-1 konnte Wakabayashi zeigen, dass der vaskuläre Widerstand, sowie der Tonus in den Sinusoiden gesenkt wurde, während die Gabe von Oxyhämoglobin, eines CO-Fängers, zu einem signifikanten Anstieg des vaskulären Widerstandes führte¹⁰⁴. Bisherige Daten weisen darauf hin, dass durch CO vermittelte anti-inflammatorische und anti-apoptische Effekte durch eine Modulation des p38-MAPK-Pathway und unabhängig von einer Aktivierung des sGC oder einer cGMP Generierung sind¹⁰⁵ dennoch inhibiert exogenes CO die Expression von pro-inflammatorischen Cytokinen (TNF- α , IL-1, IL-6, MIP-1) und steigert die Expression von IL-10^{106,107}.

In einem Ex-vivo-Modell der Rattenleber konnte gezeigt werden, dass nach einer kalten Ischämiezeit von 2h und einer Reperfusion mit supplementiertem CO eine signifikante Reduktion des portalvenösen Widerstandes und einen Anstieg der Gallenflüssigkeitsproduktion erzielt wurde¹⁰⁸.

Diese günstigen Effekte korrelierten mit einer besseren Leberfunktion und histologisch einem geringeren Leberzellschaden. Die CO vermittelten

zytoprotektiven Effekte waren weder durch die Stickstoffmonoxidsynthase iNOS noch cGMP vermittelt, aber p38-MAPK abhängig.

Durch Zugabe von Zinkprotoporphyrin (ZnPP), ein kompetitiver HO-1 Inhibitor, konnte gezeigt werden, dass durch Zufuhr von exogenem CO derselbe zytoprotektive Effekt bei Ischämie und Reperfusion der Leber erreicht werden kann, wie durch die endogene CO-Produktion.

Andere biologische Funktionen, welche mit CO in Verbindung gebracht werden, wie z.B.: anti-proliferative Effekte werden durch denselben Signaltransduktionsweg vermittelt. Unabhängig von der cGMP moduliert CO das ansprechen von Makrophagen und Monozyten auf bakterielle Lipopolysaccharide, so dass es auch anti-inflammatorisch wirksam ist¹⁰⁶. Weiterhin existieren cGMP-unabhängige zytoprotektive Effekte in vaskulären Endothelzellen, sowie eine Downregulierung der Proliferation von glatten Muskelzellen, welche ebenfalls cGMP unabhängig ist.

Die molekulare Basis für die mannigfaltigen Effekte des CO liegen an seiner Bindung an zweiwertige Metalle, wie z.B. Fe²⁺, welches unter anderem in der Hämgruppe des Hämproteins vorhanden ist¹⁰⁹.

Neben cGMP und Cytochrome C-Oxidase scheint ein Hämprotein ein terminaler Akzeptor der mitochondrialen Elektronentransportkette zu sein. Dies soll zumindest teilweise eine Relevanz für die Effekte von CO haben^{110,111}.

Die Exposition von nativen Makrophagen und Monocyten mit CO führt innerhalb von Sekunden zur mitochondrialen Produktion von Sauerstoffradikalen ROS, welche wiederum verschiedene Signaltransduktionswege, unter anderem der p38 Familie der mitogenaktivierten Proteinkinasen (MAPKs), welche eine zentrale Rolle der verschiedenen anti-inflammatorischen, zytoprotektiven und anti-proliferativen Effekte des CO einnehmen. Wird die ROS-Produktion in Monocyten und Makrophagen inhibiert, so verliert auch CO sein anti-inflammatorisches Potential. Dies legt nahe, dass die anti-inflammatorischen Effekte des CO, welche durch diesen Signaltransduktionsweg vermittelt werden, eine große Bedeutung zukommt^{105,112}.

Einzelheiten dieses Signaltransduktionsweges, welcher eine zentrale Bedeutung zukommt, war bereits Gegenstand zahlreicher Untersuchungen und soll an dieser Stelle nicht weiter ausgeführt werden ^{109,113}.

Ein weiterer Mechanismus, welcher unter Mitwirkung von CO die Pathomechanismen verschiedener Erkrankungen vermindert, stellt die Bindung von CO an das Fe²⁺ Molekül der prosthetischen Gruppe des Häm dar. Dadurch wird eine Oxidation der Hämproteine verhindert und damit die Abgabe von nicht kovalent gebundenem Häm vermindert. Somit kann der oxidative Stress, der durch Bildung von freiem Häm erzeugt wird, reduziert werden und somit die Progression von Erkrankungen letztendlich gesenkt werden ^{114,115}.

1.5. Karbonylierung

Die Karbonylierung stellt einen wichtigen Mechanismus in der Pathophysiologie verschiedenster Erkrankungen dar. An dieser Stelle sind exemplarisch die verminderte muskuläre Kraft bei COPD-Patienten ¹¹⁶, Schäden durch Diabetes mellitus ¹¹⁷, Multiple Sklerose ¹¹⁸, sowie bei chronischen Gefäßerkrankungen ¹¹⁹, chronisches Nierenversagen und Sepsis ¹²⁰ zu nennen.

Chemisch betrachtet findet eine Karbonylierung hauptsächlich an den Aminosäuren Lysin, Argenin, Prolin und Threonin statt. Dabei werden, katalysiert durch Metalle, als Zwischenstufe Peroxide aktiviert. Im Falle von Arginin, Lysin und gegebenenfalls Histidin handelt es sich nicht nur um eine einfache Oxidation, sondern vielmehr müssen mindestens eine oder mehrere Stickstoffatome, ähnlich einer Schiffer-Reaktion, verschoben werden ¹¹⁹. Bei diesen Prozessen werden α,β -ungesättigte Aldehyde, Dialdehyde und Ketoaldehyde unter Verbrauch der ROS an Proteine karbonyliert und führen zu einer Konformationsänderung der Proteine und somit zu einer Einschränkung oder gar zu einem Verlust ihrer Funktion ^{121,122}.

Durch eine Depletion des Gluthathionsystems konnte im Gehirn von Ratten eine erhöhte Karbonylierungsrate der zytoskeletalen Proteine nachgewiesen werden. Eine solche Depletion wird insbesondere mit Erkrankungen wie Morbus

Alzheimer, Morbus Parkinson und Multiple Sklerose in Verbindung gebracht. Durch Zugabe von Lipidperoxidasefängern, wie z.B. Trolox®, Kaffeesäurephenylester (CAPE), und Butylhydroxytoluol (BHT) konnte eine Reduktion der Karbonylierung beobachtet werden ^{118,123,124}.

Den zugrunde liegenden Mechanismen obliegt dasselbe Prinzip. Die betroffenen Zellen werden einem Übermaß an oxidativen Stress, meist durch ROS, ausgesetzt. Neben anderen Proteinmodifikationen spielt die Karbonylierung eine bedeutende, wenn nicht sogar die zentrale Rolle der Zellantwort auf oxidativen Stress und die Induktion von Apoptose ^{119,125}, diese Reaktion scheint irreversibel zu sein und nur den Zweck einer Proteindegradation zu verfolgen ^{126,127}.

1.6. Zielsetzung dieser Arbeit und Fragestellung:

Die Leber stellt eines der zentralen Organe während SIRS und Sepsis dar. Das Hämoxigenasesystem und seine Endprodukte Bilirubin, Fe²⁺ und CO spielen für die Ausprägung der anti-inflammatorischen Prozesse eine zentrale Rolle. Insbesondere der anti-inflammatorische Effekt von CO wurde bereits in zahlreichen Publikationen belegt. Die vorliegende Arbeit klärt die Frage, ob CO seine Wirkung unter anderem über die Superoxiddismutasen erzielt.

Im zweiten Teil der Arbeit wird die Rolle der Mangansuperoxiddismutase in diesem Zusammenhang untersucht und verifiziert, ob eine Karbonylierung die Aktivität des Enzyms beeinflusst.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Versuchstiere

Mäuse sind derzeit die in der Forschung am häufigsten eingesetzte Spezies^{128,129}. In dieser Arbeit wurden als Tiermodell männliche C57BL6 – Mäuse verwendet. Dieser Inzuchtstamm gehört zu den am meisten verwendeten¹³⁰. Die Versuchstiere waren zwischen 4 und 6 Wochen alt, mit einem Gewicht zwischen 23 und 27 Gramm. Die Tiere wurden von der Firma Harlan Winkelmann (Borchen, Deutschland) bezogen. Die Haltung der Tiere erfolgte nach den aktuellen Richtlinien der Veterinärämter unter kontrollierten Bedingungen (22°C, 55% Luftfeuchtigkeit und einem 12 Stunden Tag- und Nachtrhythmus. Der freie Zugang zu Wasser und standardisierter Labornahrung, sowie Rückzugsmöglichkeiten waren gewährleistet.

2.1.1.1. *Physiologische Werte der Maus*

Die physiologischen Parameter der Maus differieren stark in der Literatur, insbesondere zwischen Werten der anästhesierten und der wachen Tiere^{129,131}. Gründe für diese Vielfalt werden in der genetischen Vielfalt¹³² und dem zirkadianen Rhythmus gesehen¹³³.

Das durchschnittliche Gewicht beträgt bei der erwachsenen männlichen Maus zwischen 20 – 40g¹³⁴. Sie erreichen ein durchschnittliches Lebensalter von 12 bis 36 Monaten.

Die empfohlene Umgebungstemperatur für Mäuse liegt zwischen 24-25 °C. Mäuse reagieren sehr empfindlich auf Veränderungen der Umgebungsbedingungen¹³⁴.

Die Herzfrequenz der Maus liegt zwischen 310 – 840 Schläge/Minute¹³⁵. Der mittlere arterielle Blutdruck liegt bei 89 +/- 0,6¹²⁹. Die Atemfrequenz der Maus wurde von Wiersemann et al. unter Isoflurannarkose mit 100 +/-0,9 /Minute

beschrieben ¹³⁶.

Insgesamt sind die Vitalparameter bei der Maus sehr variabel und von verschiedensten Faktoren abhängig.

2.1.2. Reagenzien

Nachfolgend werden die verwendeten Reagenzien und Puffer, sowie deren Zusammensetzung beschrieben.

| Reagenz | Hersteller |
|-----------------|--|
| Isoflurane | Fa. Abbott |
| Oxyblot | Fa. Millepore |
| CRMP | Porphyrin Products Inc., Logan, Utah, US |
| Hämin | Porphyrin Products Inc., Logan, Utah, US |
| Methylenchlorid | Sigma Chemical Co., Taufkirchen, Germany |
| CO | Air Liquide, Krefeld, Germany |

Tabelle 2: Verwendete Reagenzien

| Reagenz | Dosierung |
|---|-----------|
| purifiziertes Wasser (ddH ₂ O) | 500ml |
| Natriumchlorid | 8.3g |
| Kaliumchlorid | 0.5g |
| HEPES-Puffer | 2.4g |

Adjustiert bei einem pH von 7.4

Adjustierung des Volume zu 1 Liter mit ddH₂O gelagert bei 4°C

Tabelle 3: Verwendeter Perfussionspuffer

| Reagenz | Dosierung |
|------------------------|-----------|
| ddH ₂ O | 500ml |
| Natriumchlorid | 3.9g |
| Kaliumchlorid | 0.5g |
| HEPES-Puffer | 24g |
| Kalziumchloriddihydrat | 0.7g |

Adjustierung des pH bei 7.6

Adjustierung des Volumen zu 1 Liter mit ddH₂O gelagert bei 4°C

Liberase Blendzyme 3 (23 µg/ml)

Rekonstitution mit 10 ml Digestions Puffer (auf Eis gelagert für 10 min.)

Erstellung von Aliquots mit 214 µl, welche in 65 ml 37°C warmem Digestionspuffer eingebracht werden.

Tabelle 4: Verwendeter Digestionspuffer

| Reagenz | Dosierung |
|-------------------------------|-----------|
| ddH ₂ O | 500ml |
| Natriumchlorid | 4.0g |
| Kaliumchlorid | 0.4g |
| HEPES | 7.2g |
| Calcium Chloride Dihydrate | 0.18g |
| Potassium Phosphate Monobasic | 0.15g |
| Sodium Sulfate | 0.1g |
| Magnesium Chlorid Hexahydrat | 0.13g |
| TRICIN | 6.5g |
| TES | 6.9g |
| Natriumhydroxid | 2.1g |

Adjustierung bei einem pH von 7.4

Adjustierung des Volume zu 1 Liter mit ddH₂O Store at 4°C

Tabelle 5: Verwendeter Suspensions Puffer

| Reagenz | Dosierung |
|------------------------------------|-----------|
| Aprotinin | 10µl |
| Leupeptin | 10µl |
| Pepstatin | 20 µl |
| Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) | 287 µl |

wurden auf 1 ml mit 100% EtOH aufgefüllt und in Teilproben à 100 µl verteilt.

Tabelle 6: Verwendeter Proteaseinhibitor Cocktail (2.4 µl/250 µl sample)

2.2. Versuchsablauf

Die Mäuse wurden randomisiert und einer Versuchsgruppe zugeordnet (siehe Tabelle 7). Im Anschluss wurden die Tiere gewogen. Nach 2 Stunden Akklimatisierung erfolgte die Narkoseinduktion.

| Gruppe | Sham | I/R | | | | | |
|--------|------|-----|----|------|--------------|-----|----|
| | | | CO | CRMP | CO + CRMP | Häm | MC |
| n | 6 | 5 | 5 | 4 | 5 | 5 | 4 |

Tabelle 7: Aufteilung der randomisierten Versuchstiere auf die verschiedenen Versuchsgruppen

2.2.1. Narkoseführung

Die Narkoseinduktion erfolgte inhalativ mit 1,0 Vol% Isoflurane über einen Nasentrichter. Zur Aufrechterhaltung der Narkose wurde 0,7 Vol% Isoflurane in einem Luft/Sauerstoffgemisch (FiO₂ 30%) inhalativ appliziert.

2.2.2. Instrumentierung

Nach Testung der ausreichenden Narkosetiefe wurde die rechte Arteria carotis interna freipräpariert und nach Schnittinzision ein Katheter eingeführt¹³⁷. Der Arterielle Zugang wurde zur kontinuierlichen invasiven Blutdruckmessung, als auch zur Infusion von 0,4 ml/h 0,9%iger Kochsalzlösung zur Aufrechterhaltung eines normotensiven Blutdruckes verwendet.

2.2.3. Ischämie/Reperfusion

Die Oberschenkel der Hinterläufe wurden rasiert und auf Höhe des Trochanter major beidseits abgebunden. Die Ischämie wurde unter Aufrechterhaltung der Inhalationsnarkose für eine Stunde beibehalten. Nach einer Stunde wurden die Ligaturen entfernt und die Narkose beendet. Die Versuchstiere wurden unter Erhalt von Normothermie zurück in den Käfig gesetzt. Zur Aufrechterhaltung von Normovolämie wurde Natriumchloridlösung mit einer Infusionsrate von 0,1 ml/h verabreicht. Den Versuchstieren wurde während der dreistündigen

Reperusionsphase der freie Zugang zu Wasser und standardisierter Labornahrung, sowie Rückzugsmöglichkeiten ermöglicht.

Gemäß der anfangs durchgeführten Randomisierung (siehe Kap. 2.2) wurde direkt zu Beginn der Reperusionsphase der einen Gruppe Chrommesoporphyrin (CrMP), ein kompetitiver Inhibitor der HO-Aktivität in einer Dosierung von 2,5µmol/kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Einer anderen Gruppe wurde ebenfalls direkt zu Beginn der Reperusionsphase Hämin, ein Stimulator der HO-Induktion in einer Dosis von 10mg/kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert.

Einer weiteren Gruppe von Versuchstieren wurde zur Induktion der CO-Bildung in der Leber Methylenchlorid (MC) in einer Konzentration von 5,8 µmol/kg Körpergewicht per os zum Beginn der bilateralen Ischämie appliziert. Methylenchlorid wird durch Cytochrome P-450 2E1 und Glutathion (GSH) in der Leber zu CO metabolisiert.

Eine weitere Gruppe der I/R-Versuchstiere wurde während der Reperusionsphase inhalativ CO zugeführt. Um dies zu erreichen, wurden die Versuchstiere während der gesamten Reperusionsphase in einer luftdicht verschlossenen Kunststoffkammer kontinuierlich einem Luft/Gas-Gemisch mit einem Zusatz von CO (250ppm) exponiert. Die CO-Konzentration wurde kontinuierlich durch einen CO-Analysator überwacht. Andere Versuchsgruppen beinhalteten gleichzeitig verschiedene Versuchsschritte (Siehe Tabelle 7).

2.3. Methoden

2.3.1. Hemmung der Hämoxygenase

Zur kompetitiven Hemmung der Hämoxygenase wurde den Versuchstieren der zugehörigen Gruppe eine, unter Lichtabschluss frisch zubereitete, Zinkprotoporphyrinlösung in einer Dosierung von 2.5µmol/kg Körpergewicht in die peritoneale Bauchhöhle injiziert.

2.3.2. In-vivo Fluoreszenzmikroskopie

Nach erneuter inhalativer Narkoseinduktion erfolgte eine rechtseitige Oberbauchlaparotomie, sowie die Mobilisierung der Leber. Die Versuchstiere wurden so auf dem Durchlichtmikroskop gelagert, dass der rechte Leberlappen in einer warmen Kochsalzlösung zum Liegen kam. Zur Verhinderung von Austrocknung wurde die Leber mit einer Klarsichtfolie bedeckt ¹³⁸.

Dihydrorhodamin 123 wird in Kapitel 4.3 beschrieben. Zur in vivo Quantifizierung kam das von Wood et al. beschriebene Verfahren zur Anwendung ¹³⁹. Gemäß dem Protokoll wurde zu Beginn der Reperfusionsphase DHR (1mg/100mg KG, i.v.) injiziert. Die Analyse der Bildung von ROS via DHR-123-Fluoreszenz erfolgte offline per frame-by-frame Analyse unter Verwendung von Meta Imaging Series Software (Vers.6.1; Universal Imaging Corp., Downington, PA, USA). Gain, Schwarzpunkt und Verstärkung waren bei allen Versuchen identisch.

Im Anschluss an die Mikroskopie wurden die Tiere exsanguiniert und nach Genickbruch in tiefer Narkose wurde den Versuchstieren die Leber und Blutproben entnommen und zur weiteren Verarbeitung kryokonserviert.

2.3.3. Separierung der parenchymalen von den mikrovaskulären Zellen

2.3.3.1. Verfahren nach Seglen

Die Separierung der Parenchymzellen erfolgte in Anlehnung an die Zwei-Schritt Methode nach Seglen ¹⁴⁰.

Die Vena portae wurde mit einer „Introcan Safty“ Venenverweilkanüle 18G der Firma Braun kanüliert und mit circa 30ml isotonischer Kochsalzlösung mit einer Flussrate von 10ml/min gespült, um die verbleibenden Blutbestandteile auszuwaschen. Im Anschluss wurden sie bei 37°C mit circa 60 ml bei einer Flussrate von 10ml/min Perfusionspuffer perfundiert und in einem weiteren

Schritt dann ebenfalls mit 60ml Digestionspuffer unter Zusatz von Liberase bei gleicher Flussrate und Temperatur perfundiert.

Die Leber wurde explantiert und mit circa 5ml eiskalter Suspensionspuffer in eine Suspension überführt, indem die Gewebestücke fragmentiert und durch ein Nylonnetz (Maschengröße 100 μm) gefiltert wurden. Der Filter wurde mit 10ml eiskaltem Suspensionspuffer nachgespült, so dass das entstehende Suspensionsvolumen 15 ml betrug.

Das Filtrat wurde in 15ml konischen Eppendorf-Cups bei 50g drei Minuten zentrifugiert. Der Überstand enthielt danach die vaskulären Zellen, während sich die parenchymalen Zellen im Zentrifugat befanden.

2.3.3.2. Separierung der parenchymalen Zellen

Die parenchymale Zellfraktion wurde in eiskaltem Suspensionspuffer resuspendiert und erneut bei 50g für 3min zentrifugiert. Im Anschluss wurde das Zentrifugat in 500ml eiskaltem Suspensionspuffer unter Zugabe von Proteaseinhibitor-Cocktail resuspendiert. Die Suspension wurde in einen Microfugtube transferiert und mit flüssigen Stickstoff bei -80°C kryokonserviert.

2.3.3.3. Separierung der mikrovaskulären Zellen

Der Überstand, welcher die vaskulären Zellen beinhaltet wurde bei 600g und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert. Das Zentrifugat wurde in 250ml eiskaltem Suspensionspuffer resuspendiert und Proteaseinhibitor-Cocktail hinzugegeben. Die Suspension wurde in einen Microfugtube transferiert und in flüssigem Stickstoff bei -80°C kryokonserviert.

Zur Weiterverarbeitung wurden die Zellen mit Hilfe eines Sonicators (Anwendung von Ultraschall) auf Eis homogenisiert und im Anschluss bei 5000 RPM für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde asserviert und bei -80°C in flüssigem Stickstoff kryokonserviert.

2.3.4. Laborchemische Parameter

Blutproben wurden durch Punktion des linken Ventrikels gewonnen. Die Alaninaminotransferase (ALT) wurde nach standardisiertem enzymatischem Verfahren bei 37°C im Zentrallabor bestimmt.

2.3.5. Quantitative Analyse der Sauerstoffradikale

Zur Bestimmung der ROS wurde das modifizierte Verfahren von Emmendorffer angewendet¹⁴¹. Hierbei wurde den Versuchstieren DHR injiziert.

DHR wird durch intrazelluläre und extrazelluläre Oxidantien, wie beispielsweise Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Superoxidanionen ($O_2^{\cdot-}$) und Hydroxylradikale (OH^{\cdot}) zu fluoreszierendem Rhodamin 123 oxidiert. Aufgrund seiner Bindung an die innere Membran von Mitochondrien stellt durch die Oxidation von DHR-123 entstandenes Rhodamin-123 in Zellen eine stabile Verbindung dar¹⁴². DHR-123 wird wie zum Beispiel auch 2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein (DCFH₂), einer anderen fluoreszierenden Substanz, durch ROS langsam oxidiert. Im Vergleich zu anderen durch Oxidation fluoreszierende Substanzen zeigt DHR-123 jedoch eine höhere Reaktivität mit Carbonatradikale ($CO_3^{\cdot-}$) und Stickstoffmonoxid (NO^{\cdot}), welche hauptsächlich während oxidativem Stress gebildet werden¹⁴³.

DHR-Fluoreszenz und somit ROS-Formationen sind in der gesamten Leber, sowohl parenchymal, sinusoidal als auch in den Kupferzellen nachweisbar. Eine leichte Oxidation der DHR war in allen Versuchsgruppen nachweisbar.

2.3.6. Quantifizierung der Fettsäureoxidation durch Bestimmung der Malondealdehyde

Das Ausmaß der Lipidperoxidation wurde nach der Methode von Buege und Aust unter Bestimmung des Gehaltes der Thiobarbituratsäure reaktiven Substanz (TBARS) der Leber^{144,145} ermittelt. Malondialdehyd (MDA) stellt ein Endprodukt des peroxidativen Abbaus von polyionischen Fettsäuren dar. Das Ergebnis wurde in nmol MDA/100 mg Lebergewebe ausgedrückt. Es wurden 3 Messungen durchgeführt und daraus der Durchschnittswert gebildet.

2.3.7. Bestimmung von GSH und GSSG

Der Glutathiongehalt der Leber wurde getrennt für das Gesamtglutathion (GSH) als auch für die Glutathiondisulfide (GSSG) im Leberhomogenisat bestimmt. Hierzu wurde eine modifizierte Methode nach Tietze angewandt ¹⁴⁶. Ein Aliquot des Leberhomogenates wurde zu 10 mM in Kaliumphosphatpuffer (KPP) gelöstem tN-Ethylmaleinimid (NEM) hinzugefügt, ein anderes Aliquot wurde zu 0.01 N Salzsäure hinzugegeben. Die NEM-KPP Probe wurde zentrifugiert und der Überstand durch einen C₁₈ Filter gelassen, um freie NEM und NEM-GSH Addukte zu gewinnen (Sep-Pak; Waters, Milford, MA, USA). Die HCL-Probe wurde zentrifugiert und der Überstand mit KPP verdünnt. Alle Proben wurden in dreifacher Ausführung bei 412 nm unter Verwendung von 5,5'-Dithiobis-2-Nitrobenzoesäure detektiert. Alle Daten wurden in GSH-Äquivalenten dargestellt.

2.3.8. Bestimmung der MnSOD

Sowohl in den parenchymalen, als auch in den nicht parenchymalen Zellen wurde die MnSOD nachgewiesen. In einem ersten Schritt wurde via Westernblot mit Hilfe des polyklonalen anti-MnSOD-Antikörpers (Upstate, Biotechnology; 1:1000) die MnSOD quantitativ bestimmt. Die verwendeten Membranen wurden dreimal gewaschen. Die immunreaktiven Proteine wurden im Anschluss mit Hilfe eines Horseradish Peroxydase-konjugierten sekundären Antikörper detektiert und um eine Chemoillumineszenz erweitert.

In einem weiteren Schritt wurde die enzymatische Aktivität der MnSOD gemessen. Hierzu kam das von McCord beschriebene Verfahren zur Anwendung ¹⁴⁷. Hierbei wurden sowohl die hepatischen parenchymalen, als auch die nicht parenchymalen Zellen zuerst vollständig in Lösung gebracht. Im nächsten Schritt mittels der Cytochrom C Reduktionsmethode in Anwesenheit von 2nMol Kaliumcyanid extrahiert. Durch die Anwesenheit von Kaliumcyanid wurde die CuZnSOD und extrazelluläre SOD inhibiert. Im nächsten Schritt wurde dann die Aktivität der MnSOD in nativem Aktivgel gemessen.

2.3.9. Quantifizierung der Karbonylierung

Zum Nachweis der Karbonylierung wurde ein Oxyblot-Kit verwendet (OxyBlot; Chemicon).

Es wurden jeweils 5ml jedes Testlysates auf 2 Tubes mit jeweils insgesamt 35µg transferiert. Anschließend wurden in jeden Tube 5ml SDS 12% hinzugefügt und danach 10ml DNPH-Lösung dem einen Tube und 10ml der Negativ-Kontrolle dem zweiten Tube hinzugefügt. Im Anschluss erfolgte die Inkubation für 15 Minuten. Es erfolgte die Zugabe von 7,5ml der Neutralisationslösung.

Die Samples wurden mit 4-12% TRIS-Gel bestückt und DNP-derivatisierte molekular Gewichtstandards wurden ebenfalls auf das Gel geladen. Die SDS-Page wurde gestartet.

Anschließend wurden die Proteine vom Gel auf die Immobilon® PVDF-Membran transferiert. Die Membranen wurden in Blockerpuffer unter Bewegung für eine Stunde inkubiert. Danach wurde der primäre Antikörper in einer Verdünnung von 1:150 mit Blockerpuffer hinzugefügt. Anschließend erfolgte eine einstündige Inkubation unter permanenter Bewegung. Danach wurden die Membranen mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS-T) gewaschen.

Der sekundäre Antikörper wurde verdünnt mit Blockerpuffer im Verhältnis 1:300 hinzugeführt und anschließend unter permanenter Bewegung für eine Stunde inkubiert. Die Membran wurde erneut mit PBS-T gewaschen. Danach wurde der Grad der Karbonylierung mit Chemilumineszenz-Reagenz detektiert.

2.3.10. Messung der HO-Aktivität

Zum Nachweis der Hämoxygenaseaktivität in den Mikrosomen der Leber wurde die von Trakshel beschriebene Methode verwendet ¹⁴⁸. Die aus dem Lebergewebe gewonnenen Mikrosomen wurden mit Lebercytosol der Maus als Ausgangssubstanz der Biliverdinreduktase zu einem Reaktionsgemisch vermengt. Die Bilirubinkonzentration wurde als Differenz des Absorptionsgrades bei 470 nm und 530 nm ermittelt.

2.4. Graphische Darstellung und Statistik

Alle Graphen wurden mit den Programmen Excel (Microsoft) oder IBM SPSS Statistics (IBM) erstellt.

Zur Berechnung von Signifikanzen wurde der Mann-Whitney-Test verwendet. Bei $p < 0,05$ wurden die Unterschiede als signifikant angesehen (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$).

3. Ergebnisse

3.1. Oxidativer Stress:

Zur Bestimmung des oxidativen Stresses der verschiedenen Gruppen wurden die freien Radikale mittels DHR-Fluoreszenz bestimmt. Um das Ausmaß der Zellschädigung zu quantifizieren wurde Malonaldehyd bestimmt. Malonaldehyd ist ein Aldehyd, welches durch oxidative Schädigung durch Fettsäureoxidation entsteht. Zur Bestimmung der intrazellulären Abwehrfähigkeit wurde das Gluthationperoxidasesystem genutzt. Für die Reaktion mit ROS wirkt Gluthation als Cosubstrat und wird in Gluthationdisulfid umgewandelt. Ein Überangebot kann den Schaden durch Ischämie/Reperfusion nicht minimieren, jedoch wurde durch I/R eine Verminderung des Gluthationsystems beobachtet¹⁴⁹.

3.1.1. Intravitalmikroskopie

Zur Bestimmung des oxidativen Stresses wurde im Intravitalmikroskop die DHR-Fluoreszenz bestimmt. Hierbei zeigte sich eine signifikant erhöhte Fluoreszenz bei den I/R-Tieren. Durch Zugabe von CrMP, womit die Hämoxygenase kompetitiv gehemmt wurde, wurde der oxidative Stress nochmals erhöht. Dies konnte auch in der DHR-Fluoreszenz nachgewiesen werden. Durch Inhalation von CO oder Injektion von MC konnte der oxidative Stress auf das Niveau von Sham gesenkt werden. Durch Inhalation bzw. Zugabe von MC ohne I/R konnte jedoch keine weitere Senkung des oxidativen Stresses erreicht werden.

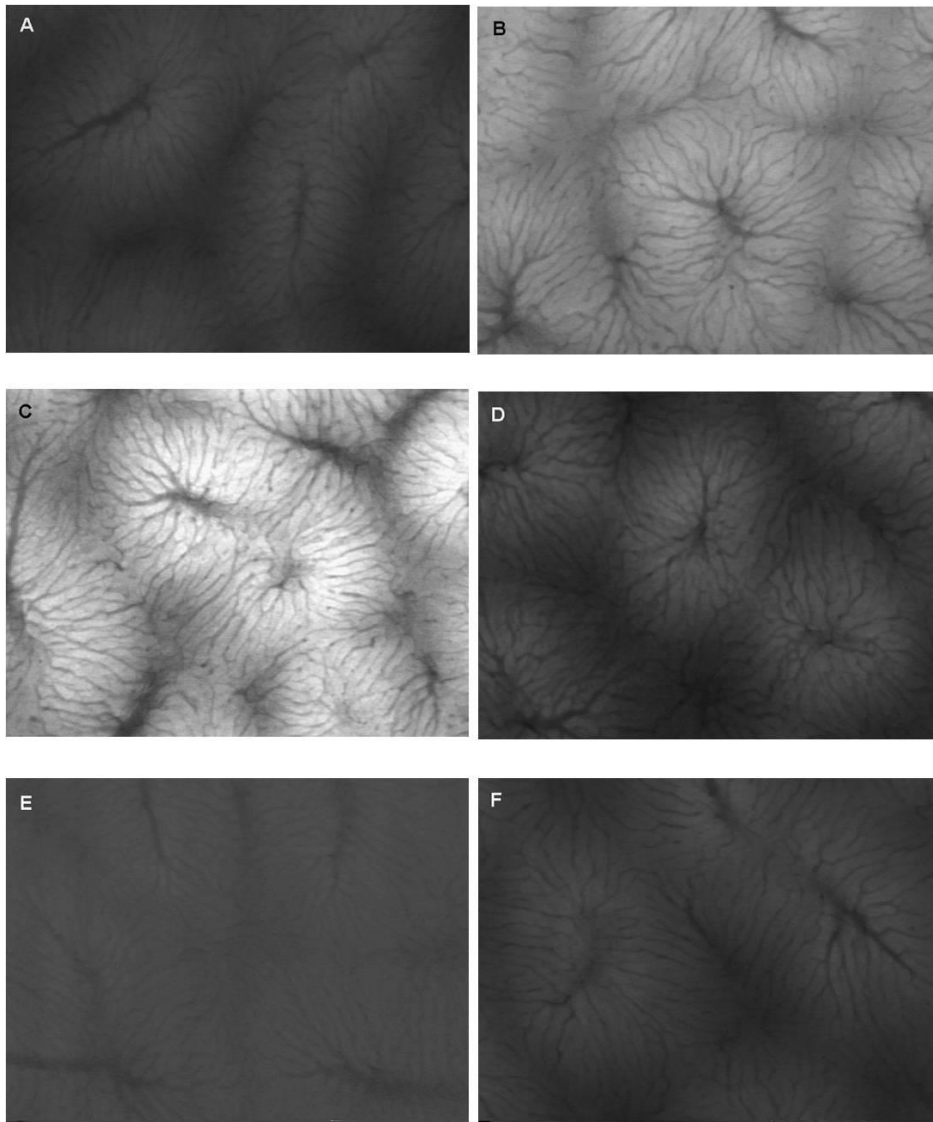


Abbildung 2: Intravitalmikroskopische Visualisierung der DHR Fluoreszenz.

A= Sham; B= I/R; C=I/R + CrMP; D=I/R + Häm; E= I/R + CO; F= I/R + MC

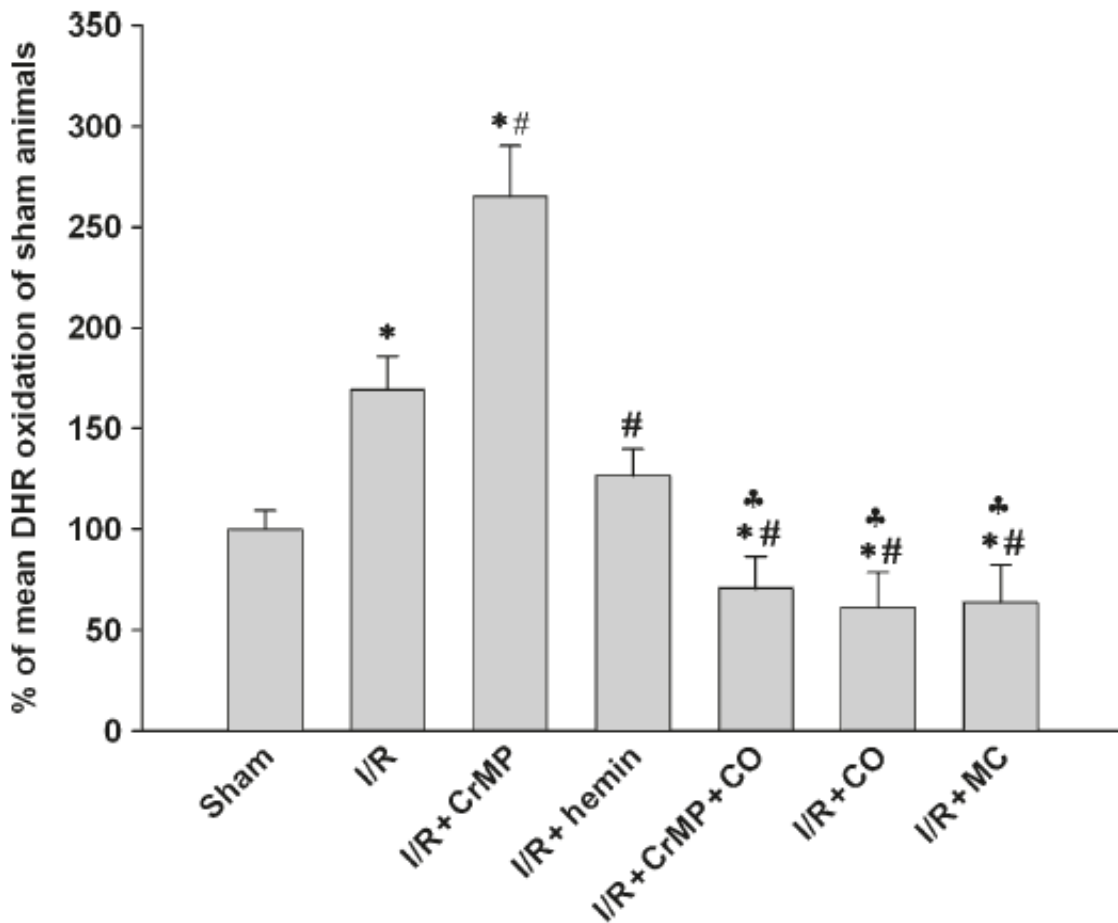


Abbildung 3: Darstellung der Quantifizierten DHR-Fluoreszenz:

DHR-123 Fluoreszenz wurde genutzt, um ROS-Formationen zum einen zu visualisieren (Abbildung 2), als auch zu Quantifizieren (Abbildung 3). Die DHR-Fluoreszenzwerte wurden gemittelt und als relative Veränderung der Intensität zur Signalstärke der Sham-Mäuse. Sham-Mäuse zeigten eine schwache Grundfluoreszenz (IA), eine deutliche Zunahme der DHR-Fluoreszenz wurde bei I/R-Tieren (Ib)detektiert. Die stärkste Fluoreszenz wurde durch additive Zugabe von CrMP erreicht. Durch Inhalation von CO (I e) bzw. Applikation von MC (I f) wurden Fluoreszenzwerte unterhalb der Sham-Tiere gemessen. Die Daten zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung. * vs. Sham ($p < 0.01$); # vs. I/R ($p < 0.02$).

3.1.2. Fettsäureoxidation

Einer der ältesten bekannten Mechanismen des Zellschadens durch ROS besteht in der Oxidation von Lipiden der Zellmembran. Elektronenklau von Lipiden in der Zellmembran und dadurch Zellschädigung. Die Kombination von oxidativem Stress, Eisen und eine Verminderung von antioxidativen Substanzen ist notwendig, um einen Zellschaden bei Hepatozyten zu bewirken. Zur Bestimmung des Zellschadens wurde Malonaldehyd bestimmt. Es zeigte sich eine signifikante Erhöhung der MDA im Vergleich zum Sham-Niveau ($p < 0.01$). Durch kompetitive Hemmung des Hämoxigenasesystems mit CrMP

kam es zu einem weiteren Anstieg der Lipidsäureoxidation. Durch die Zugabe von Häm konnte eine Reduktion der MDA auf Sham-Niveau beobachtet werden. Durch Inhalation von CO oder MC via Injektion wurde ebenfalls eine Reduktion auf Sham-Niveau erzielt ($p < 0.03$).

Figure 3

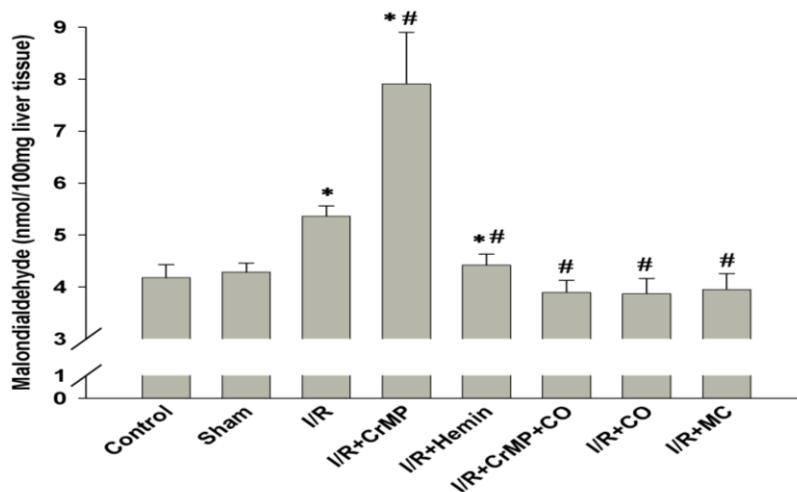


Abbildung 4: Ischämie/Reperfusion der Hinterläufe resultiert in einem signifikanten Anstieg der Fettsäureperoxidation verglichen mit der Kontroll-, als auch der Sham-Gruppe. Zusätzliche Inhalation von CO oder der Applikation von MC bei Tieren der Ischämie-/Reperfusionen-Gruppen ergab keinen signifikanten Unterschied der MDA-Spiegel. Die gezeigten Daten zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung. * vs. Sham ($p < 0.01$); # vs. I/R ($p < 0.02$).

Um die Kompensationsmechanismen des Organismus zu eruieren wurde das Verhältnis von Gluthation zu Gluthationdisulfid bestimmt. Die Gluthationperoxidase katalysiert die Reaktion von Peroxiden zu Wasser. Dabei wirkt reduziertes Gluthation als Elektronendonator und wird zu Gluthationdisulfid oxidiert.

Bei der absoluten Menge an GSH und GSSG konnte eine signifikante Reduktion der I/R-Tiere gegenüber den Sham-Tieren gezeigt werden ($p < 0.01$). Durch Zugabe von Häm zeigte sich eine signifikant geringere Reduktion von GSH/GSSG. Durch Applikation von CO/MC konnte eine Regeneration auf Sham-Niveau erreicht werden ($p < 0.03$). Vergleicht man die Veränderung durch die Zugabe von Häm mit den Effekten durch CO/MC so zeigt sich eine signifikant geringere GSH/GSSG Menge bei der Häm-Gruppe ($p < 0.04$).

Betrachtet man die GSSG als absolute Zahl und als Indikator des oxidierten GSH und somit als Nachweis von oxidativem Stress, so konnte gezeigt werden, dass durch I/R eine signifikante Erhöhung der GSSG erreicht wurde. Durch Zugabe von CRMP ergaben sich die höchsten GSSG-Spiegel ($p < 0.01$). Durch Applikation von Häm wurde eine signifikant geringere GSSG-Konzentration gemessen ($p < 0.03$). Im Vergleich hierzu war in der CO und der MC Gruppe die GSSG-Konzentration nochmals signifikant erniedrigt ($p < 0.04$).

Zusammenfassend zeigt sich durch I/R eine signifikante Erniedrigung des GSH/GSSG Systems. Diese Effekte können durch Häm teilweise und durch die Applikation von CO vollständig aufgehoben werden. Die reduzierte Menge an GSH/GSSG steht im Gegensatz zur relativen Erhöhung der GSSG. Dies ist ein Ausdruck des oxidativen Stresses.

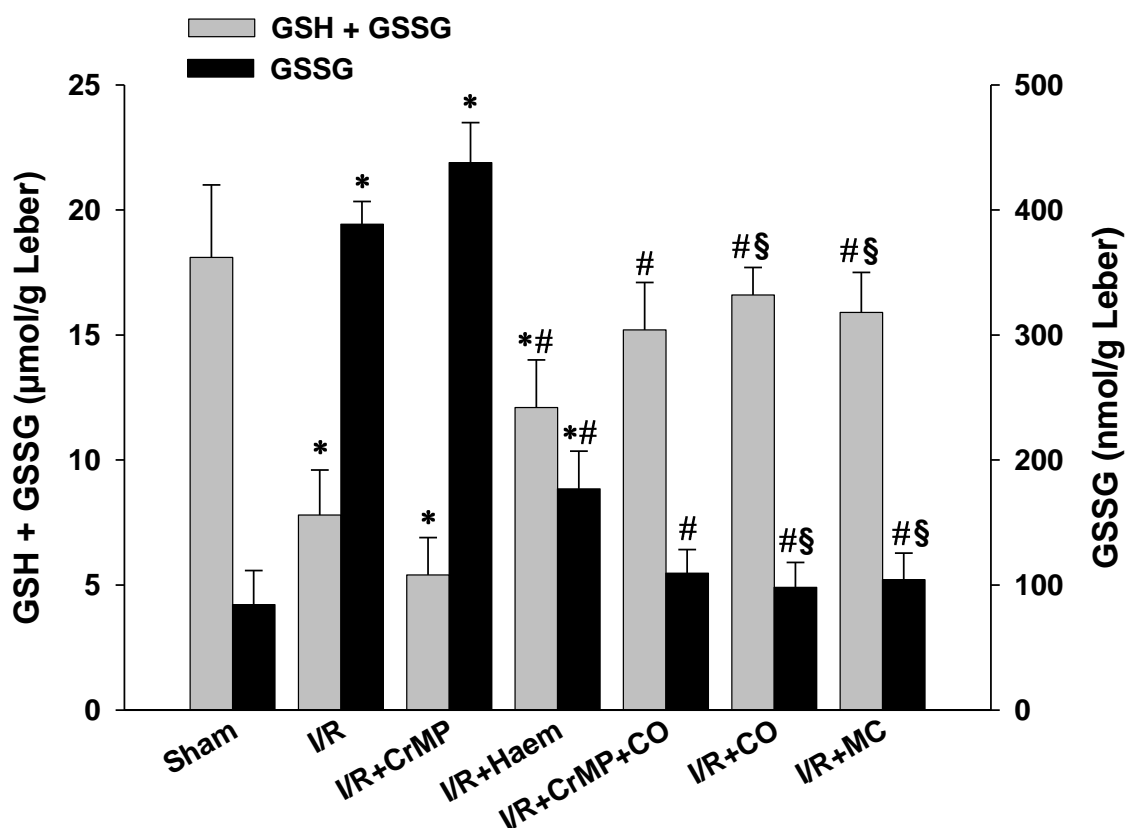


Abbildung 5: Ischämie/Reperfusion führt zu einer signifikanten Reduktion des hepatischen Gesamtmenge an GSH+GSSG und zu einem signifikanten Anstieg von GSSG im Vergleich zu den Sham-Tieren.

Durch zusätzliche Inhalation von CO oder der Applikation von MC zeigte sich in diesen Gruppe ein GSH und GSSG Menge wie bei den Sham-Tieren. Diese waren auch signifikant unterschiedlich zu den Werten der Ischämie/Reperfusiongruppe mit zusätzlicher Applikation von Hämin. Die Daten zeigen den Mittelwert mit Standardabweichung. *vs. Sham-Tiere (p<0.02); # vs. I/R (p<0.02); § vs. I/R+Hämin (p<0.03).

3.2. MnSOD

Zur Untersuchung der MnSOD wurden die Zellen nach dem modifizierten Verfahren nach Seglen zu erst in parenchymale und nicht parenchymale Zellen getrennt. Somit ist es möglich die sinusoidalen Endothelzellen separat zu untersuchen.

In einem nächsten Schritt wurde separat für die parenchymalen Zellen die Aktivität bestimmt. Es konnten keine signifikante Veränderungen der MnSOD-Aktivitäten zwischen den Sham und den I/R-Gruppen nachgewiesen werden.

Im Gegensatz dazu zeigte sich bei den sinusoidalen Endothelzellen eine signifikante Reduktion der MnSOD-Aktivität bei den I/R-Tieren. Durch Applikation von CO/MC konnte eine Erholung der MnSOD-Aktivität auf Sham-Niveau erreicht werden. Interessanterweise zeigte sich in den Kontrollgruppen der Sham-Tiere, welche auch eine CO-Applikation erhalten haben, keine Veränderung gegenüber Sham- und I/R+CO-Tieren.

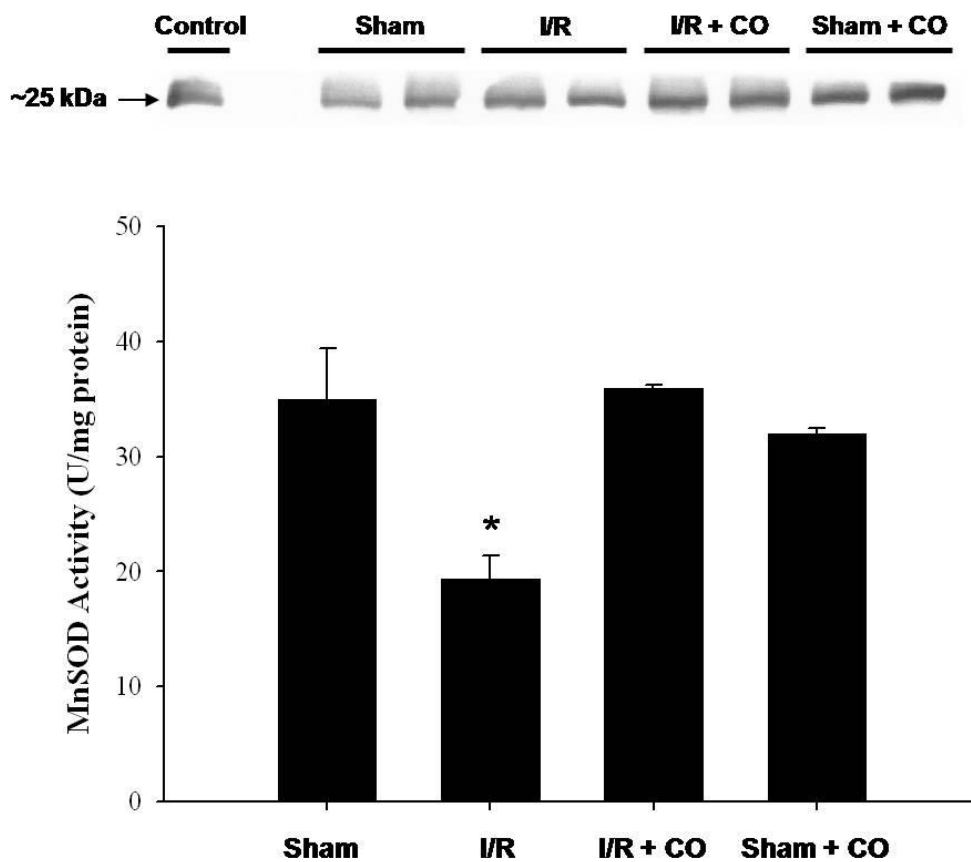


Abbildung 6 Darstellung der MnSOD Aktivität. Unter Applikation von CO zeigt sich eine Erholung der MnSOD Aktivität auf Sham-Niveau

3.3. Karbonylierung

In einem weiteren Schritt wurde mittels Oxyblot die Karbonylierungsrate der MnSOD bestimmt.

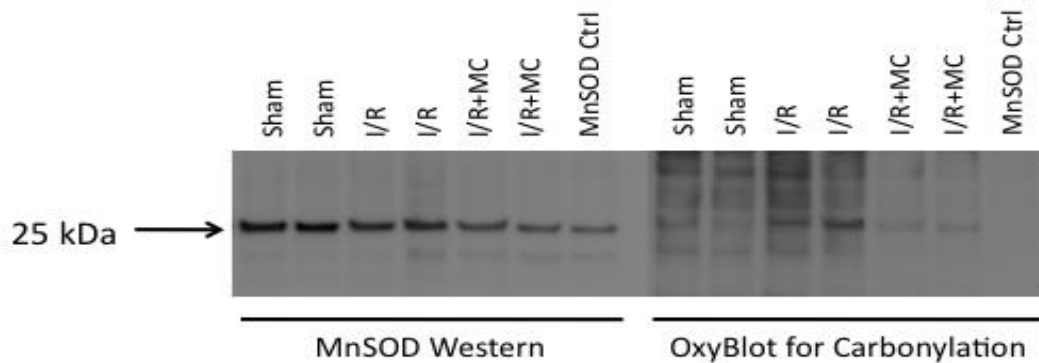


Abbildung 7 Darstellung der Karbonylierung.

Es zeigte sich eine signifikant höhere Karbonylierung bei den I/R-Gruppen. Um die Unterschiede der MnSOD-Menge zwischen den verschiedenen Gruppen zu vermindern wurde das Verhältnis von karbonyliertem zur Gesamtmenge der MnSOD bestimmt. So zeigte sich eine deutliche Verschiebung zur karbonylierten MnSOD bei den I/R-Tieren. Durch die Inhalation von CO oder die Infusion von MC konnte das gleiche Verhältnis von karbonyliertem MnSOD zur Gesamtmenge an MnSOD gemessen werden wie bei der Sham-Gruppe.

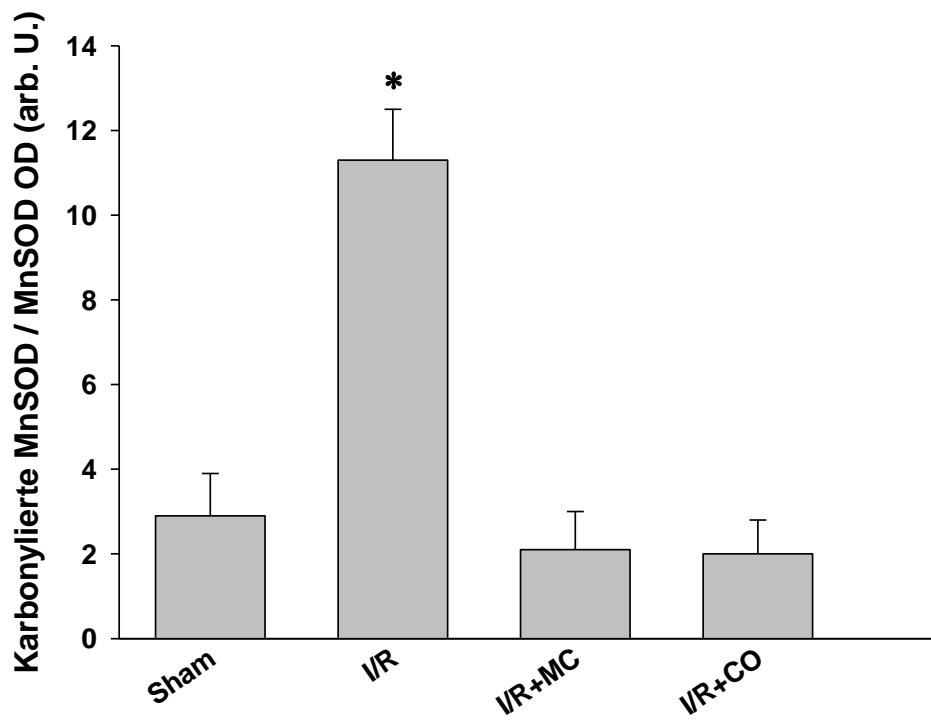


Abbildung 8 Verhältnis der Karboxylierten zur gesamten MnSOD

4. Diskussion

Die Leber stellt eines der zentralen Organe in der Immunantwort des Organismus in der systemischen Inflammation dar. Tritt ein Leberversagen auf, so verschlechtert sich die Prognose insbesondere des Intensivpatienten dramatisch ¹⁵⁰.

Reaktive Sauerstoffmetabolite stellen für die Pathophysiologie der inflammatorischen Leberdysfunktion wichtige Zytotoxine als auch Signalmediatoren dar. Vielfältige zelluläre und molekulare Ursachen gelten als ursächlich für die Bildung von ROS im Rahmen der systemischen Inflammation. Neben Kupferzellen, Neutrophilen Granulozyten, Hepatozyten, Endothelzellen und Mitochondrien gelten die Xanthinoxidase, NAD(P)H-Oxidase und die Myeloperoxidase als ursächlich ^{42,43,151-153}.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle der Mangansuperoxiddismutase in der Antwort der Zelle auf eine systemische Inflammation untersucht. Von besonderem Interesse waren in diesem Zusammenhang die unterschiedlichen Antworten auf eine systemische Inflammation der Endothelzellen der Leber. Die LSEC nehmen eine wichtige Rolle in der Abwehr der systemischen Inflammation der Leber ein und ihre Antworten unterscheiden sich von den anderen Zelltypen der Leber. Die Rolle der Kupferzellen als gewebständige Makrophagen und Sauerstoffradikalbilder zur Phagozytose, so wie deren protektive Effekte waren Gegenstand vieler Arbeiten und wurden in der vorliegenden Arbeit nicht näher untersucht ^{31,34,154,155}.

4.1. Ischämie-Reperfusions-Modell

Das in dieser Arbeit verwendete normotensive Mausmodell der frühen systemischen Inflammation durch Ischämie/Reperfusion ist etabliert und wurde schon in zahlreichen Versuchen angewandt ^{34,156-158}. Das verwendete Ischämie/Reperfusionsmodell durch Torniquets der Hinterläufe zeigt einen zum SIRS vergleichbaren Verlauf ^{137,156,159}.

Zum engmaschigen Monitoring des Blutdruck, sowie der Herzfrequenz wurde mikrochirurgisch eine arterielle Kanüle in die Arteria carotis interna platziert. Zur Aufrechterhaltung der Normotension wurde isotonische Natriumchloridlösung kontinuierlich mit einer Rate von 0,4ml/h infundiert. Dieses Prozedere gilt als etabliert und wurde bereits mehrfach in der Literatur beschrieben ^{156,160}.

Zur Bestätigung des Modells wurde sowohl der oxidative Stress, die Zellschädigung als auch die Wirkung auf ein anti-oxidatives System untersucht. Frühere Untersuchungen der isolierten Rattenleber konnten nur einen geringen Anstieg des oxidativen Stress zeigen, der höchste oxidative Stress wurde mit kalter Ischämie erreicht ^{161,162}. Diesen Arbeiten ist gemeinsam, dass sie als direkten Auslöser der Zellschädigung nicht den oxidativen Stress als alleinigen Grund ansehen, sondern eher als Auslöser einer inflammatorischen Zellschädigung. Im heutigen Verständnis der Zellschädigung durch oxidativen Stress steht neben der direkten Schädigung der Zelle und deren Bestandteile durch ROS die Signalinduktion und Steuerung von inflammatorischen Prozessen im Mittelpunkt. Es gibt eine zunehmende Evidenz, dass insbesondere Kupferzellen und aktivierte Monozyten und neutrophile Granulozyten potente Generatoren von ROS darstellen ^{42,50}.

In der vorliegenden Arbeit wurden erhöhte Malanthoinspiegel, eine erhöhte DHR-Fluoreszenz und eine Veränderung des GSH/GSSG Verhältnisses beobachtet. Diese Beobachtungen decken sich mit den Ergebnissen vorangegangener Arbeiten ⁵⁰.

Die Schädigung durch Ischämie/Reperfusion spielt sich in den ersten Stunden nach Reperfusion ab. Eine wichtige Rolle spielt hierbei die Apoptose. Dieser energieabhängige Prozess ist, wenn der Zellschaden größer als die vorhandenen Reparaturmechanismen ist, jedoch nicht schwerwiegend genug, um Nekrosen zu induzieren, welche per definitionem einen Zellschaden darstellen, der zu einem kompletten Verlust der Zellfunktion führt. Stammberger konnte im Rattenmodell nach einer 18-stündigen kalten Ischämie mit

darauffolgender orthotoper Lungentransplantation eine signifikant höhere Apoptoserate bei Pneumozyten Typ II beobachten. Die Anzahl der Apoptosezahl fiel im zeitlichen Verlauf immer weiter ab. Dies wurde mit der durchschnittlichen Apoptosezeit von 120 Minuten erklärt; und daraus geschlossen, dass Apoptose in der frühen Phase der Noxe entsteht ¹⁶³. Ungeklärt bleibt jedoch das Verhalten der Apoptose bei persistierenden Noxen wie SIRS und Sepsis. Apoptose wurde für diverse Organe nach Ischämie und Reperfusion nachgewiesen. All diesen Arbeiten ist gemeinsam, dass die höchste Apoptoserate in der Frühphase der Noxe auftraten ¹⁶⁴⁻¹⁶⁶. In unserem Modell folgte auf eine Stunde Ischämie eine Reperfusionszeit von drei Stunden. Dieses Schema wurde bereits in anderen Arbeiten etabliert ^{154,156,167,168}. Die Ischämiezeiten in der Literatur schwanken zwischen 30 Minuten und vier Stunden; die Reperfusionszeiten zwischen 1 Stunde und 24 Stunden ¹⁶⁹⁻¹⁷². Durch die eher kurze Reperfusionszeit in der vorliegenden Arbeit wird bezugnehmend auf die vorherigen Ausführungen die Frühphase der Schädigung durch Ischämie und Reperfusion erfasst. Das verwendete Modell liefert keine Aussage über Langzeitschäden an der Leber. Eine langfristige Schädigung durch ROS kann somit weder beobachtet noch ausgeschlossen werden. Wie bereits ausgeführt findet die größte Schädigung während der Frühphase, innerhalb der ersten Stunden der Reperfusion statt. Daher erscheint die gewählte Observationszeit zur Beantwortung der Fragestellung ausreichend.

4.2. Malondialdehyd

Malondialdehyd ist ein Abbauprodukt der Fettsäureoxidation und wird vermehrt durch oxidativen Stress gebildet. Malondialdehyd ist somit ein Indikator für die Zellschädigung durch verschiedene Noxen, wie z.B. chronische Erkrankungen, Sepsis, Ischämie und Reperfusionsschaden ^{173,174}.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine signifikante Erhöhung der MDA nach I/R gegenüber der Sham-Gruppe beobachtet. Dieses Ergebnis wurde bereits in zahlreichen Studien beobachtet ¹⁷¹. Unter Applikation von CrMP und somit der

selektiven Hemmung der Hämoxygenase zusätzlich zur Ischämie, zeigten sich die höchsten MDA-Plasmaspiegel.

4.3. DHR-Fluoreszenz

Die Umwandlung von Dihydrorhodamin123 in das fluoreszierende Rhodamin 123 gilt als Nachweisverfahren für Superoxide. Durch Oxidation von DHR unter Katalyse von Peroxidasen und Superoxiddismutasen entsteht das fluoreszierende Rhodamin 123, welches entweder in einer Mikrozytofluorometrie oder mittels Durchsichtmikroskopie nachgewiesen werden kann. In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe der Intravitalmikroskopie und speziellen Filtersystemen die DHR-Fluoreszenz bestimmt. DHR wurde verwendet um die ROS-Bildung in der Leber nachzuweisen. DHR-123 wird sowohl durch intrazelluläre als auch extrazelluläre ROS, wie z.B. H_2O_2 und Superoxidanionen wie O_2^- in fluoreszierendes Rhodamin-123 oxidiert. Da Rhodamin-123 an die innere Membran der Mitochondrien bindet, sind alle durch Oxidation aus DHR-123 gebildeten Rhodamin-123 Formationen in Zellen stabil ¹⁴². Ähnlich anderen fluoreszierenden Reagenzien wie zum Beispiel 2'7' Dichlorhydrofluorescein (DCFH₂) wird DHR-123 langsam durch ROS oxidiert. DHR-123 zeigt jedoch eine höhere Reaktivität zu Carbonat- (CO_3^-) und Nitratradikalen ($NO\cdot$), welche hauptsächlich unter oxidativem Stress gebildet werden ¹⁴³.

Es konnte durch I/R eine signifikante Erhöhung der DHR-Fluoreszenz gemessen werden. Durch die kompetitive Hemmung der HO durch CRMP wurde die höchste DHR-Fluoreszenz ermittelt. Diese Ergebnisse korrelieren mit den obengenannten Arbeiten. Außerdem stellt H_2O_2 das Endprodukt der durch Superoxiddismutasen katalysierten Reaktion von ROS dar ^{141,175}. In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Biliverdin und Bilirubin, welche durch die HO-Aktivität entstehen, anti-oxidative Eigenschaften besitzen ^{99,101}. Bilirubin kann die oxidative Schädigung durch H_2O_2 ¹⁷⁶, Peroxynitrate ¹⁷⁷ und Peroxylradikale ¹⁷⁸ reduzieren. Der verminderte ROS-Nachweis im in-vivo Modell nach der Induktion von HO könnte aufgrund des erhöhten CO und/oder

einer erhöhten Biliverdinproduktion erklärbar sein. Jedoch ist in der vorliegenden Arbeit durch die gleichzeitige Inhibition der HO-Aktivität und der inhalativen bzw. der oralen Applikation von CO DHR-Fluoreszenzwerten ähnlich derer der Sham-Gruppe gezeigt worden. Dies legt nahe, dass in diesem Modell der systemischen Inflammation Biliverdin/Bilirubin keinen ausreichenden Schutz gegen den oxidativen Schaden durch ROS-Formationen darstellt.

4.4. GSH/GSSG

In der vorliegenden Arbeit konnte eine signifikante Erniedrigung der GSH/GSSG-Menge in den Leberzellen nachgewiesen werden. Durch die Freisetzung von ROS aus Kupferzellen wird die Freisetzung von GSH aus den Hepatozyten, induziert und damit ein Sauerstoffradikalfänger hochreguliert. Es kommt zum Efflux von GSH aus den Hepatozyten und folglich zu einer Reduktion der intrazellulären GSH. Ebenso wurde eine Erhöhung des GSSG-Spiegels in den Leberzellen nachgewiesen. Diese Ergebnisse werden durch mehrere Arbeiten bestärkt ^{50,179,180}. Neben den extrazellulären Effekten der GSH spielen auch intrazelluläre Effekte eine Rolle und das entstehende GSSG wird über die Gallenwege oder im Plasma abtransportiert. Durch Behandlung mit CO konnten die vorbestehenden GSH/GSSG-Spiegel wiederhergestellt werden. Glutathion stellt einen wichtigen intrazellulären Abwehrmechanismus gegen ROS dar. Jaeschke et al. zeigten das Mäuse mit einem Glutathionperoxidase-mangel anfälliger gegen eine durch neutrophile Granulozyten induzierte Schädigung sind ¹⁷⁸. Jedoch erlauben die Ergebnisse dieser Studie keine Rückschlüsse auf die Mechanismen der Veränderungen von GSH/GSSG-Spiegeln.

4.5. CO hat anti-inflammatorische Effekte

Die Dosierung des CO in dieser Arbeit lag mit 250ppm im Bereich vieler anderer Arbeiten, jedoch wurden auch Dosierungen in Arbeiten von 15ppm bis zu 10.000 ppm beschrieben ¹⁰⁷.

Die anti-inflammatorischen Effekte der Hämoxigenase wurde in verschiedenen Untersuchungen bestätigt ^{137,181,182}. Durch eine Blockade der Hämoxigenase kommt es zu einem Anstieg der Hämkonzentration im Organismus und somit zu einer verstärkten Bildung von ROS. Neben dem Bilirubinsystem spielt CO eine wesentliche Rolle der anti-inflammatorischen Effekte der HO ^{98,105}.

Die Effekte von CO im Organismus sind mannigfaltig. Unter anderem konnte auch die Abhängigkeit der CO Wirkung von der Anwesenheit von NO nachgewiesen werden. So wurde im Mausmodell eine Verminderung der Apoptoserate bei durch TNF α induzierter Zellschädigung von Hepatozyten durch CO beobachtet, dies galt jedoch nur bei gleichzeitiger Anwesenheit von nukleärem Faktor kappa B (NF- κ B) und einer erhöhten Expression von NO ¹⁸³. Für die Endothelzellen der Lunge konnte gezeigt werden, dass die zytoprotektiven Effekte des CO p38-MAPK und Kaspase vermittelt sind. Diese Arbeit konnte auch zeigen, dass diese Effekte ohne Anwesenheit von NO oder cGMP vorhanden sind ¹⁰⁷. Denselben Effekt konnte auch Amersi im kalten Ischämiemodell der Rattenleber zeigen ¹⁰⁸.

Srisook et al. zeigten das CO von vermehrter HO-Aktivität und vom CO-releasing Molekül (CORM) die Bildung von ROS in LPS-stimulierten Makrophagen durch verminderte Nox-Aktivität inhibiert ¹⁸⁴. In unserem Modell wird der oxidative Stress teilweise durch Nox-abhängige Generierung von ROS und von Neutrophilen abgeleitete MPO ¹⁸⁵. Daher scheint die beobachtete Reduktion der Bildung von ROS in der Leber ein Resultat der Inhibierung von Nox zu sein. In unserem Modell der systemischen Inflammation dürften CO-Effekte auf verschiedenste Signalwege der ROS-Bildung beeinflussen. Jedoch zeigen unsere Daten das CO im Rahmen der systemischen Inflammation, unabhängig von Hämoxigenasesystem, die ROS-Bildung vermindert und somit das Überleben der Zellen verbessert und damit die Organschädigung reduziert.

Die protektiven Effekte des Kohlenstoffmonoxids in der systemischen Inflammation wurde in vielen Untersuchungen bestätigt. So wurde durch Kohlenstoffmonoxid eine verminderte Apoptose nachgewiesen ¹⁸⁶. Bei

Krankheitsbildern, welche mit einem erhöhten Grad an Inflammation einhergehen, konnte gezeigt werden, dass in der Expirationsluft eine erhöhte CO-Konzentration nachweisbar ist ¹⁸⁷.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit korrelieren mit den Ergebnissen der obengenannten Untersuchungen. Durch CO konnte eine Verminderung der MDA-Menge und somit der Fettsäureoxidation nachgewiesen werden, außerdem zeigte sich durch CO eine Reduktion der GSSG/GSH-Spiegel auf Sham-Niveau und eine Reduktion der DHR-Fluoreszenz. Dies wurde bereits in mehreren anderen Arbeiten nachgewiesen ^{167,171,188}.

Die protektiven Effekte der Hämoxigenase und deren Abbauprodukte CO, Biliverdin und Eisen waren Gegenstand vieler Untersuchungen ^{189,190}. Zur selektiven Untersuchung der Effekte von CO wurde in einer Versuchsgruppe mit Zn(II)-Protoporphyrin die Hämoxigenase kompetitiv gehemmt. Nebeneffekte durch das Biliverdinsystem wurden somit weitestgehend ausgeschaltet. Diese Methode wurde bereits in mehreren Arbeiten beschrieben ^{181,191}. Nakao konnte durch zeitgleiche Applikation von CO und Biliverdin einen Synergieeffekt der beiden HO abhängigen Systeme nach kalter Ischämie bei Herz- und Nierentransplantation im Rattenmodell nachweisen ⁹⁸. In dieser Gruppe zeigt sich der größte oxidative Stress. Durch Applikation von CO konnte dieser signifikant reduziert werden. Diese Ergebnisse decken sich mit den Arbeiten von Suematsu und Wang ^{181,191}.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass durch die Applikation von CO die Generierung von ROS in der Leber während der systemischen Inflammation reduziert wird. Dieser Effekt ist unabhängig vom Biliverdinsystem.

4.6. Die Rolle der Mangansuperoxiddismutase

4.6.1. Die Aktivität der MnSOD ist nur in den sinusoidalen Zellen erniedrig

Die MnSOD kommt sowohl in den parenchymalen als auch in den nicht parenchymalen Zellen vor. Die vorliegende Arbeit zeigte jedoch nur für die sinusoidalen Zellen eine verminderte MnSOD-Aktivität.

Die vorliegende Arbeit konnte keine signifikante Veränderung der MnSOD-Menge in den parenchymalen, als auch in den LSEC nachweisen. Dies steht im Gegensatz zu anderen Arbeiten in welchen eine Hochregulierung der MnSOD beobachtet wurde.

Für chronischen Stress konnte Filipovic eine vergrößerte Menge der MnSOD nachweisen. In der selben Arbeit untersuchte er jedoch auch den Einfluss durch akuten Stress und konnte eine Erniedrigung der MnSOD nachweisen und folgerte daraus, dass akuter und chronischer Stress differenziert betrachtet werden müssen ¹⁹². Wang konnte bei Patienten mit chronischer Tonsillitis eine signifikante Erniedrigung der MnSOD-Aktivität, sowie eine Erhöhung der MDA nachweisen. Durch Entfernung der Noxe via Tonsillektomie konnte er eine Normalisierung der MnSOD-Aktivität und der MDA-Spiegel im Plasma nachweisen.

Die MnSOD ist ein wichtiges Enzymsystem zum Schutz des Organismus vor oxidativem Stress ^{88,193}. Eine Überexpression von MnSOD führt im Maustiermodell zu einer Reduktion des Infarktareals nach kardialer Ischämie/Reperfusion ¹⁹⁴. Die MnSOD ist auch maßgeblich in der Signaltransduktion notwendig. Eine Verminderung der MnSOD in knockout-Mäusen führt zu einer geringeren Reagibilität des Gefäßtonus ¹⁹⁵.

Durch eine Überexpression der MnSOD kommt es bei einer danach einsetzenden Ischämie-Reperfusion zu einem verminderten Infarktareal und einem geringeren LDH-Anstieg als bei Wildtypmäusen ¹⁹⁴.

Alle diese Arbeiten zeigen unter akutem oxidativen Stress eine Verminderung der MnSOD-Aktivität.

In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch nur für die LSEC eine verminderte Aktivität der MnSOD nachgewiesen werden. Dies wird durch eine Arbeit von Cheluvappa gestützt. Durch die Applikation von Pyocyanin, einem der Virulenzfaktoren von *Pseudomonas aeruginosa*, wurde in jener Arbeit eine vermehrte Menge an ROS produziert. Im Rattenmodell konnte er eine signifikante Schädigung der LSEC feststellen, welche jedoch nicht mit einer Schädigung der Leberparenchymzellen einherging ¹⁹⁶. In mehreren Studien wurde bereits auf die hohe Sensitivität der LSEC auf Noxen hingewiesen. Mögliche Erklärungsansätze liegen in der exponierten Lage der LSEC in der Leber, zum anderen könnte auch die Dauer der Exposition eine Rolle spielen.

Die unterschiedliche Ausprägung des Einflusses der Inaktivierung der MnSOD durch ROS erscheint überraschend, unterstreicht jedoch die Sonderstellung der Endothelzellen im Organismus. In der vorliegenden Arbeit wurde oxidativer Stress durch Ischämie/Reperfusion erzeugt. Rauen et al. konnte am Zellmodell eine deutliche Reduktion der Apoptoserate, welche durch oxidativen Stress verursacht wurde, in LSEC durch Metallchelatoren zeigen, während in den Hepatozyten der selbe Effekt auch durch andere anti-oxidative Systeme erreicht werden konnte ¹⁹⁷. Aufgrund unserer Ergebnisse und anderer vorangegangener Arbeiten muss in der Antwort und der Resistenz auf eine systemische Inflammation, zwischen der auslösenden Noxe und dem betroffenen Zelltyp unterschieden werden. Die genauen Mechanismen wurden in der vorliegenden Arbeit nicht geklärt und sollen Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

4.7. Karbonylierung

4.7.1. Durch I/R wird die Karbonylierung der MnSOD erhöht.

Karbonylierung stellt einen weitverbreiteten Mechanismus des Organismus als Reaktion auf oxidativen Stress dar ¹⁹⁸. Mögliche Carbonylgruppen, die sogenannten reaktiven Carbonyl-Spezies (RCS), welche z.B. durch die Oxidation von ungesättigten Fettsäuren entstehen, stammen aus Produkten der Fettsäureoxidation. Die wichtigsten sind die α,β ungesättigten Aldehyde, wie beispielsweise 4-HNE, 4-ONE und Acrolein, sowie die Dialdehyde, wie z.B. Malonaldehyd ¹⁹⁹. In der vorliegenden Arbeit konnte nach I/R eine erhöhte Menge an Malonaldehyd nachgewiesen werden. Diese korreliert mit der Erhöhung der Karbonylierung der MnSOD.

Eine Vielzahl an anti-oxidativen Enzymen und Proteinen sind mit der Funktion der Elimination von reaktiven Produkten der Fettperoxidation und somit der Vermeidung der Entstehung von reaktiven Aldehydgruppen betraut. Dies sind beispielsweise Peroxide, wie die Gluthationperoxidase ¹⁹⁹. In der vorliegenden Arbeit wurde in den I/R Gruppen eine signifikante Depletion des Gluthationssystems beobachtet. Dies korreliert negativ mit einer erhöhten Karbonylierung in dieser Gruppe. In der Häm-Gruppe wurde dies teilweise aufgehoben.

Während die Menge an MnSOD in allen untersuchten Gruppen gleich war, konnte in der I/R-Gruppe und insbesondere in der I/R + CrMP-Gruppe eine signifikante Reduktion der MnSOD-Aktivität beobachtet werden. Die verminderte Aktivität von Peroxidasen und Superoxiddismutasen, sowie der Katalase verursacht durch oxidativen Stress durch Metallproteine wurde in verschiedenen Arbeiten bereits beschrieben ^{200,201}. Durch die signifikante Erniedrigung der I/R + CrMP-Gruppe gegenüber der I/R-Gruppe ergeben sich Hinweise auf eine Einflussnahme des Hämoxigenasesystems auf den Grad der Karbonylierung.

4.7.2. Durch die Applikation von CO wird die Karbonylierung der MnSOD reduziert.

Durch die Applikation von CO, sowohl per inhalationem als auch via Injektion von MC, entsprach der Karbonylierungsgrad der MnSOD demjenigen der Sham-Gruppe. Dies korrelierte negativ mit der erhöhten GSH/GSSG-Menge, der DHR-Fluoreszenz und der MDA.

Karbonylierung spielt bei Alterungsprozessen eine zentrale Rolle. Barreiro konnte bei COPD Patienten eine erhöhte Karbonylierung der Kreatinkinase in der Muskulatur nachweisen¹¹⁶. Als Ursache der erhöhten Karbonylierung wurde auch in dieser Arbeit oxidativer Stress postuliert.

Karbonylierung schien lange Zeit ein irreversibler Prozess zu sein, welcher zwangsläufig in die Apoptose führt. Dies erklärt den progressiven Verlauf vieler chronischer Erkrankungen. Wong konnte jedoch an glatten Gefäßmuskelzellen zeigen, dass auch eine durch Endothelin-1 vermittelte Dekarbonylierung existiert. Diese wird durch die Inhibierung der Thiorinreduktase supprimiert^{202,203}. Ob dieser Mechanismus auch für die Dekarbonylierung der MnSOD im I/R-Modell verantwortlich ist, konnte bisher nicht geklärt werden. Oben genannter Mechanismus wurde bisher nur für Proteine der glatten Gefäßmuskulatur der pulmonalen Strombahn nachgewiesen.

In der vorliegenden Arbeit wurde nicht untersucht ob, die gemessene Verminderung der Karbonylierung durch eine Protektion der MnSOD vor Karbonylierung oder durch eine Dekarbonylierung entsteht.

Karbonylierung stellt einen Prozess im Organismus dar, welcher als Vorstufe zur Apoptose gesehen werden kann. In zahlreichen Untersuchungen wurde gezeigt, dass durch die Applikation von exogenem CO bzw. durch die Überexpression der HO-1, als wichtigstes CO produzierendes System, eine signifikante Reduktion der Apoptose während bzw. nach systemischer Inflammation erreicht werden konnte. Der genaue Mechanismus dieser

Tatsache blieb bisher ungeklärt. Eine Verminderung von IL-6 und TNF α wurde im Zusammenhang mit CO-Inhalation nach hyperoxischer Lungenschädigung beobachtet. Die Modulation dieser Moleküle und der MAPkinase scheinen eine wesentliche Rolle für die antiinflammatorischen Effekte von CO zu spielen^{204,205}.

Die Reduktion von Karbonylierung wurde bereits für das Zytoskelett des Gehirnes beschrieben. Bizzero konnte zeigen, dass durch Applikation von klassischen Radikalfängern der Fettsäureoxidation, wie Trolox, Kaffeesäurephenylester (CAPE), und Butylhydroxytoluol (BHT) eine Reduktion der Karbonylierung erreicht werden konnte. Interessanter Weise konnte jedoch für BHT nur eine Reduktion der Carbonylierung und der Lipidperoxidation der Cytoskeletalen Proteine jedoch nicht der löslichen Proteine zeigen. In pull-down Experimenten konnten Beta-actin und Alpha/Beta-tubulin als Hauptangriffsorte der Karbonylierung unter GSH Depletion ausgemacht werden¹²³. Zheng wiederum zeigt an GSH depletierten Rattengehirnen, dass klassische Fänger der Reaktiven Carbonyl Spezies (RCS), wie Methoxylamine, Aminoguanidine, Pyridoxamine, Carnosine, Taurine und z-Histidinhydrazide keine Verminderung der Carbonylierungsrate erzielten. Eine Ausnahme davon bildeten die Hydralazine. Er schlussfolgerte daraus, dass stabile Fettsäureverbindungen keinen Einfluss auf die Karbonylierung haben²⁰⁶.

4.8. Vergleich mit chronischer Inflammation

Eine typische chronische Erkrankung der Leber ist die Leberzirrhose. Die Ursachen der Leberzirrhose sind vielfältig. Neben chronischem Alkoholkonsum sind Hepatitisviren, Medikamentenintoxikationen, Knollenblätterpilzintoxikation, sowie diverse andere Noxen ursächlich. In mehreren Arbeiten wurde eine Erhöhung inflammatorischer Marker nachgewiesen. Außerdem konnten auch erhöhte Werte für Marker des oxidativen Stresses nachgewiesen werden.

Die akute Inflammation im verwendeten Model scheint ursächlich für den unterschiedlichen Nachweis der MnSOD Aktivität in den sinusoidalen Endothelzellen und den Hepatozyten zu sein. Auch für chronische Prozesse ist die verminderte Aktivität der MnSOD nachgewiesen worden. Wang konnte bei Patienten mit chronischer Tonsillitis eine verminderte Konzentration der MnSOD im Serum der Patienten zeigen, welche nach der Tonsilektomie und somit der Beseitigung der Noxe signifikant anstieg²⁰⁷.

Kommt es zur Schädigung der Leber durch externe Noxen so stellen die sinusoidalen Endothelzellen und die Kupferzellen in ihrer Funktion als Filter zwischen zirkulierendem Blut und Hepatozyten die Barriere und Schutzschicht der Leber und die erste Kontaktfläche zwischen der Leber und der Noxe dar. In verschiedenen Tiermodellen konnte nachgewiesen werden, dass Kupfer-Sternzellen aktiviert und durch die parakrine Bildung u.a. von Sauerstoffradikalen und Stickstoffmonoxid die Endothelzellen moduliert werden^{24,208}. Im weiteren Verlauf der Entzündungsreaktion kommt es zu einer Aktivierung der Endothelzellen der Leber. Vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen in den sinusoidalen Endothelzellen, als auch in den Endothelzellen der Lebervene und der Pfortader, führen zu einer vermehrten Bindung aktivierter Leukozyten (z.B. durch Integrin CD11/CD18) an die Endothelzellen^{24,208}. Das Ausmaß der Leberschädigung wiederum ist in der systemischen Inflammation im Wesentlichen durch aktivierte Leukozyten determiniert³⁵.

In mehreren Untersuchungen an reinen Zellkulturen von LSEC und Hepatozyten konnte eine signifikante Schädigung durch Ischämie und Reperfusion nur für die LSEC nachgewiesen werden. Hepatozyten werden durch Ischämie geschädigt und es konnte elektronenmikroskopisch eine Bläschenbildung nachgewiesen werden. Eine bedeutende Rolle in der Pathogenese der Leberzirrhose und der Steatosis hepatis spielt der oxidative Stress. Bei Patienten konnte eine Korrelation zwischen oxidativem Stress und dem Schweregrad der Erkrankung (Klassifiziert nach Child-Pugh) ermittelt

werden ^{209,210}. Während in der vorliegenden Arbeit keine signifikante Veränderung der MnSOD-Aktivität in den Hepatozyten nachgewiesen wurde, konnte eine signifikante Verminderung der MnSOD-Aktivität in den sinusoidalen Endothelzellen nachgewiesen werden. Ursächlich gilt auch bei chronischen Erkrankungen das Missverhältnis zwischen ROS und den Radikalfängern als einer der wichtigsten Mechanismen der Pathogenese ²¹¹. Die exakten Mechanismen der Aktivitätsminderung sind jedoch zum aktuellen Zeitpunkt noch ungeklärt. Der Mechanismus der Karbonylierung wurde bereits im Zusammenhang mit anderen chronischen Erkrankungen beschrieben. Insbesondere bei chronischen Erkrankungen des Gehirns ist die Karbonylierung ein wichtiger Pathomechanismus ^{118,123,124}, aber auch Erkrankungen wie COPD und Diabetes mellitus erzeugen einen chronischen oxidativen Stress, welcher durch Karbonylierung der Kreatininkinase zu einer Einschränkung der Muskelkontraktilität führt ¹¹⁶. Dies wurde bei Diabetes mellitus insbesondere für die diastolische Funktion des Herzmuskels nachgewiesen ^{117,212}. Die Rolle der Karbonylierung in der Pathogenese chronischer Lebererkrankungen ist zum derzeitigen Zeitpunkt unklar. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Karbonylierung von Sauerstoffradikalfängern in der akuten Phase einer Lebererkrankung zur verminderten Aktivität und in einem größeren Ungleichgewicht zwischen ROS und Radikalfängern resultiert.

Bei Bestimmungen der SOD in Erythrozyten konnte bei den Patienten mit Leberzirrhose eine signifikante Verminderung der Aktivität nachgewiesen werden, welche außerdem mit dem Schweregrad der Erkrankung korrelierte. Der Pathomechanismus dieser Verminderung wurde jedoch nicht untersucht ²¹⁰. Während für chronische Erkrankungen der Leber die Aktivitätsminderung der SOD oftmals beschrieben wurde, gilt dies nicht für akute Krankheitsbilder. Durch Präkonditionierung vor Ischämie und Reperfusion kann eine Verminderung des Schadens erzielt werden. Dabei könnte der SOD eine Rolle in der Signaltransduktion zukommen, dies ist jedoch nicht abschließend geklärt und bedarf weiterer Untersuchungen ²¹³. Bei Patienten in einer akuten Sepsis

konnte Guerreiro eine Verminderung der SOD-Aktivität nachweisen, welche mit dem Schweregrad der Erkrankung korrelierte ²¹⁴. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Aktivitätsminderung der MnSOD nur die sinusoidalen Endothelzellen betrifft und nicht wie im Falle der chronischen Erkrankungen auch die Hepatozyten. Die zugrunde liegenden Mechanismen wurden nicht untersucht und bedürfen weiterer Untersuchungen. Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Ischämie/Reperusions-Modell untersuchte nur die Frühphase der systemischen Inflammation. Nach allgemeiner Lehrmeinung stellen die sinusoidalen Endothelzellen durch ihre Filterfunktion eine schützende Barriere gegenüber inflammatorischen Noxen. Somit stellt eine Schädigung der LSEC wahrscheinlich nur das Initialstadium der Leberschädigung im Rahmen der systemischen Inflammation dar.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde im murinen Maustiermodell die Wirkung von CO in der Leber in der systemischen Inflammation untersucht. Eine der wesentlichen Schädigungsfaktoren stellen ROS dar. Durch eine Inbalance zwischen der Bildung von ROS und den anti-oxidativen Systemen kommt es zur Zellschädigung, insbesondere durch Apoptose.

Es wurde die Rolle der MnSOD in der anti-inflammatorischen Wirkung von CO in der systemischen Inflammation untersucht. Im murinen Maustiermodell wurde durch Ischämie/Reperfusion der Hinterläufe eine systemische Inflammation induziert.

Durch Applikation von CrMP wurde das Hämoxygenasesystem inhibiert und somit die möglichen anti-oxidativen Effekte der Endprodukte der Hämoxygenase, das Biliverdin-Bilirubin-System, CO und auch das Ferritin ausgeschaltet.

Zur Detektion und Quantifizierung des oxidativen Stresses wurden MDA, GSSG und DHR-Fluoreszenz analysiert.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die durch Ischämie/Reperfusion verursachte systemische Bildung von ROS in der Leber durch CO reduziert werden kann. Dieser Effekt ist unabhängig vom Biliverdin- und Ferritinsystem. In der vorliegenden Arbeit, zeigte sich bei einer durch Ischämie/Reperfusion der Hinterläufe induzierten systemischen Inflammation, eine signifikante Erniedrigung der MnSOD-Aktivität bei gleich bleibender MnSOD-Menge in der Leber. Die reduzierte Aktivität der MnSOD korrelierte negativ mit MDA, GSSG und DHR-Fluoreszenz. Somit scheinen durch oxidativen Stress auch die Abwehrmechanismen des Organismus gegen diesen inaktiviert werden. Ein bekannter Mechanismus zur Inaktivierung von Proteinen stellt die Karbonylierung dar. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig eine vermehrte Karbonylierung der MnSOD durch oxidativen Stress in

der Leber in der systemischen Inflammation nachgewiesen werden. Die genauen Mechanismen wurden in dieser Arbeit nicht geklärt und sind Gegenstand zukünftiger Untersuchungen.

6. Literaturverzeichnis

1. Seeley EJ, Matthay MA, Wolters PJ. Inflection points in sepsis biology: from local defense to systemic organ injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2012;303:L355-63.
2. Schlag G, Redl H, Bahrami S. [SIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrome) following trauma and during sepsis]. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 1994;29:37-41.
3. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. 1992. *Chest* 2009;136:e28.
4. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med* 2003;31:1250-6.
5. Wunder C, Eichelbronner O, Roewer N. Are IL-6, IL-10 and PCT plasma concentrations reliable for outcome prediction in severe sepsis? A comparison with APACHE III and SAPS II. *Inflamm Res* 2004;53:158-63.
6. Marshall JC, Reinhart K. Biomarkers of sepsis. *Crit Care Med* 2009;37:2290-8.
7. Reinhart K, Bauer M, Riedemann NC, Hartog CS. New approaches to sepsis: molecular diagnostics and biomarkers. *Clin Microbiol Rev* 2012;25:609-34.
8. Angus DC, Wax RS. Epidemiology of sepsis: an update. *Crit Care Med* 2001;29:S109-16.
9. Castellanos-Ortega A, Suberviola B, Garcia-Astudillo LA, et al. Impact of the Surviving Sepsis Campaign protocols on hospital length of stay and mortality in septic shock patients: results of a three-year follow-up quasi-experimental study. *Crit Care Med* 2010;38:1036-43.
10. Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 1990;249:1431-3.
11. Dziarski R, Ulmer AJ, Gupta D. Interactions of CD14 with components of gram-positive bacteria. *Chem Immunol* 2000;74:83-107.
12. Macdonald J, Galley HF, Webster NR. Oxidative stress and gene expression in sepsis. *Br J Anaesth* 2003;90:221-32.
13. Riedemann NC, Guo RF, Ward PA. Novel strategies for the treatment of sepsis. *Nat Med* 2003;9:517-24.
14. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 2003;348:138-50.
15. Ognibene FP, Cunnion RE. Mechanisms of myocardial depression in sepsis. *Crit Care Med* 1993;21:6-8.
16. Flynn A, Chokkalingam Mani B, Mather PJ. Sepsis-induced cardiomyopathy: a review of pathophysiologic mechanisms. *Heart Fail Rev* 2010;15:605-11.
17. Titheradge MA. Nitric oxide in septic shock. *Biochim Biophys Acta* 1999;1411:437-55.

18. Lemmen SW. Sepsis. *Die Intensivmedizin*. 10. ed: Springer; 2007:792-806.
19. Singer M, Jones AM. Bench-to-bedside review: the role of C1-esterase inhibitor in sepsis and other critical illnesses. *Crit Care* 2011;15:203.
20. Bosmann M, Ward PA. The inflammatory response in sepsis. *Trends Immunol* 2012.
21. Vincent JL, De Backer D. Microvascular dysfunction as a cause of organ dysfunction in severe sepsis. *Crit Care* 2005;9 Suppl 4:S9-12.
22. Levy MM, Pronovost PJ, Dellinger RP, et al. Sepsis change bundles: converting guidelines into meaningful change in behavior and clinical outcome. *Crit Care Med* 2004;32:S595-7.
23. Benninghoff. *Leber und Gallenblase*. *Anatomie* 1994;1.
24. Wunder C, Roewer N, Eichelbröner O. Hauptdeterminanten der Lebermikrozirkulation im Rahmen systemischer Entzündungsreaktionen. *Der Anaesthesist* 2004;53:1073-85.
25. Rieder H, Meyer zum Buschenfelde KH, Ramadori G. Functional spectrum of sinusoidal endothelial liver cells. Filtration, endocytosis, synthetic capacities and intercellular communication. *J Hepatol* 1992;15:237-50.
26. Wunder C, Roewer N, Eichelbronner O. [Main determinants of liver microcirculation during systemic inflammation]. *Anaesthesist* 2004;53:1073-85.
27. Dahn MS, Wilson RF, Lange P, Stone A, Jacobs LA. Hepatic parenchymal oxygen tension following injury and sepsis. *Arch Surg* 1990;125:441-3.
28. Spronk PE, Zandstra DF, Ince C. Bench-to-bedside review: sepsis is a disease of the microcirculation. *Crit Care* 2004;8:462-8.
29. Hildebrand LB, Krejci V, Banic A, Erni D, Wheatley AM, Sigurdsson GH. Dynamic study of the distribution of microcirculatory blood flow in multiple splanchnic organs in septic shock. *Crit Care Med* 2000;28:3233-41.
30. Unger LS, Cryer HM, Garrison RN. Differential response of the microvasculature in the liver during bacteremia. *Circ Shock* 1989;29:335-44.
31. Keller SA, Paxian M, Ashburn JH, Clemens MG, Huynh T. Kupffer cell ablation improves hepatic microcirculation after trauma and sepsis. *J Trauma* 2005;58:740-9; discussion 9-51.
32. Croner RS, Hoerer E, Kulu Y, et al. Hepatic platelet and leukocyte adherence during endotoxemia. *Crit Care* 2006;10:R15.
33. Rosenbloom AJ, Pinsky MR, Bryant JL, Shin A, Tran T, Whiteside T. Leukocyte activation in the peripheral blood of patients with cirrhosis of the liver and SIRS. Correlation with serum interleukin-6 levels and organ dysfunction. *JAMA* 1995;274:58-65.
34. Brock RW, Nie RG, Harris KA, Potter RF. Kupffer cell-initiated remote hepatic injury following bilateral hindlimb ischemia is complement dependent. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;280:G279-84.
35. Jaeschke H, Smith CW, Clemens MG, Ganey PE, Roth RA. Mechanisms of inflammatory liver injury: adhesion molecules and cytotoxicity of neutrophils. *Toxicol Appl Pharmacol* 1996;139:213-26.

36. Carvalho-Tavares J, Fox-Robichaud A, Kubes P. Assessment of the mechanism of juxtacrine activation and adhesion of leukocytes in liver microcirculation. *Am J Physiol* 1999;276:G828-34.
37. Hamilton ML, Van Remmen H, Drake JA, et al. Does oxidative damage to DNA increase with age? *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:10469-74.
38. Honda K, Smith MA, Zhu X, et al. Ribosomal RNA in Alzheimer disease is oxidized by bound redox-active iron. *J Biol Chem* 2005;280:20978-86.
39. Davies MJ. The oxidative environment and protein damage. *Biochim Biophys Acta* 2005;1703:93-109.
40. Mylonas C, Kouretas D. Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo* 1999;13:295-309.
41. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British journal of pharmacology* 2004;142:231-55.
42. Jaeschke H. Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15:718-24.
43. Jaeschke H, Ramachandran A. Reactive oxygen species in the normal and acutely injured liver. *J Hepatol* 2011.
44. Jaeschke H. Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury: Present concepts. *J Gastroenterol Hepatol* 2011;26 Suppl 1:173-9.
45. Jaeschke H. Antioxidant defense mechanisms. *Comprehensive toxicology* 2010;9:319-37.
46. Jaeschke H. Mechanisms of Liver Injury. II. Mechanisms of neutrophil-induced liver cell injury during hepatic ischemia-reperfusion and other acute inflammatory conditions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;290:G1083-8.
47. Yanai H, Ban T, Wang Z, et al. HMGB proteins function as universal sentinels for nucleic-acid-mediated innate immune responses. *Nature* 2009;462:99-103.
48. Zhang Q, Raouf M, Chen Y, et al. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature* 2010;464:104-7.
49. Bilzer M, Jaeschke H, Vollmar AM, Paumgartner G, Gerbes AL. Prevention of Kupffer cell-induced oxidant injury in rat liver by atrial natriuretic peptide. *Am J Physiol* 1999;276:G1137-44.
50. Jaeschke H. Reactive oxygen and ischemia/reperfusion injury of the liver. *Chem Biol Interact* 1991;79:115-36.
51. Ho YS, Xiong Y, Ma W, Spector A, Ho DS. Mice lacking catalase develop normally but show differential sensitivity to oxidant tissue injury. *J Biol Chem* 2004;279:32804-12.
52. Forsberg L, de Faire U, Morgenstern R. Oxidative stress, human genetic variation, and disease. *Arch Biochem Biophys* 2001;389:84-93.
53. Powers SK, Ji LL, Leeuwenburgh C. Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a brief review. *Med Sci Sports Exerc* 1999;31:987-97.
54. Powers SK, Lennon SL. Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proc Nutr Soc* 1999;58:1025-33.
55. Radi R, Turrens JF, Chang LY, Bush KM, Crapo JD, Freeman BA. Detection of catalase in rat heart mitochondria. *J Biol Chem* 1991;266:22028-34.

56. Shull S, Heintz NH, Periasamy M, et al. Differential regulation of antioxidant enzymes in response to oxidants. *J Biol Chem* 1991;266:24398-403.
57. White CW, Ghezzi P, McMahon S, Dinarello CA, Repine JE. Cytokines increase rat lung antioxidant enzymes during exposure to hyperoxia. *J Appl Physiol* 1989;66:1003-7.
58. Dringen R, Pawlowski PG, Hirrlinger J. Peroxide detoxification by brain cells. *J Neurosci Res* 2005;79:157-65.
59. Nakagawa Y. Role of mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) as an antiapoptotic factor. *Biol Pharm Bull* 2004;27:956-60.
60. Jornot L, Junod AF. Differential regulation of glutathione peroxidase by selenomethionine and hyperoxia in endothelial cells. *Biochem J* 1995;306 (Pt 2):581-7.
61. Crack PJ, Taylor JM, Flentjar NJ, et al. Increased infarct size and exacerbated apoptosis in the glutathione peroxidase-1 (Gpx-1) knockout mouse brain in response to ischemia/reperfusion injury. *J Neurochem* 2001;78:1389-99.
62. Ho YS, Magnenat JL, Gargano M, Cao J. The nature of antioxidant defense mechanisms: a lesson from transgenic studies. *Environ Health Perspect* 1998;106 Suppl 5:1219-28.
63. Orrell RW, Habgood JJ, Gardiner I, et al. Clinical and functional investigation of 10 missense mutations and a novel frameshift insertion mutation of the gene for copper-zinc superoxide dismutase in UK families with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 1997;48:746-51.
64. Fridovich I. Superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 1975;44:147-59.
65. Fridovich I, Freeman B. Antioxidant defenses in the lung. *Annu Rev Physiol* 1986;48:693-702.
66. Chang LY, Slot JW, Geuze HJ, Crapo JD. Molecular immunocytochemistry of the CuZn superoxide dismutase in rat hepatocytes. *J Cell Biol* 1988;107:2169-79.
67. Keller GA, Warner TG, Steimer KS, Hallewell RA. Cu,Zn superoxide dismutase is a peroxisomal enzyme in human fibroblasts and hepatoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:7381-5.
68. Okado-Matsumoto A, Fridovich I. Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. *J Biol Chem* 2001;276:38388-93.
69. Sturtz LA, Diekert K, Jensen LT, Lill R, Culotta VC. A fraction of yeast Cu,Zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria. A physiological role for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage. *J Biol Chem* 2001;276:38084-9.
70. Elchuri S, Oberley TD, Qi W, et al. CuZnSOD deficiency leads to persistent and widespread oxidative damage and hepatocarcinogenesis later in life. *Oncogene* 2005;24:367-80.
71. Tsan MF. Superoxide dismutase and pulmonary oxygen toxicity: lessons from transgenic and knockout mice (Review). *Int J Mol Med* 2001;7:13-9.

72. Chen Z, Oberley TD, Ho Y, et al. Overexpression of CuZnSOD in coronary vascular cells attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury. *Free Radic Biol Med* 2000;29:589-96.
73. Kinouchi H, Epstein CJ, Mizui T, Carlson E, Chen SF, Chan PH. Attenuation of focal cerebral ischemic injury in transgenic mice overexpressing CuZn superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:11158-62.
74. de Haan JB, Cristiano F, Iannello R, Bladier C, Kelner MJ, Kola I. Elevation in the ratio of Cu/Zn-superoxide dismutase to glutathione peroxidase activity induces features of cellular senescence and this effect is mediated by hydrogen peroxide. *Hum Mol Genet* 1996;5:283-92.
75. Folz RJ, Crapo JD. Extracellular superoxide dismutase (SOD3): tissue-specific expression, genomic characterization, and computer-assisted sequence analysis of the human EC SOD gene. *Genomics* 1994;22:162-71.
76. Marklund SL. Extracellular superoxide dismutase in human tissues and human cell lines. *J Clin Invest* 1984;74:1398-403.
77. Loenders B, Van Mechelen E, Nicolai S, et al. Localization of extracellular superoxide dismutase in rat lung: neutrophils and macrophages as carriers of the enzyme. *Free Radic Biol Med* 1998;24:1097-106.
78. Marklund SL. Regulation by cytokines of extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in fibroblasts. *J Biol Chem* 1992;267:6696-701.
79. Marklund SL, Holme E, Hellner L. Superoxide dismutase in extracellular fluids. *Clin Chim Acta* 1982;126:41-51.
80. Oury TD, Day BJ, Crapo JD. Extracellular superoxide dismutase in vessels and airways of humans and baboons. *Free Radic Biol Med* 1996;20:957-65.
81. Folz RJ, Guan J, Seldin MF, Oury TD, Enghild JJ, Crapo JD. Mouse extracellular superoxide dismutase: primary structure, tissue-specific gene expression, chromosomal localization, and lung in situ hybridization. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997;17:393-403.
82. Carlsson LM, Jonsson J, Edlund T, Marklund SL. Mice lacking extracellular superoxide dismutase are more sensitive to hyperoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:6264-8.
83. Oury TD, Day BJ, Crapo JD. Extracellular superoxide dismutase: a regulator of nitric oxide bioavailability. *Lab Invest* 1996;75:617-36.
84. Copin JC, Gasche Y, Chan PH. Overexpression of copper/zinc superoxide dismutase does not prevent neonatal lethality in mutant mice that lack manganese superoxide dismutase. *Free Radic Biol Med* 2000;28:1571-6.
85. Van Remmen H, Salvador C, Yang H, Huang TT, Epstein CJ, Richardson A. Characterization of the antioxidant status of the heterozygous manganese superoxide dismutase knockout mouse. *Arch Biochem Biophys* 1999;363:91-7.
86. Melov S, Coskun P, Patel M, et al. Mitochondrial disease in superoxide dismutase 2 mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:846-51.

87. Kokoszka JE, Coskun P, Esposito LA, Wallace DC. Increased mitochondrial oxidative stress in the Sod2 (+/-) mouse results in the age-related decline of mitochondrial function culminating in increased apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:2278-83.
88. Van Remmen H, Ikeno Y, Hamilton M, et al. Life-long reduction in MnSOD activity results in increased DNA damage and higher incidence of cancer but does not accelerate aging. *Physiol Genomics* 2003;16:29-37.
89. Powis G, Montfort WR. Properties and biological activities of thioredoxins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2001;30:421-55.
90. Bourdon E, Loreau N, Lagrost L, Blache D. Differential effects of cysteine and methionine residues in the antioxidant activity of human serum albumin. *Free Radic Res* 2005;39:15-20.
91. Miles AT, Hawksworth GM, Beattie JH, Rodilla V. Induction, regulation, degradation, and biological significance of mammalian metallothioneins. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2000;35:35-70.
92. Rice-Evans C. Flavonoid antioxidants. *Curr Med Chem* 2001;8:797-807.
93. Tsuda T, Kato Y, Osawa T. Mechanism for the peroxynitrite scavenging activity by anthocyanins. *FEBS Lett* 2000;484:207-10.
94. Atmaca G. Antioxidant effects of sulfur-containing amino acids. *Yonsei Med J* 2004;45:776-88.
95. Becker BF. Towards the physiological function of uric acid. *Free Radic Biol Med* 1993;14:615-31.
96. Reiter RJ. Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *FASEB J* 1995;9:526-33.
97. Reiter RJ, Tan DX, Cabrera J, D'Arpa D. Melatonin and tryptophan derivatives as free radical scavengers and antioxidants. *Adv Exp Med Biol* 1999;467:379-87.
98. Nakao A, Neto JS, Kanno S, et al. Protection against ischemia/reperfusion injury in cardiac and renal transplantation with carbon monoxide, biliverdin and both. *Am J Transplant* 2005;5:282-91.
99. Clark J, FORESTI R, Green C, MOTTERLINI R. Dynamics of haem oxygenase-1 expression and bilirubin production in cellular protection against oxidative stress. *Biochem J* 2000;348:615-9.
100. Kato Y, Shimazu M, Kondo M, et al. Bilirubin rinse: A simple protectant against the rat liver graft injury mimicking heme oxygenase-1 preconditioning. *Hepatology* 2003;38:364-73.
101. Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* 1987;235:1043-6.
102. Soares MP, Bach FH. Heme oxygenase-1: from biology to therapeutic potential. *Trends Mol Med* 2009;15:50-8.
103. Brune B, Ullrich V. Inhibition of platelet aggregation by carbon monoxide is mediated by activation of guanylate cyclase. *Mol Pharmacol* 1987;32:497-504.
104. Wakabayashi Y, Takamiya R, Mizuki A, et al. Carbon monoxide overproduced by heme oxygenase-1 causes a reduction of vascular resistance in perfused rat liver. *Am J Physiol* 1999;277:G1088-96.

105. Brugger J, Schick MA, Brock RW, et al. Carbon monoxide has antioxidative properties in the liver involving p38 MAP kinase pathway in a murine model of systemic inflammation. *Microcirculation* 2010;17:504-13.
106. Otterbein LE, Bach FH, Alam J, et al. Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat Med* 2000;6:422-8.
107. Zhang X, Shan P, Otterbein LE, et al. Carbon monoxide inhibition of apoptosis during ischemia-reperfusion lung injury is dependent on the p38 mitogen-activated protein kinase pathway and involves caspase 3. *J Biol Chem* 2003;278:1248-58.
108. Amersi F, Shen XD, Anselmo D, et al. Ex vivo exposure to carbon monoxide prevents hepatic ischemia/reperfusion injury through p38 MAP kinase pathway. *Hepatology* 2002;35:815-23.
109. Piantadosi CA. Carbon monoxide, reactive oxygen signaling, and oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2008;45:562-9.
110. Bilban M, Bach FH, Otterbein SL, et al. Carbon monoxide orchestrates a protective response through PPARgamma. *Immunity* 2006;24:601-10.
111. Zuckerbraun BS, Chin BY, Bilban M, et al. Carbon monoxide signals via inhibition of cytochrome c oxidase and generation of mitochondrial reactive oxygen species. *FASEB J* 2007;21:1099-106.
112. Bilban M, Haschemi A, Wegiel B, Chin BY, Wagner O, Otterbein LE. Heme oxygenase and carbon monoxide initiate homeostatic signaling. *J Mol Med* 2008;86:267-79.
113. Kim HP, Ryter SW, Choi AM. CO as a cellular signaling molecule. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2006;46:411-49.
114. Balla G, Jacob HS, Balla J, et al. Ferritin: a cytoprotective antioxidant strategem of endothelium. *J Biol Chem* 1992;267:18148-53.
115. Balla J, Balla G, Jeney V, Kakuk G, Jacob HS, Vercellotti GM. Ferriporphyrins and endothelium: a 2-edged sword-promotion of oxidation and induction of cytoprotectants. *Blood* 2000;95:3442-50.
116. Barreiro E, Gea J, Matar G, Hussain SN. Expression and carbonylation of creatine kinase in the quadriceps femoris muscles of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005;33:636-42.
117. Shao CH, Capek HL, Patel KP, et al. Carbonylation Contributes to ERCA2a Activity Loss and Diastolic Dysfunction in a Rat Model of Type 1 Diabetes. *Diabetes* 2011.
118. Bizzozero OA, DeJesus G, Callahan K, Pastuszyn A. Elevated protein carbonylation in the brain white matter and gray matter of patients with multiple sclerosis. *J Neurosci Res* 2005;81:687-95.
119. Cattaruzza M, Hecker M. Protein carbonylation and decarboylation: a new twist to the complex response of vascular cells to oxidative stress. *Circ Res* 2008;102:273-4.
120. Dalle-Donne I, Giustarini D, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation in human diseases. *Trends Mol Med* 2003;9:169-76.
121. Aldini G, Vistoli G, Regazzoni L, Benfatto MC, Bettinelli I, Carini M. Edaravone inhibits protein carbonylation by a direct carbonyl-scavenging

- mechanism: focus on reactivity, selectivity, and reaction mechanisms. *Antioxid Redox Signal* 2010;12:381-92.
122. Colombo G, Aldini G, Orioli M, et al. Water-Soluble alpha,beta-unsaturated aldehydes of cigarette smoke induce carbonylation of human serum albumin. *Antioxid Redox Signal* 2010;12:349-64.
 123. Bizzozero OA, Reyes S, Ziegler J, Smerjac S. Lipid peroxidation scavengers prevent the carbonylation of cytoskeletal brain proteins induced by glutathione depletion. *Neurochem Res* 2007;32:2114-22.
 124. Bizzozero OA, Ziegler JL, De Jesus G, Bolognani F. Acute depletion of reduced glutathione causes extensive carbonylation of rat brain proteins. *J Neurosci Res* 2006;83:656-67.
 125. England K, O'Driscoll C, Cotter TG. Carbonylation of glycolytic proteins is a key response to drug-induced oxidative stress and apoptosis. *Cell Death Differ* 2004;11:252-60.
 126. Aldini G, Dalle-Donne I, Facino RM, Milzani A, Carini M. Intervention strategies to inhibit protein carbonylation by lipoxidation-derived reactive carbonyls. *Med Res Rev* 2007;27:817-68.
 127. Nystrom T. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *EMBO J* 2005;24:1311-7.
 128. Schuler B, Rettich A, Vogel J, Gassmann M, Arras M. Optimized surgical techniques and postoperative care improve survival rates and permit accurate telemetric recording in exercising mice. *BMC veterinary research* 2009;5:28.
 129. Arras M, Rettich A, Cinelli P, Kasermann HP, Burki K. Assessment of post-laparotomy pain in laboratory mice by telemetric recording of heart rate and heart rate variability. *BMC veterinary research* 2007;3:16.
 130. Suckow MA, Danneman P, Brayton C. *The laboratory mouse*: CRC Press Inc.; 2001.
 131. Erhardt W, Henke J, Kroker R. *Pharmaka im Rahmen der Anästhesie und der perioperativen Schmerzlinderung. Anaesthesie & Analgesie beim Klein-und Heimtier* Stuttgart: Schattauer 2004:125-6.
 132. Zuurbier CJ, Emons VM, Ince C. Hemodynamics of anesthetized ventilated mouse models: aspects of anesthetics, fluid support, and strain. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 2002;282:H2099-H105.
 133. Arras M, Autenried P, Rettich A, Spaeni D, Rüllicke T. Optimization of intraperitoneal injection anesthesia in mice: drugs, dosages, adverse effects, and anesthesia depth. *Comparative medicine* 2001;51:443-56.
 134. Quesenberry KE, Carpenter JW. *Ferrets, Rabbits, and Rodents Clinical Medicine and Surgery*. St. Louis, MO: Saunders. *EQUINE MEDICINE & SURGERY* 2004.
 135. Henke J, Erhardt W. *Notfälle unter Anästhesie bei Kleinsäufern. Narkose-Notfälle Enke*, Stuttgart 2002:196-218.
 136. Wiersema AM, Dirksen R, Oyen WJ, Van der Vliet JA. A method for long duration anaesthesia for a new hindlimb ischaemia-reperfusion model in mice. *Lab Anim* 1997;31:151-6.
 137. Wunder C, Scott JR, Lush CW, et al. Heme oxygenase modulates hepatic leukocyte sequestration via changes in sinusoidal tone in systemic inflammation in mice. *Microvasc Res* 2004;68:20-9.

138. Brock RW, Carson MW, Harris KA, Potter RF. Microcirculatory perfusion deficits are not essential for remote parenchymal injury within the liver. *Am J Physiol* 1999;277:G55-60.
139. Wood JG, Johnson JS, Mattioli LF, Gonzalez NC. Systemic hypoxia promotes leukocyte-endothelial adherence via reactive oxidant generation. *Journal of Applied Physiology* 1999;87:1734-40.
140. Seglen PO. Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol* 1976;13:29-83.
141. Emmendorffer A, Hecht M, Lohmann-Matthes ML, Roesler J. A fast and easy method to determine the production of reactive oxygen intermediates by human and murine phagocytes using dihydrorhodamine 123. *J Immunol Methods* 1990;131:269-75.
142. Royall JA, Ischiropoulos H. Evaluation of 2', 7'-Dichlorofluorescein and Dihydrorhodamine 123 as Fluorescent Probes for Intracellular H₂O₂ in Cultured Endothelial Cells. *Archives of biochemistry and biophysics* 1993;302:348-55.
143. Wrona M, Patel K, Wardman P. Reactivity of 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 and their oxidized forms toward carbonate, nitrogen dioxide, and hydroxyl radicals. *Free Radical Biology and Medicine* 2005;38:262-70.
144. Buege J, Aust S. Microsomal lipid peroxidation *Methods Enzymol* 52: 302–310. Find this article online 1978.
145. Svingen BA, Buege J, O'neal F, Aust S. The mechanism of NADPH-dependent lipid peroxidation. The propagation of lipid peroxidation. *Journal of Biological Chemistry* 1979;254:5892-9.
146. Jaeschke H, Mitchell JR. Use of isolated perfused organs in hypoxia and ischemia/reperfusion oxidant stress. *Methods in enzymology* 1989;186:752-9.
147. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemoglobin (hemocuprein). *J Biol Chem* 1969;244:6049-55.
148. Trakshel G, Kutty R, Maines M. Purification and characterization of the major constitutive form of testicular heme oxygenase. The noninducible isoform. *Journal of Biological Chemistry* 1986;261:11131-7.
149. Jaeschke H, Gores GJ, Cederbaum AI, Hinson JA, Pessayre D, Lemasters JJ. Mechanisms of hepatotoxicity. *Toxicological sciences* 2002;65:166-76.
150. Kredel M, Brederlau J, Roewer N, Wunder C. [Cholestasis and liver dysfunction in critical care patients]. *Anaesthesist* 2008;57:1172-82.
151. Dryden Jr GW, Deaciuc I, Arteel G, McClain CJ. Clinical implications of oxidative stress and antioxidant therapy. *Current gastroenterology reports* 2005;7:308-16.
152. Jaeschke H, Mitchell JR. Mitochondria and xanthine oxidase both generate reactive oxygen species in isolated perfused rat liver after hypoxic injury. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;160:140-7.
153. Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1968;61:748.

154. Brock RW, Lawlor DK, Harris KA, Potter RF. Initiation of remote hepatic injury in the rat: interactions between Kupffer cells, tumor necrosis factor- α , and microvascular perfusion. *Hepatology* 1999;30:137-42.
155. Kobayashi T, Hirano K, Yamamoto T, et al. The protective role of Kupffer cells in the ischemia-reperused rat liver. *Arch Histol Cytol* 2002;65:251-61.
156. Wunder C, Brock RW, McCarter SD, et al. Inhibition of haem oxygenase activity increases leukocyte accumulation in the liver following limb ischaemia-reperfusion in mice. *J Physiol* 2002;540:1013-21.
157. Bianco-Batlles MD, Sosunov A, Polin RA, Ten VS. Systemic inflammation following hind-limb ischemia-reperfusion affects brain in neonatal mice. *Dev Neurosci* 2008;30:367-73.
158. Bonheur JA, Albadawi H, Patton GM, Watkins MT. A noninvasive murine model of hind limb ischemia-reperfusion injury. *J Surg Res* 2004;116:55-63.
159. Nie R, Brock R, Harris K, Potter R. Heme oxygenase in remote liver injury during the systemic inflammatory response syndrome. *FASEB JOURNAL*; 2000: FEDERATION AMER SOC EXP BIOL 9650 ROCKVILLE PIKE, BETHESDA, MD 20814-3998 USA. p. A367-A.
160. Wunder C, Brock RW, Krug A, Roewer N, Eichelbronner O. A remission spectroscopy system for in vivo monitoring of hemoglobin oxygen saturation in murine hepatic sinusoids, in early systemic inflammation. *Comp Hepatol* 2005;4:1.
161. Holloway CM, Harvey PR, Mullen JB, Strasberg SM. Evidence that cold preservation-induced microcirculatory injury in liver allografts is not mediated by oxygen-free radicals or cell swelling in the rat. *Transplantation* 1989;48:179-88.
162. Jaeschke H, Smith CV, Mitchell JR. Reactive oxygen species during ischemia-reflow injury in isolated perfused rat liver. *J Clin Invest* 1988;81:1240-6.
163. Stammberger U, Gaspert A, Hillinger S, et al. Apoptosis induced by ischemia and reperfusion in experimental lung transplantation. *Ann Thorac Surg* 2000;69:1532-6.
164. Noda T, Iwakiri R, Fujimoto K, Matsuo S, Aw TY. Programmed cell death induced by ischemia-reperfusion in rat intestinal mucosa. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 1998;274:G270-G6.
165. Gottlieb RA, Burleson K, Kloner RA, Babior B, Engler R. Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *Journal of Clinical Investigation* 1994;94:1621.
166. Sasaki H, Matsuno T, Nakagawa K, Tanaka N. Induction of apoptosis during the early phase of reperfusion after rat liver ischemia. *Acta medica Okayama* 1997;51:305-12.
167. Ott MC, Scott JR, Bihari A, et al. Inhalation of carbon monoxide prevents liver injury and inflammation following hind limb ischemia/reperfusion. *FASEB J* 2005;19:106-8.
168. Nie RG, McCarter SD, Harris KA, et al. The role of endogenous heme oxygenase in the initiation of liver injury following limb ischemia/reperfusion. *J Hepatol* 2002;36:624-30.

169. Flaherty DC, Hoxha B, Sun J, et al. Pyruvate-enriched resuscitation protects hindlimb muscle from ischemia-reperfusion injury. *Mil Med* 2010;175:1020-6.
170. Katada K, Bihari A, Badhwar A, et al. Hindlimb ischemia/reperfusion-induced remote injury to the small intestine: role of inducible nitric-oxide synthase-derived nitric oxide. *J Pharmacol Exp Ther* 2009;329:919-27.
171. Scott JR, Cukiernik MA, Ott MC, et al. Low-dose inhaled carbon monoxide attenuates the remote intestinal inflammatory response elicited by hindlimb ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009;296:G9-G14.
172. Wang F, Birch SE, He R, et al. Remote ischemic preconditioning by hindlimb occlusion prevents liver ischemic/reperfusion injury: the role of High Mobility Group-Box 1. *Ann Surg* 2010;251:292-9.
173. Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry* 1997;272:20313-6.
174. Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 2005;15:316-28.
175. Henderson LM, Chappell JB. Dihydrorhodamine 123: a fluorescent probe for superoxide generation? *Eur J Biochem* 1993;217:973-80.
176. Motterlini R, Foresti R, Intaglietta M, Winslow RM. NO-mediated activation of heme oxygenase: endogenous cytoprotection against oxidative stress to endothelium. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 1996;39:H107.
177. Foresti R, Sarathchandra P, Clark J, Green C, Motterlini R. Peroxynitrite induces haem oxygenase-1 in vascular endothelial cells: a link to apoptosis. *Biochem J* 1999;339:729-36.
178. Jaeschke H, Ho YS, Fisher MA, Lawson JA, Farhood A. Glutathione peroxidase-deficient mice are more susceptible to neutrophil-mediated hepatic parenchymal cell injury during endotoxemia: importance of an intracellular oxidant stress. *Hepatology* 1999;29:443-50.
179. Hughes H, Jaeschke H, Mitchell JR. Measurement of oxidant stress in vivo. *Methods Enzymol* 1990;186:681-5.
180. Jaeschke H, Smith CV, Mitchell JR. Hypoxic damage generates reactive oxygen species in isolated perfused rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1988;150:568-74.
181. Wang W, Wang F, Shi L, Jia X, Lin L. Role of heme oxygenase-1/carbon monoxide system in pulmonary ischemia-reperfusion injury. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2009;9:159-62.
182. Yamashita K, Ollinger R, McDaid J, et al. Heme oxygenase-1 is essential or and promotes tolerance to transplanted organs. *FASEB J* 2006;20:776-8.
183. Zuckerbraun BS, Billiar TR, Otterbein SL, et al. Carbon monoxide protects against liver failure through nitric oxide-induced heme oxygenase 1. *J Exp Med* 2003;198:1707-16.
184. Srisook K, Han S, Choi H, et al. CO from enhanced HO activity or from CORM-2 inhibits both O₂-and NO production and downregulates HO-1

- expression in LPS-stimulated macrophages. *Biochemical pharmacology* 2006;71:307.
185. Dorman RB, Wunder C, Saba H, Shoemaker JL, MacMillan-Crow LA, Brock RW. NAD(P)H oxidase contributes to the progression of remote hepatic parenchymal injury and endothelial dysfunction, but not microvascular perfusion deficits. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;290:G1025-32.
 186. Brouard S, Otterbein LE, Anrather J, et al. Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis. *J Exp Med* 2000;192:1015-26.
 187. Monma M, Yamaya M, Sekizawa K, et al. Increased carbon monoxide in exhaled air of patients with seasonal allergic rhinitis. *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 1999;29:1537-41.
 188. Otterbein LE, Mantell LL, Choi AM. Carbon monoxide provides protection against hyperoxic lung injury. *Am J Physiol* 1999;276:L688-94.
 189. Otterbein LE, Lee PJ, Chin BY, et al. Protective effects of heme oxygenase-1 in acute lung injury. *Chest* 1999;116:61S-3S.
 190. Wunder C, Potter RF. The heme oxygenase system: its role in liver inflammation. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* 2003;3:199-208.
 191. Suematsu M, Goda N, Sano T, et al. Carbon monoxide: an endogenous modulator of sinusoidal tone in the perfused rat liver. *J Clin Invest* 1995;96:2431-7.
 192. Filipovic D, Mandic LM, Kanazir D, Pajovic SB. Acute and/or chronic stress models modulate CuZnSOD and MnSOD protein expression in rat liver. *Mol Cell Biochem* 2010;338:167-74.
 193. Shilo S, Pardo M, Aharoni-Simon M, Glibter S, Tirosh O. Selenium supplementation increases liver MnSOD expression: molecular mechanism for hepato-protection. *J Inorg Biochem* 2008;102:110-8.
 194. Chen Z, Siu B, Ho YS, et al. Overexpression of MnSOD protects against myocardial ischemia/reperfusion injury in transgenic mice. *J Mol Cell Cardiol* 1998;30:2281-9.
 195. Yan C, Huang A, Wu Z, et al. Increased superoxide leads to decreased flow-induced dilation in resistance arteries of Mn-SOD-deficient mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;288:H2225-31.
 196. Cheluvappa R, Cogger VC, Kwun SY, O'Reilly JN, Le Couteur DG, Hilmer SN. Liver sinusoidal endothelial cells and acute non-oxidative hepatic injury induced by *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin. *Int J Exp Pathol* 2008;89:410-8.
 197. Rauen U, Polzar B, Stephan H, Mannherz HG, de Groot H. Cold-induced apoptosis in cultured hepatocytes and liver endothelial cells: mediation by reactive oxygen species. *FASEB J* 1999;13:155-68.
 198. Suzuki YJ, Carini M, Butterfield DA. Protein carbonylation. *Antioxid Redox Signal* 2010;12:323-5.
 199. Grimsrud PA, Xie H, Griffin TJ, Bernlohr DA. Oxidative stress and covalent modification of protein with bioactive aldehydes. *J Biol Chem* 2008;283:21837-41.

200. Drake SK, Bourdon E, Wehr NB, et al. Numerous proteins in Mammalian cells are prone to iron-dependent oxidation and proteasomal degradation. *Dev Neurosci* 2002;24:114-24.
201. Nguyen AT, Donaldson RP. Metal-catalyzed oxidation induces carbonylation of peroxisomal proteins and loss of enzymatic activities. *Arch Biochem Biophys* 2005;439:25-31.
202. Wong CM, Cheema AK, Zhang L, Suzuki YJ. Protein carbonylation as a novel mechanism in redox signaling. *Circ Res* 2008;102:310-8.
203. Wong CM, Marcocci L, Liu L, Suzuki YJ. Cell signaling by protein carbonylation and decarbonylation. *Antioxid Redox Signal* 2010;12:393-404.
204. Otterbein LE. Carbon monoxide: innovative anti-inflammatory properties of an age-old gas molecule. *Antioxid Redox Signal* 2002;4:309-19.
205. Hack CE, Aarden LA, Thijs LG. Role of cytokines in sepsis. *Adv Immunol* 1997;66:101-95.
206. Zheng J, Bizzozero OA. Traditional reactive carbonyl scavengers do not prevent the carbonylation of brain proteins induced by acute glutathione depletion. *Free Radic Res* 2010;44:258-66.
207. Wang W, Yan X, Han L. [The clinical meaning and determination of the superoxid dismutase activity and malondialehyde content in the serum of the patients suffering from chronic tonsillitis]. *Lin Chuang Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi* 1998;12:156-7.
208. Sakamoto S, Okanoue T, Itoh Y, et al. Involvement of Kupffer cells in the interaction between neutrophils and sinusoidal endothelial cells in rats. *Shock* 2002;18:152-7.
209. Koek GH, Liedorp PR, Bast A. The role of oxidative stress in non-alcoholic steatohepatitis. *Clin Chim Acta* 2011;412:1297-305.
210. Bhandari S, Agarwal MP, Dwivedi S, Banerjee BD. Monitoring oxidative stress across worsening Child Pugh class of cirrhosis. *Indian J Med Sci* 2008;62:444-51.
211. Lu G, Shimizu I, Cui X, et al. Interferon-alpha enhances biological defense activities against oxidative stress in cultured rat hepatocytes and hepatic stellate cells. *J Med Invest* 2002;49:172-81.
212. Shao CH, Rozanski GJ, Nagai R, et al. Carbonylation of myosin heavy chains in rat heart during diabetes. *Biochem Pharmacol* 2010;80:205-17.
213. Serafin A, Fernandez-Zabalegui L, Prats N, Wu ZY, Rosello-Catafau J, Peralta C. Ischemic preconditioning: tolerance to hepatic ischemia-reperfusion injury. *Histol Histopathol* 2004;19:281-9.
214. Guerreiro MO, Petronilho F, Andrades M, et al. Plasma superoxide dismutase activity and mortality in patients with septic. *J Trauma* 2010;69:E102-6.

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------------------|--|
| ALT | Alaninaminitransferase |
| ALS | Amyotrophe Lateralsklerose |
| AOE | Antioxidative Enzyme |
| CAT | Katalase |
| cGMP | zyklische Guaninmonosphosphat |
| CrMP | Chrommesoporphyrin |
| CuZnSOD | KupferZinksuperoxiddismutase |
| CO | Kohlenstoffmonoxid |
| COPD | chronisch obstruktive Lungenerkrankung |
| CORM | CO-releasing Molekül |
| CO ₃ ^{•-} | Carbonatradikal |
| DAMPs | damage-associated molecular patterns (engl.) |
| DCFH ₂ | 2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein |
| DHR | Dihydrorhodamin 123 |
| ddH ₂ O | purifiziertes Wasser |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DTNB | 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure, |
| EcSOD | Extrazelluläresuperoxiddismutase |
| GPx | Gluthationperoxidase |
| GR | Gluthationreduktase |
| GSH | Gluthation |
| GSSG | Gluthationdisulfat |
| HEPES | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure |
| HMGB1 | high mobility group box protein (engl.) |
| HO | Hämoxygenase |
| HSPs | Hitzeshockproteine |
| H ₂ O ₂ | Wasserstoffperoxid |
| IL | Interleukin |
| I/R | Ischämie – Reperfusion |
| KPP | Kaliumphosphapuffer |
| LSEC | Sinusoidale Endothelzellen der Leber |
| LPS | Lipopolysaccharide |
| MC | Methylenchlorid |
| MDA | Malonaldehyd |
| MIF | Macrophage migration inhibitory factor (engl.) |
| MnSOD | Mangansuperoxiddismutase |
| NADP | Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat |
| NADPH | reduzierte Form des Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat |
| NEM | tN-Ethylmaleinimid |
| NF-κB | nukleärem Faktor kappa B |

| | |
|--------------------------|--|
| NO | Stickstoffmonoxid |
| OH \cdot | Hydroxylradikal |
| O ₂ \cdot^- | Superoxidanion |
| p38-MAPK | mitogenaktivierte Proteinkinase |
| PBS-T | phosphatgepufferte Salzlösung |
| PMSF | Phenylmethylsulfonylfluorid |
| Prx | Peroxiredoxin |
| RCS | reaktiven Karbonyl-Spezies |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| ROS | reaktive Sauerstoffmetabolite |
| RPM | Rotation per minute (engl.) (Umdrehungen pro Minute) |
| SDS | sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, |
| SDS-PAGE | <i>Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese</i> |
| sGC | soluble Guanylat Cylase (engl.) |
| SIRS | Systemic inflammatory response syndrome (engl.) |
| SOD | Superoxiddismutase |
| TBARS | Thiobarbituratsäure reaktiven Substanz |
| TNF α | Tumornekrosefaktor α |
| Tricin | N-(Tri(hydroxymethyl)methyl)glycin |
| Trx | Thioredoxin |
| ZnPP | Zinkprotoporphyrin |

Lebenslauf

Name Jürgen Brugger

Schulbildung:

09/1987 - 07/1996 Fürstenberg Gymnasium Donaueschingen

Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

09/1983 – 07/1987 Grund- und Hauptschule Bräunlingen

Hochschulstudium

10/1997-07/2004 Studium der Humanmedizin Albert-Ludwigs-Universität
Freiburg

Ärztliche Prüfung am 11.05.2004

04/2010-09/2013 MBA Fernstudium Hochschule Koblenz, Rheinahr-Campus
Remagen

Vertiefungsfach: Gesundheits- und Sozialwirtschaft

Masterthesis: Entwicklung und Implementierung einer
Balanced Scorecard als Managementinstrument einer
anästhesiologischen Klinik eines Universitätsklinikums

Berufliche Weiterbildung

06/2004 – 09/2008 Wissenschaftlicher Mitarbeiter der Klinik und Poliklinik für
Anästhesiologie am Universitätsklinikum Würzburg

04/2009 – 04/2011 Facharzt für Anästhesiologie der Klinik und Poliklinik für
Anästhesiologie am Universitätsklinikum Würzburg

05/2011 – 02/2014 Funktionsoberarzt der Klinik und Poliklinik für
Anästhesiologie am Universitätsklinikum Würzburg

Würzburg, im Juni 2015

Jürgen Brugger

