

Aus der Klinik für Neonatologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die reifeabhängige Expression der Hämoxygenase-1 in einem
Tiermodell der Nekrotisierenden Enterokolitis

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Judith Pietzcker

aus Osnabrück

Gutachter: 1. PD Dr. med. Florian Guthmann
2. Prof. Dr. med. Winfried Barthlen
3. Prof. Dr. med. Karin Rothe

Datum der Promotion: 9. September 2011

1. EINLEITUNG	7
1.1 Klinik der Nekrotisierenden Enterokolitis	7
1.1.1 Stadieneinteilung und Befunde	7
1.1.2 Therapie	11
1.1.3 Prävention	11
1.2 Hypoxie/ Hyperoxie	12
1.2.1 Hypoxie/ Asphyxie bei Neugeborenen	12
1.2.2 Hyperoxie	13
1.2.3 Hypoxie/ Hyperoxie im Tiermodell	14
1.3 Entwicklungsabhängige Unterschiede bei experimenteller Enterokolitis	16
1.4 „Gut-barrier-failure“ als frühes Zeichen der Nekrotisierenden Enterokolitis	19
1.5 Die Caspasen Kaskade	20
1.6 Stickstoffmonoxid (NO)	22
1.6.1 Induzierbare NO-Synthase (iNOS) als Zeichen der Inflammation bei NEC	22
1.7 Hämoxygenase (HO)	24
1.7.1 Hämoxygenase-1 (HSP-32/ heat-shock protein-32)	25
1.7.2 Induktoren der Hämoxygenase	26
1.7.3 Hemmer der HO-1	27
1.7.4 Zytoprotektion durch HO-1	28
1.8 Kohlenmonoxid (CO)	29
1.9 Bilirubinmetabolismus	31
1.10 Ferritin	33
2. ARBEITSZIEL	35

3. MATERIAL UND METHODEN	37
3.1 Materialien und Geräte	37
3.1.1 Chemikalien	37
3.1.2 Antikörper	39
3.1.3 Kits	39
3.1.4 Geräte	39
3.2 Tierversuche	41
3.2.1 Tiere und Haltung	41
3.2.2 Tierversuch Hypoxie/ Reoxigenierung	41
3.2.3 Gabe von Hämin/ SnPP	41
3.2.4 Probengewinnung	41
3.3 Permeabilitätsmessung mit FITC-Dextran	42
3.4 Kolorimetrie	43
3.4.1 Probenaufbereitung	43
3.4.2 Versuchsdurchführung	43
3.5 Western Blot	44
3.5.1 Proteinaufbereitung	44
3.5.2 Gelelektrophorese	44
3.5.3 Blot	45
3.5.4 Inkubation mit Antikörper gegen HO-1	45
3.5.5 Entwicklung	46
3.5.6 Inkubation mit Antikörper gegen β -Aktin	46
3.5.7 Densitometrie	47
3.6 Relative RNA-Quantifizierung	48
3.6.1 RNA Extraktion	48
3.6.2 Reverse Transkription (RT)	48
3.6.3 Real time PCR	49
3.6.4 Primer Design	50
3.7 Statistische Auswertung und Grafiken	51
3.7.1 Relative RNA-Quantifizierung	51

3.7.2 Western Blot	51
4. ERGEBNISSE	53
4.1 H/R führt zu einer Permeabilitätssteigerung der Darmwand bei neugeborenen Ratten, nicht aber bei reifen Ratten	53
4.2 H/R führt zu gesteigerter Aktivität von Caspase-3 bei unreifen, nicht aber bei reifen Ratten	54
4.3 H/R führt zu einem signifikanten Anstieg der Expression von iNOS bei unreifen, nicht aber bei reifen Ratten	55
4.4 Die Expressionssteigerung von HO-1 nach H/R ist bei unreifen Ratten später und schwächer als bei reifen Ratten	56
4.5 Die Expression der HO-1 steigt nach Induktion durch Hämin 48 Stunden nach H/R bei den unreifen Tieren signifikant an	58
4.6. Das „gut-barrier-failure“ bleibt nach Aktivierung der HO-1 durch Hämin bei den unreifen Tieren aus	59
5. DISKUSSION	61
5.1 Das Tiermodell nach Okur et al. als adäquates Modell	61
5.2 „Gut-barrier-failure“ und Apoptose nur bei neugeborenen Ratten	63
5.3 Inflammatorische Reaktionen in unserem Modell	64
5.4 HO-1 Expressionssteigerung als Schutz vor intestinaler Zellschädigung	65
5.5 Mechanismen der durch CO vermittelten Zytoprotektion	67
5.6 Biliverdin und Bilirubin	68
5.7 Ferritin	69
5.8 Ausblick	70

Zusammenfassung	71
Literaturverzeichnis	73
Abkürzungen	85
Abbildungsverzeichnis	89
Lebenslauf	91
Eidesstattliche Erklärung	93
Danksagung	95

1. Einleitung

1.1 Klinik der Nekrotisierenden Enterokolitis

Die Nekrotisierende Enterokolitis (NEC) ist eine entzündliche Darmerkrankung Frühgeborener und hypotropher Neugeborener, die disseminiert vor allem im distalen Ileum und Kolon oder auch kontinuierlich im gesamten Gastrointestinaltrakt auftreten kann. Die Pathogenese ist bisher unbekannt, wobei mehrere Ursachen für die Entstehung der NEC diskutiert werden. Die Mehrheit dieser diskutierten Faktoren steht im Zusammenhang mit hypoxisch-ischämischer Schädigung, physiologischer Unreife des Gastrointestinaltraktes und Veränderungen in der normalen mikrobiologischen Flora des Darms(1). Der Hauptrisikofaktor der NEC bleibt die morphologische Unreife. Etwa 5-10 % aller frühgeborenen Kinder mit einem Geburtsgewicht < 1500 g (VLBW; very low birth weight) sind betroffen und schwer krank. Die Inzidenz unterscheidet sich regional(2). In klinischen Studien(3) fand man heraus, dass Stillen einen gewissen Schutz darstellt. Sehr kleine Frühgeborene werden deshalb heute möglichst mit Muttermilch statt mit künstlicher Säuglingsnahrung ernährt(1). Die NEC ist der häufigste gastrointestinale Notfall bei Neugeborenen und mit septischem Schock assoziiert(4;5).

1.1.1 Stadieneinteilung und Befunde

Die Stadieneinteilung erfolgt nach Bell et al. oder nach Walsh und Kliegmann modifiziert(6;7) nach folgenden Kriterien in die Stadien 1 bis 3:

STADIUM IA

Klassifikation	Verdacht
Systemische Zeichen	Temperaturinstabilität, Apnoen, Bradykardie, Lethargie
Intestinale Zeichen	vermehrte Magenreste, leichte abdominelle Distension, Erbrechen, als Zeichen des „gut-barrier-failure“ positiver Hämocult®
Radiologische Zeichen	unauffällig bis leichte Ileuszeichen

STADIUM IB

Klassifikation	Verdacht
Systemische Zeichen	Temperaturinstabilität, Apnoen, Bradykardie, Lethargie
Intestinale Zeichen	vermehrte Magenreste, leichte abdominelle Distension, Erbrechen, als Zeichen des „gut-barrier-failure“ positiver Hämocult®, heller, roter Stuhl
Radiologische Zeichen	unauffällig bis leichte Ileuszeichen

Stadium IIA

Klassifikation	gesichert, wenig krank
Systemische Zeichen	Temperaturinstabilität, Apnoen, Bradykardie, Lethargie
Intestinale Zeichen	vermehrte Magenreste, leichte abdominelle Distension, Erbrechen, als Zeichen des „gut-barrier-failure“ positiver Hämocult®, heller, roter Stuhl, fehlende Darmgeräusche mit oder ohne Abwehrspannung
Radiologische Zeichen	Intestinale Dilatation, Ileus, Pneumatosis Intestinalis

STADIUM IIB

Klassifikation	gesichert, mäßig krank, systemische Toxizität
Systemische Zeichen	Temperaturinstabilität, Apnoen, Bradykardie, Lethargie, milde metabolische Azidose und Thrombozytopenie
Intestinale Zeichen	vermehrte Magenreste, leichte abdominelle Distension, Erbrechen, als Zeichen des „gut-barrier-failure“ positiver Hämocult®, heller, roter Stuhl, fehlende Darmgeräusche mit gesicherter Abwehrspannung
Radiologische Zeichen	Intestinale Dilatation, Ileus, Pneumatosis Intestinalis, positives Pneumoportogramm und ev. Aszites

Stadium IIIA

Klassifikation	Fortgeschritten, sehr krank, drohende Perforation
Systemische Zeichen	Temperaturinstabilität, schwere Apnoen, Bradykardie, Lethargie, kombinierte respiratorische und metabolische Azidose und Thrombozytopenie, disseminierte intravasale Gerinnung (DIC) und Neutropenie, Hypotension
Intestinale Zeichen	vermehrte Magenreste, Erbrechen, als Zeichen des „gut-barrier-failure“ positiver Hämocult®, heller, roter Stuhl, fehlende Darmgeräusche, Zeichen einer generalisierten Peritonitis, deutliche Abwehrspannung, deutlich distendiertes Abdomen
Radiologische Zeichen	Intestinale Dilatation, Ileus, Pneumatosis Intestinalis, positives Pneumoportogramm und Aszites

STADIUM IIIB

Klassifikation	Fortgeschritten, sehr krank, gesicherte Perforation
Systemische Zeichen Lethargie,	Temperaturinstabilität, schwere Apnoen, Bradykardie, kombinierte respiratorische und metabolische Azidose und Thrombozytopenie, DIC und Neutropenie, Hypotension
Intestinale Zeichen	vermehrte Magenreste, Erbrechen, als Zeichen des „gut-barrier-failure“ positiver Hämocult®, heller, roter Stuhl, fehlende Darmgeräusche, Zeichen einer generalisierten Peritonitis, deutliche Abwehrspannung, deutlich distendiertes Abdomen, bei stattgefundener Perforation können diese Zeichen fehlen
Radiologische Zeichen	Intestinale Dilatation, Ileus, Pneumatosis Intestinalis, positives Pneumoportogramm und Aszites, gesicherte Perforation



Abb. 1: Ausgeprägte Pneumatosis Intestinalis im Röntgenbild bei Nekrotisierender Enterokolitis

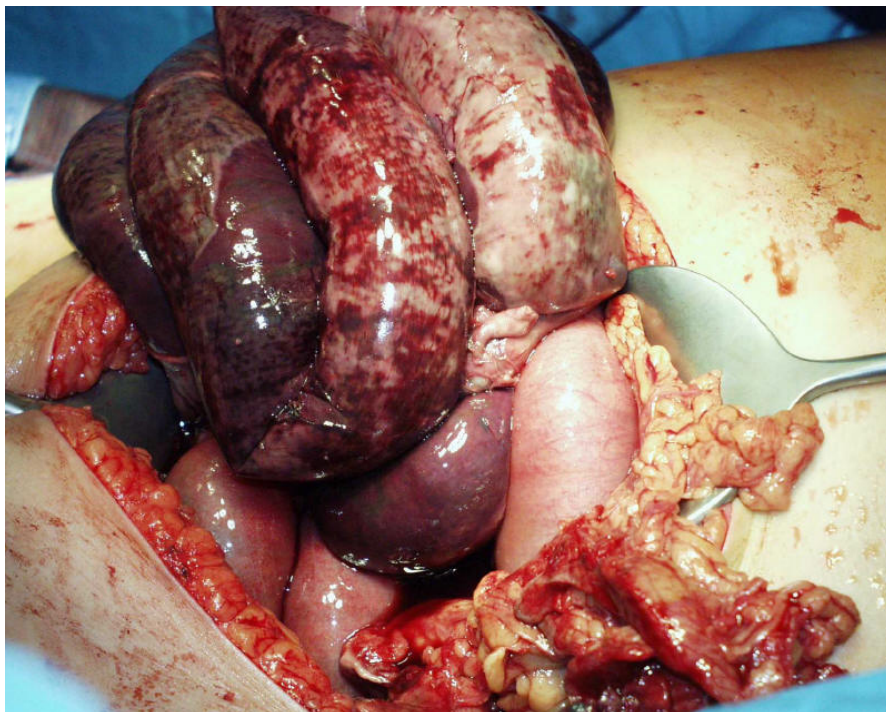


Abb. 2: Makroskopisches Bild einer Nekrotisierenden Enterokolitis

1.1.2 Therapie

Die NEC wird symptomatisch behandelt, eine kausale Therapie ist nicht möglich. Neben Nahrungskarenz und Sondierung der Kinder mit einer dicklumigen Magenablaufsonde stehen die antibiotische Behandlung sowie die Stabilisierung des Kreislaufs im Vordergrund. Bei Durchwanderungsperitonitis (Granulozyten > 40 % der Zellen im Aszites) oder Perforation wird eine chirurgische Intervention empfohlen, wobei folgende praktiziert werden:

- Peritoneallavage
- Anlage eines Anus praeter mit Resektion nekrotischer Darmanteile
- Anlage eines Anus praeter ohne Resektion befallener Darmanteile

Hierbei ist immer eine möglichst darmerhaltende Therapie anzustreben. Durch Anlage eines Anus Praeter wird gasförmiger und flüssiger Darminhalt abgesaugt, was zum einen die Durchblutung der Darmwand verbessert und zum anderen die proteolytische Wirkung des Darminhaltes auf die Darmschleimhaut unterbindet. Entzündete Darmanteile werden durch Anlage eines Stomas möglichst von der Nahrungspassage ausgeschlossen, um die Reperfusion des Darmes zu erleichtern(5).

1.1.3 Prävention

In klinischen Studien konnte die Enterokolitisrate gesenkt werden durch:

- Betamethason- Prophylaxe bei drohender Frühgeburt (8)
- Frühen Nahrungsbeginn (9;10)
- Orale Immunglobuline (11)
- Ansäuern der Milch mit HCl (12)
- Ernährung mit Muttermilch (3)
- Omeprazol-/ Gentamycingabe per os (13;14)
- Probiotika (15)

1.2 Hypoxie/ Hyperoxie

1.2.1 Hypoxie/ Asphyxie bei Neugeborenen

Da die Pathogenese der NEC unter anderem auf hypoxisch-ischämischer Schädigung beruht(1) und unser Tiermodell durch diese Hypothese begründet wird, wird hier kurz auf die Klinik der Hypoxie des Neugeborenen eingegangen. Unter dem Begriff Hypoxie/ Asphyxie wird in der Neonatologie der Sauerstoffmangel lebenswichtiger Organe verstanden. Sie geht mit pulmonaler und kardiozirkulatorischer Insuffizienz einher(16).

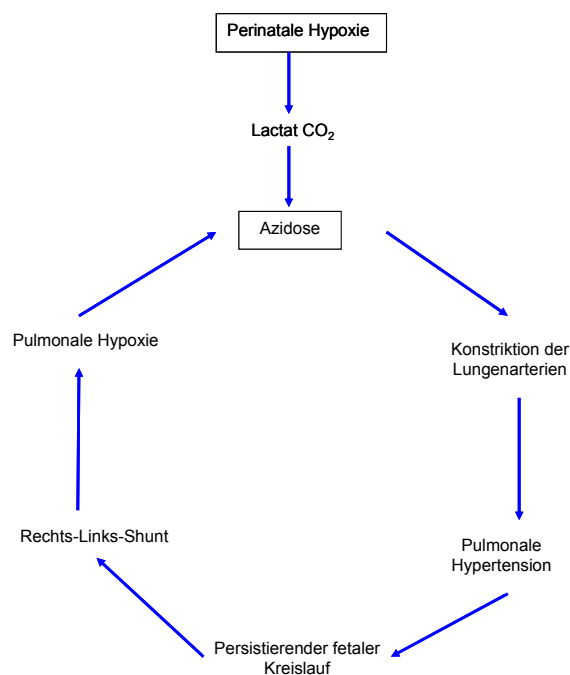


Abb. 3: Circulus vitiosus des perinatalen Sauerstoffmangels

Die Auswirkungen des perinatalen Sauerstoffmangels auf die kardiorespiratorische Adaption sind in Abb. 3 dargestellt. Durch die Hypoxie und die Hyperkapnie entwickelt sich rasch eine kombiniert respiratorisch/ metabolische Azidose(16). Die Azidose induziert über eine pulmonale Vasokonstriktion eine pulmonale Hypertonie. Die normalerweise unmittelbar nach der Geburt einsetzende Dilatation der Lungenarterien bleibt aus, was dazu führt, dass Foramen ovale und Ductus Botalli offen bleiben, der fetale Kreislauf und damit ein Rechts-Links-Shunt persistiert. Die Sauerstoffsättigung nimmt weiter ab. Dieser „Circulus vitiosus“ muss rechtzeitig durch eine wirksame

Neugeborenenreanimation (Intubation, Beatmung, eventuell Volumensubstitution) unterbrochen werden. Gelingt dies nicht, kann die Asphyxie zu folgenden auch bleibenden Beeinträchtigungen führen:

- Zentrales Nervensystem: hypoxisch-ischämische Enzephalopathie, Krampfanfälle, erhöhte Inzidenz von Hirnblutungen bei Frühgeborenen
- Herz-Kreislauf: myokardiale Ischämie (verminderte Kontraktilität), Hypotension
- Lunge: persistierende fetale Zirkulation (PFC), Atemnotsyndrom (RDS), Lungenblutung
- Niere: akute tubuläre oder kortikale Nekrose
- Magen-Darm-Trakt: Perforation, Ulzeration, Nekrotisierende Enterokolitis
- Nebenniere: Nebennierenrindenblutung
- Gerinnung: disseminierte intravasale Gerinnung
- Metabolische Störungen: Hypoglykämie, Hypokalzämie und andere(16)

Hypoxie ist ein Stressfaktor, dem Frühgeborene sehr häufig ausgesetzt sind und wurde in klinischen und experimentellen Studien mit der Pathogenese der NEC assoziiert(17;18).

1.2.2 Hyperoxie

Die hyperoxische Beatmung des hypoxischen Neugeborenen ist oft nötig, um den oben beschriebenen Circulus vitiosus zu unterbrechen(16). Die durch die Beatmung induzierte Hyperoxie spielt jedoch in der Pathophysiologie einer Reihe von Erkrankungen wie der Entwicklung der bronchopulmonalen Dysplasie und der Retinopathie von Frühgeborenen eine Rolle(19;20). Hyperoxie kann durch verschiedene Mechanismen zu Gewebeschäden führen. Bedingt durch reaktive freie O_2 -Radikale besitzt Sauerstoff zum einen eine direkte Toxizität, zum anderen führt eine maladaptive physiologische Antwort auf Sauerstoff zu Gewebeschäden(21). Sauerstoff ist während des aeroben Energiemetabolismus in den Mitochondrien zu zwei Molekülen Wasser reduziert. Diese Elektronentransportreaktionen werden durch den Zytochrom-Oxidase-Enzymkomplex katalysiert. Dabei entstehen als Zwischenprodukte freie Radikale, die zytotoxisch wirken können(22). Das Superoxidanion (O_2^-) ist ein solches freies Radikal, das durch den Transfer von einem Elektron auf molekularen Sauerstoff entsteht. Es kann als Oxidant oder Reduktant wirken, so dass es sowohl zu

Hydrogenperoxid (H_2O_2) als auch zu einem Hydroxylradikal ($OH\cdot$) reagieren kann(23). Freie Radikale führen zu zellulären Veränderungen. Bei der maladaptiven physiologischen Antwort auf Sauerstoff entstehen Schäden durch die Toxizität des Sauerstoffs auf indirektem Wege. Der Mechanismus beruht auf physiologischen Effekten, die abhängig vom Gesundheitszustand des Patienten zu respiratorischer Depression, Hemmung der Erythropoese, Vasodilatation der Pulmonalgefäße oder zu einer systemischen arteriellen Vasokonstriktion führen können. Das bekannteste Beispiel hierfür ist die Retinopathie Frühgeborener. Im ersten Stadium kommt es durch Hyperoxie zur Vasokonstriktion der retinalen Gefäße, die bei andauernder Sauerstoffexposition zur Vasoobliteration führt. Im zweiten Stadium führt eine durch die Vasokonstriktion hervorgerufene lokale Gewebshypoxie zur Ausschüttung von Wachstumsfaktoren wie VEGF (vascular epithelial growth factor) und es kommt zur überschießenden Neovaskularisierung des Glaskörpers(24). Diese Gefäße neigen zu Blutungen, die Vernarbungen nach sich ziehen(25).

1.2.3 Hypoxie/ Hyperoxie im Tiermodell

Zahlreiche Studien zeigen den Zusammenhang zwischen Hypoxie und verringerter intestinaler Perfusion, die zu Darmnekrosen führen kann. Bei neonatalen Welpen wurde nach 2 Stunden Hypoxie bei 10% Sauerstoff ein erheblicher Schaden der Darmmukosa festgestellt(26). Barlow et al. beschreiben in einem Tiermodell mit neugeborenen Ratten Hypoxie induzierte intestinale Nekrosen(27). Hypoxie wurde induziert, indem die mit Formula gefütterten neugeborenen Ratten täglich für 3-5 Minuten in eine Plastiktüte gesetzt wurden. Auch Langer et al. benutzten 10-Tage alte anästhesierte Ratten, um zu zeigen, dass 30 Minuten Hypoxie (14% Sauerstoff, 86% Stickstoff) Mukosaschäden hervorruft(28).

Einige Daten sprechen für eine Schlüsselrolle der freien Sauerstoffradikale bei der Pathogenese der Ischämie-Reperfusion (I/R) induzierten Darmschädigung. Parks et al. zeigten in einem Tiermodell, dass Superoxidradikale bei der Pathogenese ischämischer Mukosaläsionen beteiligt sind(29). Ebenfalls in einem I/R Rattenmodell wurde die Entstehung von Sauerstoffradikalen durch Hemmung der Xanthinoxidase durch molybdänfreie Nahrung reduziert, was histologisch zu signifikant weniger Nekrosen im Darm führte(30). Auch Vaughan et al. sahen diesen Effekt durch Hemmung der Xanthinoxidase durch Allopurinol(31). In einem Tiermodell von Okur et al. wird die Situation reanimationsbedürftiger Neugeborener nachempfunden(32). In diesem Modell

wird durch die Behandlung neugeborener Ratten mit Hyperkapnie gefolgt von Reoxigenierung (H/R) eine experimentelle Enterokolitis induziert. Unabhängig von der Nahrung konnten bei neugeborenen Ratten und 25-30 Tage alten Mäusen NEC-typische morphologische Veränderungen festgestellt werden. Dazu gehörten Pneumatoxis der Darmschlingen, hämorrhagische Läsionen, verkürzte Mikrovilli und transmurale Nekrosen(32).

1.3 Entwicklungsabhängige Unterschiede bei experimenteller Enterokolitis

Es gibt erste Versuche, die entwicklungsabhängige Unterschiede in der Entwicklung einer Enterokolitis beschreiben. Eine infektiöse Ursache der Nekrotisierenden Enterokolitis wird diskutiert. Bei Patienten mit NEC werden vermehrt Endotoxine und Antikörper gegen Endotoxine nachgewiesen. Ruemmele et al. untersuchten die direkte Wirkung von Lipopolysacchariden (LPS) auf den intestinalen epithelialen Zellumsatz (turn-over). Stimulation der Enterozyten durch LPS hat einen verringerten Zellumsatz zur Folge und führt in vitro zu einer gesteigerten Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α (33). Nanthakumar et al. untersuchten die Unterschiede in der Expression von IL-8 in fetalen und kindlichen humanen Enterozyten nach Stimulation durch LPS. Nur unreife Enterozyten reagierten mit exzessiver Zytokinausschüttung nach Stimulation durch LPS(34). Erste Unterschiede zwischen reifen und unreifen Enterozyten bestehen in einer stärkeren inflammatorischen Antwort der unreifen Enterozyten. In einem Tiermodell, in dem Mäusen humaner fetaler Darm von 18-20 Gestationswochen transplantiert wurde, wurde die inflammatorische Reaktion auf LPS- und Interleukin-1 β -Gabe im Hinblick auf das Gestationsalter nach Glukokortikoidgabe untersucht. Mit fortgeschrittener Reife des Xenotransplantates fiel die Antwort auf Glukokortikoidgabe deutlich geringer aus. Im unreifen Darm konnte die Ausschüttung inflammatorischer Marker nach LPS- und IL-1 β -Gabe durch Glukokortikoide deutlich verringert werden. Dieser Effekt war im reiferen Darm entsprechend 30 SSW nicht mehr zu sehen. In den Kontrolltieren ohne Glukokortikoidgabe wurde in den unreifen Därmen eine signifikant höhere inflammatorische Antwort beobachtet. Ebenso die basale Laktaseaktivität ohne Glukokortikoidgabe war im unreifen Xenograft deutlich geringer als im reifen Darm(35). In einem anderen Tiermodell zeigte sich nach Infektion mit *Salmonella typhimurium* hingegen ein deutlich geringerer Darmschaden und eine geringere Ausschüttung der inflammatorischen Marker MPO und TNF- α im unreifen Darm als im reifen Darm, wobei die Anzahl der systemisch infizierten unreifen Tiere deutlich höher war als die der reifen Tiere. Diese Studie spricht für eine insuffiziente inflammatorische Antwort der unreifen Tiere auf pathogene Keime(35;36). Obwohl die Induktion der Nekrotisierenden Enterokolitis durch pathogene Keime gelungen ist, bleibt die Rolle der bakteriellen Infektion im frühen Entwicklungsstadium der NEC unklar. Es gibt Fälle von Nekrotisierender Enterokolitis, in denen weder bakterielle Überwucherung

des Darmes noch positive Blutkulturen beobachtet wurden. In einer klinischen, mikrobiologischen Untersuchung von 122 sehr kleinen Frühgeborenen gab es keine Assoziation zwischen der Kolonisation des Duodenums mit einem bestimmten Enterobakterium und der Entwicklung einer NEC(37).

Dennoch lässt sich die NEC-Rate in klinischen Studien durch Antibiotikagabe reduzieren(14).

Studien, die die Rolle der Unreife unabhängig von bakterieller Infektion untersuchten, sind selten. Dame et al. wiesen in verschiedenen Organen (Herz, Lunge, Leber, Milz, Nebenniere, Niere, Magen, Gehirn und Plazenta) humaner Feten von 16 SSW IL-6 und IL-8 –Rezeptoren nach(38). Über die reifeabhängige Expression dieser Rezeptoren gibt es bisher keine Informationen. Lin et al. untersuchten die entwicklungsabhängige Expression des mukosaprotektiven TFF-3 (trefoil-factor-3) in einem Rattenmodell. Eine signifikante Expression von TFF-3 beginnt erst in einem späten Gestationsalter(39).

Nach oraler Gabe von Ethanol oder subkutaner Gabe von Indomethacin wirkt TFF-3 protektiv auf die Darmmukosa (40). Mäuse mit fehlendem TFF-3 Gen trugen schwere Darmmukosaschäden durch Gabe von Dextran-Sulfat und starben an extensiver Enterokolitis(41).

In einem Tiermodell wurde der Einfluss von Nahrungsbestandteilen in Ratten unterschiedlichen Alters untersucht. Verabreichte Fette (Maiskeimöl) führen nach Bhatia et al. nach intestinaler Ischämie bei der unreifen Ratte zu größerem Darmschaden als bei der reifen Ratte(42). Auch Nafday et al. konnten eine mit dem Reifealter abnehmende Empfindlichkeit der Darmmukosa gegenüber kurzkettigen Fettsäuren bei Ratten feststellen(43).

Weitergehende Klärung der spezifischen proinflammatorischen und protektiven Mechanismen in Abhängigkeit des Entwicklungsgrades steht bisher noch aus. Eine Zusammenfassung der aktuellen Literatur zur entwicklungsabhängigen Darmschädigung folgt in Tabelle 1.

Untersuchtes Medium	Stressfaktor	Parameter	Literatur
Humane intestinale Kryptenzellen	LPS	TNF- α Zellumsatz	(33)
Fetale/ kindliche Enterozyten	LPS/ IL-1 β	IL-8	(34)
Immundefiziente Maus/ Xenotransplantat Darm 18-20 SSW (humaner Fetus)	LPS/ IL-1 β	Laktaseaktivität IL-8, IL-6, MCP-1	(35)
Maus/ unreife und reife Tiere	Salmonella typhimurium	Myeloperoxidase, TNF- α , Histopathologie	(36)
Frühgeborene (VLBW)	entfällt	Darmbakterientypisierung/ Korrelation mit NEC	(37)
Humane Feten (16 SSW)	entfällt	IL-6 und IL-8 Rezeptoren	(38)
Rattenembryonen verschiedenen Gestationsalters	entfällt	TFF-3 m-RNA, Western Blot Immunhistochemie	(39)
Ratte	Ethanol/ Indomethacin	Makroskopie/ Histopathologie nach oralen TFF-3 Gabe	(40)
Maus (knock out ITF)	Dextran-Sulfat-Sodium	Enterocolitis/ Tod	(41)
Ratten verschiedenen Alters	Fette/ Ischämie	Histologie, Gluthation, konjugierte Diene	(42)
Ratten verschiedenen Alters	kurzkettige Fettsäuren	Histopathologie	(43)

Tabelle 1: Untersuchungen zur entwicklungsabhängigen Darmschädigung

1.4 „Gut-barrier-failure“ als frühes Zeichen der Nekrotisierenden Enterokolitis

Die intestinale Barriere schützt den Körper durch epitheliale Zellen vor dem Eindringen von Fremdstoffen. Eine Reihe von spezifischen und nicht spezifischen Mechanismen sorgt dafür, dass diese Barriere aufrechterhalten wird. Dazu gehören luminale Mechanismen, digestive Enzyme, die epithelialen Zellen mit den dazwischen liegenden Tight Junctions und das intestinale Immunsystem(44). Organe wie der Darm, die eine Mukosa besitzen, unterliegen einer extensiven Vaskularisation und sind daher sehr anfällig für Situationen, die mit verminderter Perfusion und Hypoxie einhergehen(45). Unter solchen Umständen hängt das Bestehen der Barrierefunktion des Darms von Strukturen innerhalb der interzellulären Tight Junction ab, die sich an der Grenze der apikalen und basolateralen Membran befindet(46). Adaptive und proinflammatorische Antworten auf Hypoxie sind die Folge von verringertem Sauerstoffangebot im Gewebe. Dazu gehören die Ausschüttung von EPO (Erythropoetin), glycolytischen Enzymen, TNF- α und IL-8. Diese sind zu einem großen Teil zurückzuführen auf transkriptionelle Regulation der Genexpression (z.B. durch HIF-1)(45;47). Störungen der Barriere sind u.a. Folge von nichtsteroidalen anti-inflammatorischen Medikamenten (NSAR) und oxidativem Stress, was Mechanismen zur Folge hat wie Adenosintriphosphat-Depletion und Schäden des epithelialen Zell-Zytoskeletts, das die Zell-Zell Interaktion („Tight Junction“) reguliert(44). Wenn die Barriere des Darms insuffizient wird, kommt es zum „gut-barrier-failure“. Bakterien können die Barriere überwinden, es kommt zur Pneumatosis intestinalis und es besteht das Risiko einer Septikämie(4).

1.5 Die Caspasen Kaskade

Apoptose oder programmierter Zelltod wird von einer Vielzahl von Stimuli getriggert. Dazu gehören zelluläre Oberflächenrezeptoren wie FAS, die mitochondriale Antwort auf Stress und Faktoren, die von zytotoxischen T-Zellen ausgeschüttet werden. Die Caspasen stellen eine Gruppe von Cysteinproteasen dar, von denen viele in den Mechanismus der Apoptose involviert sind. Die Caspasen bilden eine proteolytische Kaskade. Durch Caspasenspaltung und Aktivierung von anderen Caspasen, die dann zelluläre Strukturen abbauen, kommt es zum Zelltod. Zu den aktivierenden Caspasen gehören die Caspase-8 und die Caspase-9. Caspase-8 wird bei der extrinsischen Apoptoseinduktion durch eine Death Effektor Domäne (DED) aktiviert. Beim intrinsischen Weg beginnt die mitochondriale Antwort auf freie Radikale oder Calcium mit der Freisetzung von Cytochrom C (Cyt C), das dann mit der Caspase Rekrutierungsdomäne (CARD) von Apaf-1 interagiert, was zur Selbstspaltung und zur Aktivierung von Caspase-9 führt. Die Effektor-Caspasen, -3, -6 und -7 der gemeinsamen Endstrecke sind den Aktivator-Caspasen nachgeschaltet und in der Lage, verschiedene zelluläre Strukturen zu spalten. Granzym B und Perforin, Proteine, die von zytotoxischen T-Zellen ausgeschüttet werden, induzieren Apoptose in der Zielzelle, indem sie transmembranäre Poren bilden und Apoptose triggern, zum Teil durch die Spaltung von Caspasen. Auch Caspase unabhängige Mechanismen der Granzym B vermittelten Apoptose werden diskutiert(48;49). Eine Übersicht der intrazellulären Kaskade der Caspasen ist in Abbildung 4 dargestellt.

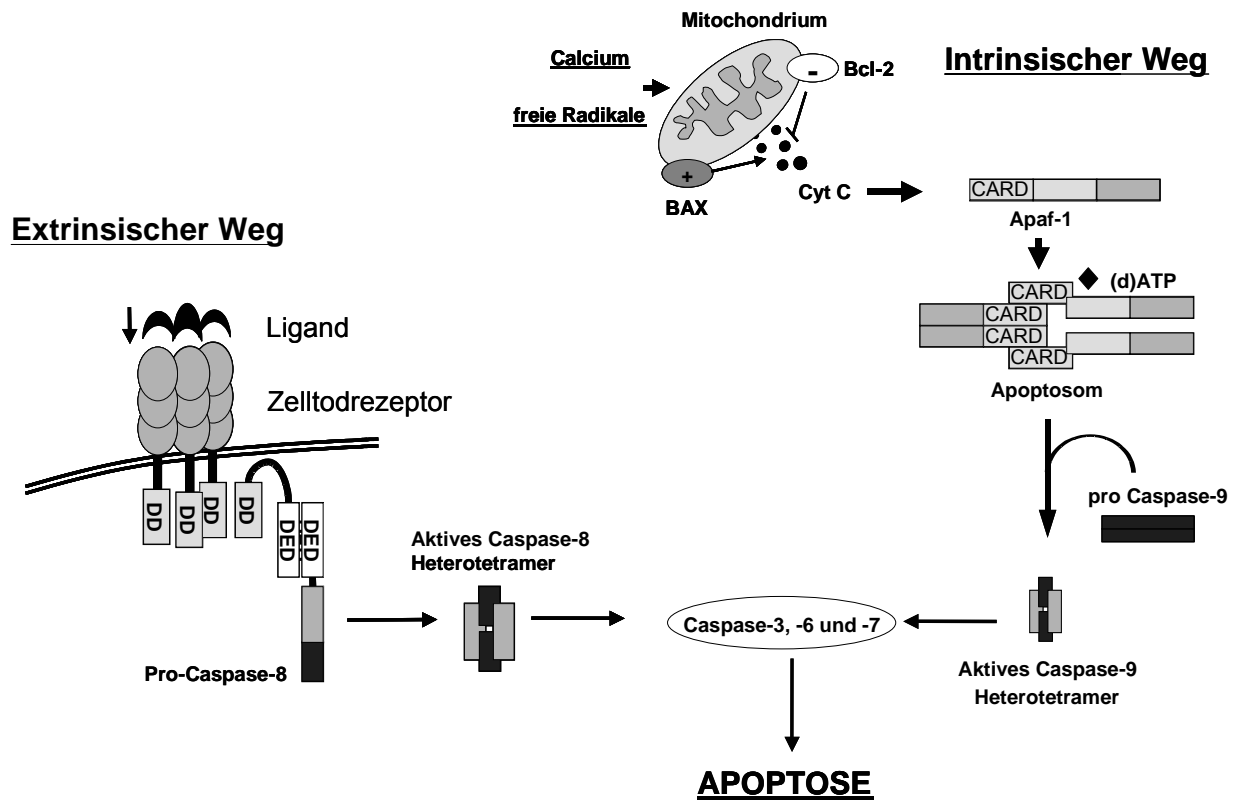


Abb. 4: Apoptose Kaskade der Caspasen

1.6 Stickstoffmonoxid (NO)

Ende der 1970er Jahre untersuchte Furchgott die Auswirkungen von Medikamenten auf die Blutgefäße. Er fand heraus, dass das Endothel eine unbekannte Substanz produziert, die in der darunter liegenden Muscularis deren Relaxierung herbeiführt. Da er die Substanz nicht bestimmen konnte, nannte er sie EDRF (Endothelium-derived relaxing Factor). Erst im Laufe der 1980er Jahre gelang es, die unbekannte Substanz EDRF zu entschlüsseln. Unabhängig voneinander identifizierten Louis J. Ignarro und Robert F. Furchgott EDRF als Stickstoffmonoxid. Erst 1987 wurde festgestellt, dass NO auch im menschlichen Körper hergestellt wird. Es sind verschiedene Wirkungen bekannt. NO wird durch Endothelzellen mit Hilfe des Donors Arginin hergestellt. Dadurch kommt es zu einer Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur, was zu einer Vasodilatation und damit zu einer Absenkung des Blutdrucks und der Vorlast des Herzens führt. Durch diese Reaktion wurde die Wirkungsweise einer ganzen Gruppe von Medikamenten verständlich, darunter Amylnitrit, Nitroprussid und Nitroglycerin, die bei Angina Pectoris Beschwerden therapeutisch genutzt werden. Diese Medikamente setzen NO im Körper frei.

Eine zytotoxische Wirkung von NO schützt den Körper vor Infektionen. Makrophagen injizieren in Bakterien und mutierte Zellen eine tödliche Dosis NO, um sie zu zerstören. Eine übermäßige Produktion von NO durch die Makrophagen kann tödliche Auswirkungen haben. So ist der gefährliche Blutdruckabfall bei einem septischen Schock zu erklären.

Im Gehirn übernimmt NO die Funktion eines Second Messengers, wobei es unter anderem die Synthese von Guanosinmonophosphat steuern kann. Das kleine Molekül kann leicht in Zellen hinein- und hinausdiffundieren (50).

1.6.1 Induzierbare NO-Synthase (iNOS) als Zeichen der Inflammation bei NEC

NO ist ein freies Radikal mit moderater Reaktionsfähigkeit. NO wird aus der Aminosäure L-Arginin durch eine Enzymfamilie, die NO-Synthetasen (NOS) genannt werden, hergestellt. Die Oxidation des terminalen Stickstoffs von L-Arginin produziert NO und Citrullin(51).

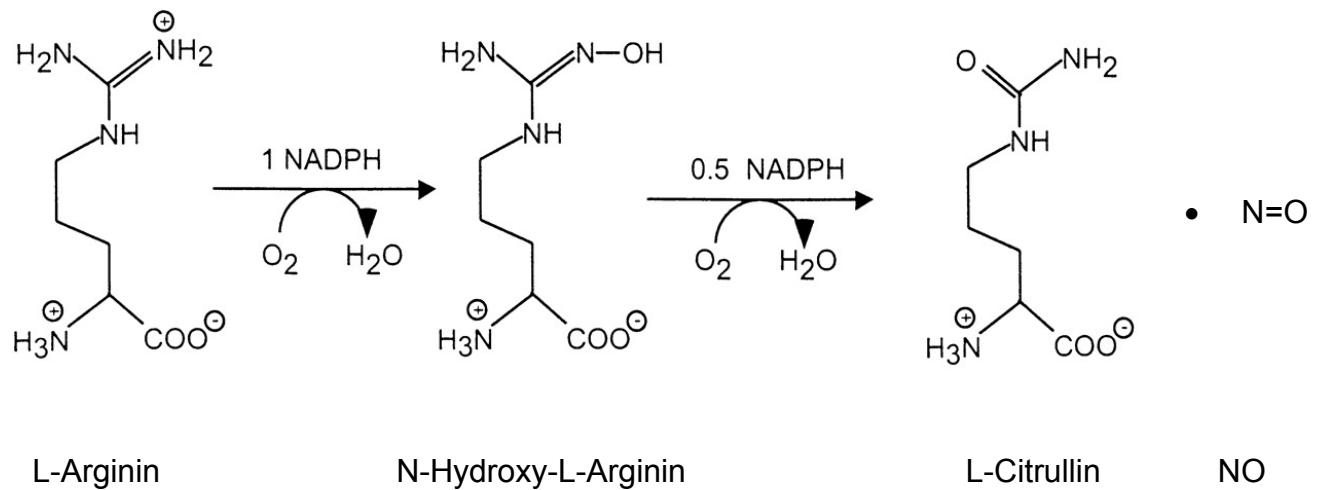


Abb. 5: Synthese von NO aus Arginin durch die NO-Synthase(52)

Drei Isoformen der NOS sind bekannt. Die constitutive Form (cNOS) gibt es in neuronalem (nNOS) oder in endothelialem Gewebe (eNOS). Eine dritte Form wird nach Induktion durch bestimmte Zytokine, Mikroben und bakterielle Produkte exprimiert und wird induzierbare NO-Synthase (iNOS) genannt(53). Die NO Produktion durch cNOS ist gering und zeitig begrenzt und wird durch Ca^{2+} -mobilisierende Agenzien stark kontrolliert, durch Calmodulin-Antagonisten vollständig inhibiert(54). Akisu et al. fanden 2002 heraus, dass die Stimulation der constitutiven NO-Synthase (cNOS) vor experimenteller Enterokolitis schützt, indem kleine Mengen NO hergestellt werden und so die intestinale Perfusion aufrecht erhalten wird. In diesem Experiment wurde cNOS durch L-Arginin und L-Carnitin stimuliert und so NO freigesetzt(55). Dagegen synthetisiert iNOS in großen Mengen NO, während die Regulation auf transkriptioneller Ebene stattfindet. Transkriptioninhibitoren sind Aktinomycin D und Cycloheximid(56). Die NO Produktion durch Stimulation von iNOS verläuft um einige Stunden verzögert, ist aber dann über Perioden von mehr als 5 Tagen aktiv.

1.7 Hämoxygenase (HO)

Die HO wurde ursprünglich 1968 und 1969 durch Terhunen et al. identifiziert(57). Die Hämoxygenase katalysiert die Oxidation von Häm zu Biliverdin.

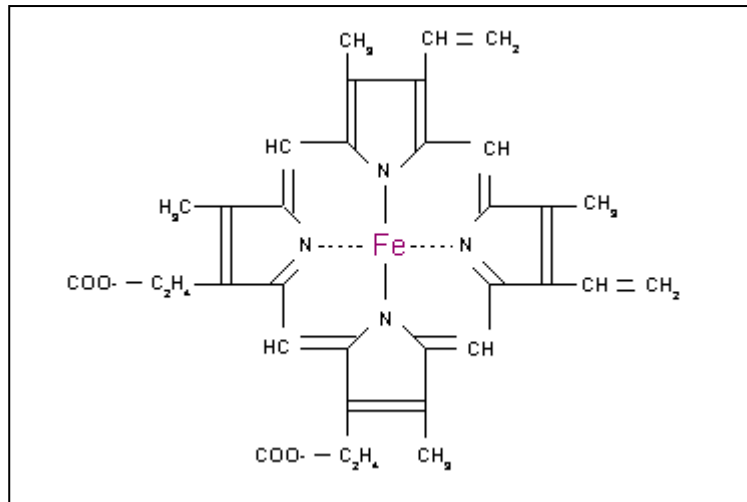


Abb. 6: Häm-Gruppe und Porphyrin-Ring

Dabei spaltet HO die α -Meso-Karbonbrücke des Typ b Hämoleküls zu equimolaren Mengen Biliverdin IXa , Kohlenmonoxid (CO) und freiem Eisen. Auf diesen Schritt folgt dann die Umwandlung von Biliverdin in Bilirubin durch die NADH-abhängige Biliverdin-Reduktase(58).

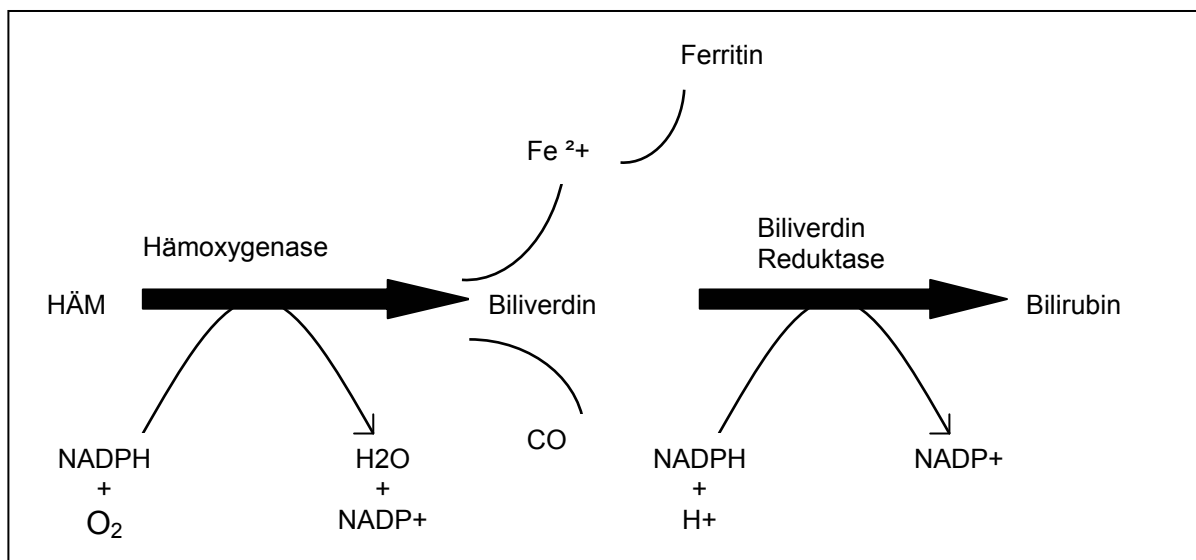


Abb. 7: Enzymatische Reaktion der Hämoxygenase, modifiziert nach Otterbein et al.(59) und Fang et al.(60)

Heute sind 3 Isoformen der Hämoxxygenase bekannt, die diese Reaktion katalysieren. Dazu gehört die durch oxidativen Stress induzierbare HO-1 aus der Familie der Hitzeschockproteine, die ihre höchste Konzentration in Leber und Milz hat(61). Die HO-2 dagegen ist ein konstitutiv exprimiertes Protein und primär in Gehirn und Testes zu finden(62). Die HO-3 wurde von McCoubrey et al. entdeckt und stimmt in der Aminosäuresequenz zu 90% mit der HO-1 überein, katalysiert aber den Abbau von Häm sehr viel schwächer als diese(63).

1.7.1 Hämoxxygenase-1 (HSP-32/ heat-shock protein-32)

Der stärkste Induktor der Hämoxxygenase ist das eigene Substrat Häm. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass die Aktivität der HO-1 durch zahlreiche andere Häm-unabhängige Faktoren gesteigert werden kann(64-66). Dazu gehören z.B. ultraviolette Strahlung, Endotoxin, Schwermetalle und Oxidantien wie Hydrogen-Peroxide. Diese Induktoren haben gemeinsam, dass sie reaktive Sauerstoffmoleküle generieren(59). Andere Studien konnten nachweisen, dass Hypoxie ein starker Induktor der HO-1 in Lunge(67) und Fibroblasten(68) ist. HIF-1 (hypoxia-inducible factor-1) reguliert die Expression der HO-1 bei Hypoxie als Transkriptionsfaktor(69). Motterlini et al. fanden heraus, dass intrazelluläre Interaktionen von Thiol mit NO eine Vermittlerfunktion bei der Induktion der HO-1 bei Hypoxie einnehmen(70). Taylor(71), Lee(72) und Dennery(73) beschreiben die Induktion der HO-1 bei Hyperoxie in der Lunge.

1.7.2 Induktoren der Hämoxigenase

- UVA Strahlung(74;75)
- Endotoxin(76-79)
- Schwermetalle(80;81)
- Zytokine(82;83)
- Hyperoxie(71-73;84)
- Hypoxie(67;68;70;78;85)
- Hypothermie(86)
- Häm/ Hämin(57;58;87)
- NO(88-91)
- Prostaglandine(92;93)
- Hydrogenperoxid(64;75;94)
- Hitzeschock(95;96)

In verschiedenen Studien konnte durch Induktion der protektive Effekt der Hämoxigenase-1 verstärkt werden. Bashir et al. induzierten die HO-1 durch Hypothermie, was einen abgeschwächten Mukosaschaden im Darm bei Ratten nach Ischämie/ Reperfusion zur Folge hatte(86). Die Induktion der HO-1 durch Octreotid verminderte den Darmschaden, der in einem Tiermodell mit Ratten durch Röntgenstrahlung hervorgerufen wurde(97). Die Induktion durch Hämin wurde in verschiedenen Studien untersucht. Gan et al. zeigten, dass die Induktion der HO-1 durch Hämin den Motilitätsverlust des Darms bei Verbrennungen reduziert(98). Dieser günstige Effekt war verbunden mit einer Down-Regulation der Expression von iNOS, COX-2 und IL-1 β . Auch Attuwaybi et al. induzierten die HO-1 durch Hämin in einem Tiermodell mit Ratten(85). Nach I/R (Ischämie/ Reperfusion) durch Abklemmung der Arteria mesenterica superior fiel der Mukosaschaden bei Tieren, die mit Hämin behandelt wurden, deutlich geringer aus. Die Motilität des Darms wurde deutlich verbessert. Hämin entsteht in Anwesenheit von Chlorid-Ionen aus Häm und ist die oxidierte Form von Eisen-Protoporphyrin IX.

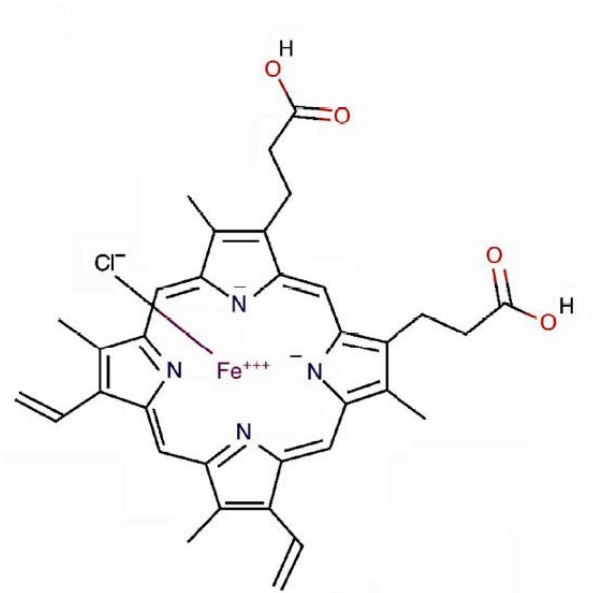


Abb. 8: Häm (99)

Der Mechanismus, durch den Häm die HO-1 induziert, ist bisher nur unzureichend geklärt. Verschiedene Daten lassen allerdings vermuten, dass Häm die Transkription der Globin-Gene durch den Abbau entscheidender Repressoren aktiviert und so den Aktivatoren die Vervollständigung des Transkriptionsprozesses ermöglicht(100). Ein ähnlicher Mechanismus wurde gefunden, der die Induktion der HO-1 durch Häm erklärt(101;102). Die Daten zeigen, dass Häm sowohl das Globin- als auch das HO-1-Gen aktiviert; und zwar durch Bindung und Beseitigung des Transkriptionsfaktors Bach1(103).

1.7.3 Hemmer der HO-1

Zink-Protoporphyrin-IX (SnPP) ist ein synthetisches Analog zum körpereigenen Häm und ein potenter Inhibitor der Hämoxygenase-1 sowohl in vitro als auch in vivo. SnPP wirkt über einen dualen Mechanismus; in vivo führt SnPP zu einer Zunahme der HO-1 Produktion in der Leber, gleichzeitig hemmt SnPP die HO-1 in ihrer katalytischen Aktivität(104).

Diese Eigenschaft wurde bereits vielfach erfolgreich genutzt, um den Hämabbau zu inhibieren und damit experimentell induzierten oder natürlich vorkommenden Ikterus bei Menschen und Tieren zu unterdrücken(105-108). Um die protektiven Eigenschaften der

HO-1 zu untersuchen, hat SnPP in verschiedenen experimentellen Studien Verwendung gefunden. Hua Tian Gan et al. konnten zeigen, dass die Induktion der HO-1 durch Hämin die beeinträchtigte intestinale Nahrungspassage nach Verbrennungsverletzungen verbessert. Bei Hemmung durch SnPP war die vorher verbesserte Nahrungspassage nicht zu beobachten(98). In einem Tiermodell mit Ratten wurden in einem I/ R Modell histologische Schäden sowie funktionelle Schäden im Sinne einer Transportstörung hervorgerufen. Bei Induktion der HO-1 durch Hypothermie während des Versuchs blieben diese aus. Bei Durchführung der I/R unter Hypothermie und Hemmung der HO-1 durch SnPP waren die Schäden mit denen der Tiere unter Normothermie vergleichbar(86).

1.7.4 Zytoprotektion durch HO-1

HO-1 schützt verschiedene Organsysteme und Zelltypen vor oxidativem Stress. In verschiedenen tierischen Transplantations- und Schockmodellen zeigte HO-1 einen protektiven Effekt auf Gehirn, Lunge und Niere(109-112). Der zugrunde liegende Mechanismus ist bis heute ungeklärt, wobei die Produkte der enzymatischen Reaktion Bilirubin, Biliverdin und Kohlenmonoxid als Mediatoren für den anti-inflammatorischen, antiapoptotischen, antioxidativen und immunregulatorischen Effekt in der Literatur diskutiert werden(113). In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass mikromolare Dosen von Bilirubin, Biliverdin oder CO den zytoprotektiven Effekt von HO-1 dosisabhängig ersetzen konnten(114-119). Aus diesem Grund wird im Folgenden genauer auf die Mechanismen der Zytoprotektion durch CO, Bilirubin, Biliverdin und Ferritin als Produkte der durch HO-1 katalysierten Reaktion eingegangen.

1.8 Kohlenmonoxid (CO)

Kohlenmonoxid ist ein farb-, geruch- und geschmackloses Gas, das bei der unvollständigen Verbrennung kohlenstoffhaltiger Substanzen entsteht. Es kommt in großen Mengen bei der Verbrennung in der Industrie vor und trägt zusammen mit CO₂ erheblich zur Luftverschmutzung bei. Viel langsamer entsteht es dagegen in der Natur, bei Waldbränden oder in Vulkanen(113). Claude Bernard entdeckte schon 1857 die hohe Affinität des CO zu Hämoglobin. Bevor die starke toxische Wirkung im menschlichen Organismus klar wurde, war es in Europa üblich, schreiende Kinder über ein brennendes Feuer zu halten, um sie zu beruhigen. Die anoxische Wirkung des CO im Gehirn sedierte und besänftigte die Kinder.

1927 fand Nicloux eine konstante Konzentration von Carboxyhämoglobin im Serum von Hunden und schlussfolgerte, dass CO im Körper selbst hergestellt werde. Mittlerweile sind die toxischen Eigenschaften von CO gut geklärt. Durch seine sehr starke Affinität zum Hämoglobin verdrängt es den Sauerstoff aus seiner Bindung, dies führt zu Hypoxie. CO stabilisiert das Oxyhämoglobin, die Dissoziationskurve des O₂ vom Hämoglobin wird nach links verschoben, der Sauerstoff kann schlechter an das Gewebe abgegeben werden. Außerdem wird die Dissoziation des CO₂ gestört, es kommt zu einem Aufstau von CO₂ im Organismus. In höheren Dosen ist CO toxisch oder sogar letal(59).

In den letzten Jahren konnten zunehmend positive Effekte geringer Mengen CO auf den Organismus festgestellt werden. Mancuso et al. diskutieren eine protektive Wirkung des durch HO produzierten CO auf das endokrine System. Seine Wirkung entfaltet CO hauptsächlich über die Aktivierung einer löslichen Guanylatcyclyase. Auch eine Aktivierung der Cyclooxygenase oder Inhibition von Cytochrom P450 wird diskutiert. In vitro Studien zeigten eine CO-vermittelte Hemmung der Ausschüttung von Corticotropin-Releasing-Hormon, Arginin-Vasopressin und Oxytocin sowie eine Stimulation der Ausschüttung von LH-Releasing-Hormon(120). Motterlini et al. sprechen der CO Produktion durch HO eine entscheidende Rolle in der Regulation des Blutdrucks in Stresssituationen zu. In einem Tiermodell induzierten sie medikamentös akute hypertensive Krisen nach Implantation eines Katheters in die Femoralgefäße. 5 Tage nach dem Eingriff induzierten vasokonstriktive Substanzen einen akuten und signifikanten Anstieg des arteriellen Druckes. Einen Tag nach dem Eingriff war kein

Blutdruckanstieg auslösbar, was mit einer signifikanten Expressionssteigerung der HO-1 in Aorta, Herz und Leber und einer erhöhten CO Produktion sowie erhöhten cGMP Spiegeln in der Aorta korrelierte. Dieser Effekt wurde durch die Hemmung der HO-1 durch Zink Protoporphyrin IX stark vermindert, was mit einer Verringerung der CO Produktion und der cGMP Spiegel in der Aorta einherging(121).

In der letzten Zeit haben verschiedene Untersuchungen die zytoprotektiven Eigenschaften von CO in Lunge, Niere, Dünndarm, Leber und pankreatischen Inselzellen von Ratten nach CO Inhalation oder CO Induktion gezeigt(118;122-128). Die günstigen vasodilatatorischen, anti-inflammatorischen und immunmodulatorischen Effekte von CO könnten therapeutisch im Bereich der Transplantationsmedizin genutzt werden(113). Song et al.(126) transplantierten orthotope Lungen und setzten die transplantierten Tiere nach der Operation 500 ppm (parts per million) CO aus. Das hatte im Vergleich zu Kontrolltieren eine signifikante Abnahme der Apoptoserate, eine Suppression von proinflammatorischen Genen und die Erhaltung der Gewebearchitektur des Transplantats zur Folge. Neto et al. zeigten in einem genetischen Rattenmodell ähnliche protektive Effekte auf transplantierte Nieren(118). Die Empfänger wurden 1 Stunde vor und 24 Stunden nach der Operation 225 ppm CO ausgesetzt. Das Ergebnis zeigte eine signifikante Abnahme der inflammatorischen Mediatoren, verbesserten kortikorenenal Blutfluss, Erhalt der glomerulären und tubulären Architektur und vermehrtes Überleben der CO-behandelten Ratten im Vergleich zu Kontrolltieren. Auch in einem Dünndarm-Transplantationsmodell zeigte die exogene CO Applikation eine analoge Verringerung proinflammatorischer Moleküle und eine erhöhte Überlebensrate bei Ratten(122;123). Zuckerbraun et al. überprüften die anti-inflammatorischen und anti-apoptotischen Eigenschaften des CO in einem experimentellen NEC Modell. Inhaliertes CO wirkte bei Ratten protektiv gegen intestinale Entzündung und führte zu einer Abnahme des intestinalen Zelltodes. In vivo und in vitro führte CO zu einer Abnahme der Expression von iNOS und NO. Die durch TNF- α und Aktinomycin D induzierte Apoptose und der durch Hypoxie/ Endotoxin induzierte Zelltod konnten durch CO- Inhalation verhindert werden(128).

1.9 Bilirubinmetabolismus

Biliverdin ist die Vorstufe des Bilirubins beim Hämoglobinabbau durch Hämoxxygenasen und wird durch die Bilirubin-Reduktase endgültig zu Bilirubin abgebaut. Bilirubin ist das gelbe Abbauprodukt des Häm, während das Globin in Aminosäuren gespalten wird und dem Synthesestoffwechsel wieder zur Verfügung steht.

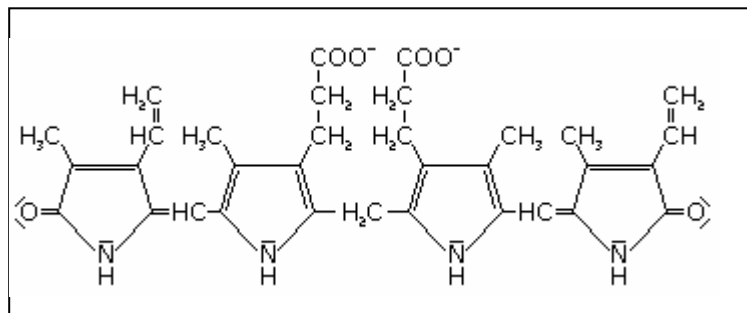


Abb. 9: Strukturformel Bilirubin

Das Bilirubin wird in der Leber an Glucuronsäure gekoppelt und kann so mit der Galle über den Darm ausgeschieden werden. Man unterscheidet das an Glucuronsäure gekoppelte, direkte (konjugierte) Bilirubin vom indirekten (unkonjugierten) Bilirubin, das wegen seiner Fettlöslichkeit überwiegend im Plasma an Albumin gebunden ist. Die Konzentration des Serumbilirubins liegt unter 21 $\mu\text{mol/l}$ (1,2 mg/dl). Bei starker Überschreitung dieses Wertes kommt es zum Ikterus mit Gelbfärbung der Haut und der Konjunktiven. Mehr als die Hälfte der reifen Neugeborenen entwickelt 2-3 Tage nach der Geburt einen physiologischen Ikterus, der am 4. bis 5. Lebenstag seinen Höhepunkt erreicht (max. 15 mg/dl) und dann langsam abklingt. Bei Frühgeborenen und kranken Neugeborenen mit Risikofaktoren wie Rhesus-Inkompatibilität kann es aus unterschiedlichen Gründen zu einem verstärkten oder länger anhaltenden Ikterus kommen. Es besteht die Gefahr eines Kernikterus, bei dem das lipophile, unkonjugierte Bilirubin die Blut-Hirn-Schranke des Kindes überschreitet und sich im Bereich der Basalganglien, einiger Kerngebiete der Hirnnerven und der Großhirnrinde ansammelt. Das führt zu einer Hemmung des neuronalen Metabolismus und einer irreversiblen Schädigung des ZNS(16). Klinische Versuche, die Hyperbilirubinämie durch Hemmung der HO-1 durch SnMP zu senken, blieben ohne Erfolg(129).

Auf der anderen Seite ist Bilirubin das am meisten vorkommende endogene Antioxidanz in Säugern(130). Stocker et al. fanden heraus, dass die antioxidative Wirkung des Bilirubins bei Hypoxie zunimmt und in Liposomen die Lipidperoxidation stärker supprimiert als α - Tocopherol (Vitamin E), welches als das stärkste lipidlösliche Antioxidanz betrachtet wird(131).

Vachharajani et al. beobachteten, dass Bilirubin in der Lage ist, die inflammatorische Antwort unabhängig von HO-1, CO oder Ferritin zu modulieren. Auch Biliverdin zeigte einen protektiven Effekt bei kardialer Ischämie in einem Rattenmodell(132). In einem anderen Hydrogenperoxid induzierten Modell von Dore et al. wurde gezeigt, dass Biliverdin bei oxidativem Stress neuroprotektive Eigenschaften besitzt(133). Die Effekte von Bilirubin und Biliverdin scheinen besonders in der Prävention von kardiovaskulären Krankheiten nützlich zu sein. Leicht erhöhte Bilirubinspiegel im Serum vermindern die Entwicklung von Koronarer Herzkrankheit und Atherosklerose bei Menschen(134). Ein Bericht von Schwertner et al. zeigte, dass eine Verminderung des totalen Bilirubins um 50% das Risiko einer schweren koronaren Herzkrankheit um 47% steigert(135). Hopkins et al. fanden ähnliche Ergebnisse in ihrer Studie und verglichen die protektiven Eigenschaften des Bilirubins mit denen von HDL Cholesterol(136). Die Prävalenz eines ischämischen Herzinfarktes bei Patienten mit Gilbert Syndrom, einem Defekt der Uridyl-Diphosphoglucuronat-Glucuronyl-Transferase (UDPGT), der zu einer anhaltenden, unkonjugierten Hyperbilirubinämie führt, ist 2% gegenüber 12% bei der Allgemeinbevölkerung(137). Hohe Bilirubinserumspiegel haben außerdem eine Abnahme der Mortalität bei Krebserkrankungen(138), eine Abnahme von asthmatischen Beschwerden(139) und eine verringerte Inzidenz von Retinopathien bei Frühgeborenen zur Folge(140).

1.10 Ferritin

Beim Abbau des Häms durch HO-1 entsteht als Nebenprodukt freies, zweiwertiges Eisen. Eisen ist ein extrem prooxidatives Molekül (141). Ferritin ist ein ubiquitär vorkommendes intrazelluläres Transport- und Speicherprotein von etwa 450 kD Molekulargewicht, das in der Lage ist, intrazelluläres Eisen zu binden und so seine prooxidative Eigenschaft zu limitieren. Es besteht aus 24 Untereinheiten und ist vor allem in der Leber, der Milz, der Darmschleimhaut, im Knochenmark und im retikuloendothelialen System zu finden. Während dem freien Eisen selbst keine zytoprotektiven Eigenschaften zugesprochen werden, führt die Induktion der HO-1 zu einer Hochregulation von Ferritin (142;143). Einige Autoren diskutieren, dass die Induktion von Ferritin eine wichtigere Rolle bei der Zytoprotektion spielt als die Induktion der HO-1 selbst und dass Ferritin stärkere antioxidative Eigenschaften als Bilirubin besitzt (142).

Berberat et al. zeigten, dass Überexpression von Ferritin in einem Ischämie/Reperusionsmodell mit einer Verminderung der Apoptoserate von Hepatozyten und Endothelzellen einhergeht(144). Vile and Tyrrel zeigten, dass oxidativer Stress und UV Strahlung zu HO-1 abhängiger Ferritinspiegelerhöhung führen (66).

2. Arbeitsziel

Die Unreife ist als ein Hauptrisikofaktor der Nekrotisierenden Enterokolitis bis heute kaum untersucht und verstanden worden(3;145). Unser Arbeitsziel ist daher, die Unreife als Ursache der NEC auf molekularbiologischer Ebene besser zu verstehen. Es gibt bereits erste Ergebnisse, die die reifeabhängige Antwort auf infektiöse Agenzien fokussieren(33-36).

Bakterielle Translokation findet bei jedem Neugeborenen statt, aber nicht alle erkranken an einer NEC. Nicht-infektiöse Untersuchungen gab es bis heute kaum. Wir wählten daher ein nicht-infektiöses Tiermodell der NEC, um die entwicklungsabhängige Expression pro-inflammatorischer und protektiver Metaboliten zu untersuchen. Mit dem Tiermodell nach Okur et al. soll die Nekrotisierende Enterokolitis durch Hypoxie/ Reoxigenierung induziert werden(32). Die Schädigung wird als Apoptose und als erhöhte mukosale Permeabilität gemessen(46;146).

Der proinflammatorische Faktor iNOS und das protektive Protein HO-1 sollen auf reifeabhängige Expression nach nicht-infektiös induzierter Enterokolitis untersucht werden. Um zu prüfen, ob HO-1 in unserem Modell einen protektiven Effekt auf den Darm ausübt und eine Kausalität zur reifeabhängigen Anfälligkeit gegenüber der NEC besteht, soll die HO-1 durch Hämin induziert und durch Zink-Protoporphyrin-IX (SnPP) gehemmt werden.

3. Material und Methoden

3.1 Materialien und Geräte

3.1.1 Chemikalien

Rooney Puffer:	pH 7,5	
315 mg /100 ml	20mM Tris-HCl	Merck
37,22 mg/100 ml	1mM EDTA	SIGMA
38,04 mg/100 ml	1mM EGTA	SERVA

Proteaseinhibitoren auf 10 ml:

10 µl	Aprotinin	SIGMA
10 µl	Leupeptin	SIGMA
5 µl	NEM (N'ethylmaleinimide)	SIGMA
2,5 µl	PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	SIGMA

Gele 12,5 %

Trenngel:

12,5 ml	Monomer Acrylamid	FLUKA
10 ml	Resolving Gel (1.5 M Tris-base pH 8.8)	SIGMA
0,4 ml	10% SDS (Lauryl Sulfat)	SIGMA
16,9 ml	Aqua dest	Charité Aufbereitung
20 µl	TEMED	SIGMA
0,2 ml	10% APS (Ammonium Persulfat)	SIGMA

Sammelgel

2,01 ml	Monomer Acrylamid	FLUKA
5 ml	Stacking Gel (0,5M Tris-base pH 6,8)	SIGMA
0,2 ml	10% SDS (Sodium Lauryl Sulfat)	SIGMA
12,67 ml	Aqua dest	Charité Aufbereitung
8 µl	TEMED	SIGMA

0,1 ml	10% APS(Ammonium Persulfat)	SIGMA
--------	-----------------------------	-------

10x Laemmli-Puffer	pH 8,3 bis 8,8	
--------------------	----------------	--

30,3 g	0,025 M Tris base	SIGMA
--------	-------------------	-------

144,2 g	0,192M Glycin	SERVA
---------	---------------	-------

10 g	10% SDS	SIGMA
------	---------	-------

mit Aqua dest. auf 1l aufgefüllt

Tank- Puffer

150 ml	10x Laemmli Puffer s.o.	
--------	-------------------------	--

300 ml	Methanol	J.T. Baker
--------	----------	------------

1050 ml	Aqua dest.	Charité Aufbereitung
---------	------------	----------------------

TBS-Tween	pH 7,5	
-----------	--------	--

10 mM	Tris base	SIGMA
-------	-----------	-------

100 mM	NaCl	Fresenius
--------	------	-----------

0,1 %	Tween 20	SIGMA
-------	----------	-------

10x TBS-Tween	pH 7,5	
---------------	--------	--

12,11 g	Tris-base	SIGMA
---------	-----------	-------

58,44 g	NaCl	Fresenius
---------	------	-----------

10 ml	Tween 20	SIGMA
-------	----------	-------

mit Aqua dest. auf 1l auffüllen

Nitrozellulose-Membran (PVDF) 0,45 µ	Schleicher & Schueller
--------------------------------------	------------------------

Methanol	J.T. Baker
----------	------------

PBS (Phosphat Buffer Saline)	INVITROGEN
------------------------------	------------

Probenpuffer Laemmli	SIGMA
----------------------	-------

DTT (Dithiothreitol)	SIGMA
----------------------	-------

β-Mercaptoethanol	SIGMA
-------------------	-------

physiologische NaCl Lösung 0,9%	Fresenius
---------------------------------	-----------

BRADFORD Reagenz	SIGMA
------------------	-------

Albumin 2 mg/ml / Proteinstandard	Bio Rad
-----------------------------------	---------

Bio Rad

Magermilchpulver (Non Fat Dry Milk)	Bio Rad
Chemolumineszenz Substrat	Pierce
Plastiktüten	Brand
Hyperfilm™	Amersham Biosciences
Haltungsfutter für Ratten und Mäuse T-1326	Altromin
CO ₂ Gasflasche	AGA, Hamburg
O ₂	Charité Aufbereitung
Diethylether	Merck
70% Ethanol	J.T. Baker
Primer Design	Applied Biosystems
Primer Herstellung	Metabion, Martinsried
ABI 7000 Sequence Detection System	Applied Biosystems
Spritzen Discardit	Becton Dickinson
Kanülen Microlance 18/ 20/ 23 G	Becton Dickinson
Bovines Hämin	Sigma
SnPP (Sn(IV)Mesoporphyrin IX dichlorid)	Frontier Scientific

3.1.2 Antikörper

anti-Heme-Oxygenase 1 / 2 monoklonal (mouse), OSA-111	Stressgen
anti-mouse Peroxidase anti IgG	Pierce
anti-β-Aktin , monoklonal (mouse)	Oncogene

3.1.3 Kits

RNeasy Mini Kit	Quiagen
DNA free Kit	Ambion
Taqman Reverse Transcription Reagents	Applied Biosystems
PCR Mastermix Plus	Eurogentec
Kolorimetrischer Test für Caspase-3	R&D Systems Inc

3.1.4 Geräte

Eismaschine	Ziegra
Ultraschallgerät Sonopuls HD60	Bandolin
Zentrifuge MR 1822	JOUAN
Ultrazentrifuge L 765	Beckmann

Gefrierschrank –81°C	HARRIS
Thermomixer 5436	Eppendorf
pH-Meter 761	Calimetic
Photometer UV-160A	Shimadzu
Kühlschrank	Liebherr
Elektrophoresekammer Mighty small	Höfer
Elektrophoresestromgerät Power Pac 300	Höfer
Tankkammer TE 22	Höfer
Stromgerät EPS 2A200	Höfer
Rotor zur Inkubation OV1	Biometra
Entwicklungsmaschine X-OMAT Multiloader 300 plus	Kodak
GS-710 Calibrated Imaging Densitometer	Bio Rad
Software Quantity One	Bio Rad
Thermocycler Mastercycler 5330	Eppendorf

3.2 Tierversuche

3.2.1 Tiere und Haltung

Alle Tiere der Tierversuche stammen aus der Züchtung der Charité.

Reife Tiere: Wir benutzten für unsere Tierversuche Ratten der Rasse Wistar, die 15 Tage alt waren. Die Tiere wurden mit Altromin Haltungsfutter gefüttert und bekamen Wasser ad libitum.

Neugeborene Tiere: Trächtige Ratten der Rasse Wistar wurden mit Altromin Haltungsfutter gefüttert, bekamen Wasser ad libitum und entbanden ihre Jungen selbstständig. Die neugeborenen Tiere wurden durchgehend vom Muttertier gesäugt.

3.2.2 Tierversuch Hypoxie/ Reoxigenierung

Das Tiermodell zur Induktion der Enterokolitis wurde nach Okur et al. durchgeführt(32). Für den Versuch wurden die neugeborenen Tiere am ersten Lebenstag sowie die reifen Tiere 5 Minuten in eine Kammer gesetzt, die mit 100% CO₂ geflutet wurde. Im Anschluss daran wurden die Tiere in einer weiteren Kammer für 10 Minuten mit 100% O₂ reoxigeniert. Tiere gleichen Alters dienten als Kontrolltiere. Die Tierversuche wurden vom Landesamt für Gesundheit und technische Sicherheit (LaGetSi) Berlin genehmigt (G 0175/05).

3.2.3 Gabe von Hämin/ SnPP

Die Aktivierung der Hämoxygenase-1 erfolgte durch eine einmalige intraperitoneale Gabe vom Hämin (50 µmol/kg Körpergewicht), die Hemmung durch eine einmalige intraperitoneale Gabe von Zink-Protoporphyrin-IX (SnPP, 25 µmol/kg Körpergewicht), jeweils 4 Stunden vor der H/R Episode(98).

3.2.4 Probengewinnung

Die Tötung der Tiere erfolgte 24 und 48 Stunden nach dem Versuch. Hierzu wurden sie mit Diethylether inhalativ narkotisiert und durch zervikale Dislokation getötet. Für den Versuch wurden Proben aus dem distalen Ileum entnommen, bei neugeborenen Tieren

aus dem distalen Anteil des mittleren Drittels des Darms. Die Proben wurden vorsichtig ausgestrichen, um von Faeces gereinigt zu werden und bei -80°C asserviert.

3.3 Permeabilitätsmessung mit FITC-Dextran

Das Ausmaß der intestinalen Barrierestörung kann anhand der FITC-Dextran Aufnahme bestimmt werden(146;147). FITC (Fluoreszin-iso-thio-cyanol) ist ein 4kD großes Dextran und kann, oral verabreicht, bei erhöhter Permeabilität der Mukosa ins Serum übergehen und dort gemessen werden. Bei gesunder intestinaler Barriere kann FITC-Dextran hingegen nicht resorbiert werden(46).

Mit FITC-Dextran (FD-4) wurde nach einem Protokoll von Tagesson und Furuta die Barrierefunktion der Darmwand untersucht(46;146). Dazu wurde den Ratten 44 Stunden nach dem Tierversuch über eine Magensonde 0,6 mg FITC- Dextran (4 kD) pro g Körpergewicht verabreicht. 4 Stunden später wurden die Tiere getötet und Vollblut gewonnen. Die fluoreszenzspektrometrische Messung erfolgte im Serum gemessen nach Exzitation bei 485 nm bei einer Emissionswellenlänge von 530 nm. Die Konzentrationsbestimmung von FD-4 erfolgte anhand einer Standardreihe aus Rattenserum mit bekannter FITC-Dextran Konzentration.

3.4 Kolorimetrie

3.4.1 Probenaufbereitung

Die eingefrorenen Proben aus dem Rattendarm wurden auf Eis aufgetaut und mit Rooney Puffer (incl. Proteaseinhibitoren) versetzt. Nachdem die Proben mit einer Schere in Stücke geschnitten wurden, folgte die *Needle-and-pestle Lyse*. Im Ultraschallgerät wurden die Proben 2 mal mit jeweils 5 Zyklen unter Eiskühlung geschallt. Dabei arbeitete das Gerät mit 60% der Maximalleistung bei 80 Zyklen. Die Lysate wurden 10 Minuten bei 4000 g zentrifugiert und die Überstände für den folgenden kolorimetrischen Test verwendet.

3.4.2 Versuchsdurchführung

Die Aktivität der Caspase-3 wurde mit einem kolorimetrischen Testkit der Firma R&D Systems, Wiesbaden gemessen. Dabei wird die Caspase-3 Aktivität durch Zugabe eines Caspase-3 spezifischen Peptids gemessen. Dieses spezifische Peptid ist an p-nitroaniline (pNA) gebunden. Bei Spaltung des Peptids durch Caspase-3 wird chromophores pNA freigesetzt, welches quantitativ bei einer Wellenlänge von 405 nm im Fluoreszenzphotometer gemessen wird. Die Caspase-3 Aktivität ist dabei direkt proportional zur Farbreaktion. Die Ergebnisse wurden anhand der ursprünglichen Proteinkonzentration ausgerechnet.

3.5 Western Blot

3.5.1 Proteinaufbereitung

Um die Hämoxygenase-1 zu extrahieren, die sich zu einem großen Teil in den Mikrosomen befindet, adaptierten wir zur Aufbereitung der Proteine die Protokolle von Maines und Motterlini et al.(148;149). Die Proben wurden auf Eis aufgetaut und in PBS plus Proteaseinhibitoren mit einer Schere zerkleinert. Im Ultraschallgerät wurden die Proben mit jeweils 5 Zyklen unter Eiskühlung geschallt. Dabei arbeitete das Gerät mit 60% der Maximalleistung bei 80 Zyklen. Als die Proben homogen waren, wurden sie auf 2 ml mit PBS plus Proteaseinhibitoren aufgefüllt und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren und schonend auf Eis aufgetaut. Insgesamt wurden die Proben in drei Zyklen eingefroren und wieder aufgetaut, um möglichst alle Mikrosomen zu lysieren.

Wir zentrifugierten die Proben bei 10 000 g und 4°C 20 Minuten, den Überstand zentrifugierten wir erneut bei 100 000g und 4°C . Das Pellet wurde in 100 μl Rooney plus Proteaseinhibitoren aufgenommen. Anschließend wurde die Proteinkonzentration nach BRADFORD bestimmt. Als Vorbereitung für den folgenden Western Blot wurden Aliquote der Proteinlösungen mit der gleichen Menge 2x konzentriertem Probenpuffer plus DTT bei 95°C 5 Minuten inkubiert und bei -81°C eingefroren.

3.5.2 Gelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese wurden Gele mit einer Acrylamid-Konzentration von 12,5% benutzt. Die Proteinlösungen wurden aufgetaut und erneut bei 95°C 5 Minuten inkubiert. Entsprechend der Proteinkonzentration trugen wir 10 μg Gesamtprotein pro Geltasche auf. Die Proteine wurden in der Gelelektrophorese in Laemmli- Puffer nach Molekülgröße getrennt (30 Minuten bei 20 mA für das Sammelgel und 65 Minuten bei 40 mA für das Trenngel).

3.5.3 Blot

Im Tank Blot wurden die Proteine aus den SDS-Gelen über 2 Stunden bei 300 mA auf Nitrocellulosemembranen geblottet, die Membranen dann in 5% Magermilchpulver in TBS-Tween bei 4°C über Nacht geblockt.

3.5.4 Inkubation mit Antikörper gegen HO-1

Am nächsten Tag wurde die Membran 3 mal 30 Minuten bei Raumtemperatur in TBS-Tween gewaschen. Danach erfolgte die Behandlung mit dem 1. Antikörper gegen Hämoxygenase-1. Der Antikörper wurde in 5% Magermilchpulver in TBS-Tween 1/2000 verdünnt und die Membran 1 Stunde bei Raumtemperatur darin inkubiert. Vor der Behandlung mit dem 2. Antikörper (anti-mouse) wurde die Membran erneut 3 mal 15 Minuten in TBS-Tween gewaschen. Der 2. Antikörper wurde in 5% Magermilchpulver in TBS-Tween 1/2000 verdünnt, die Membran darin 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Am Ende wurde die Membran 5 mal mit TBS-Tween 30 Minuten gewaschen.

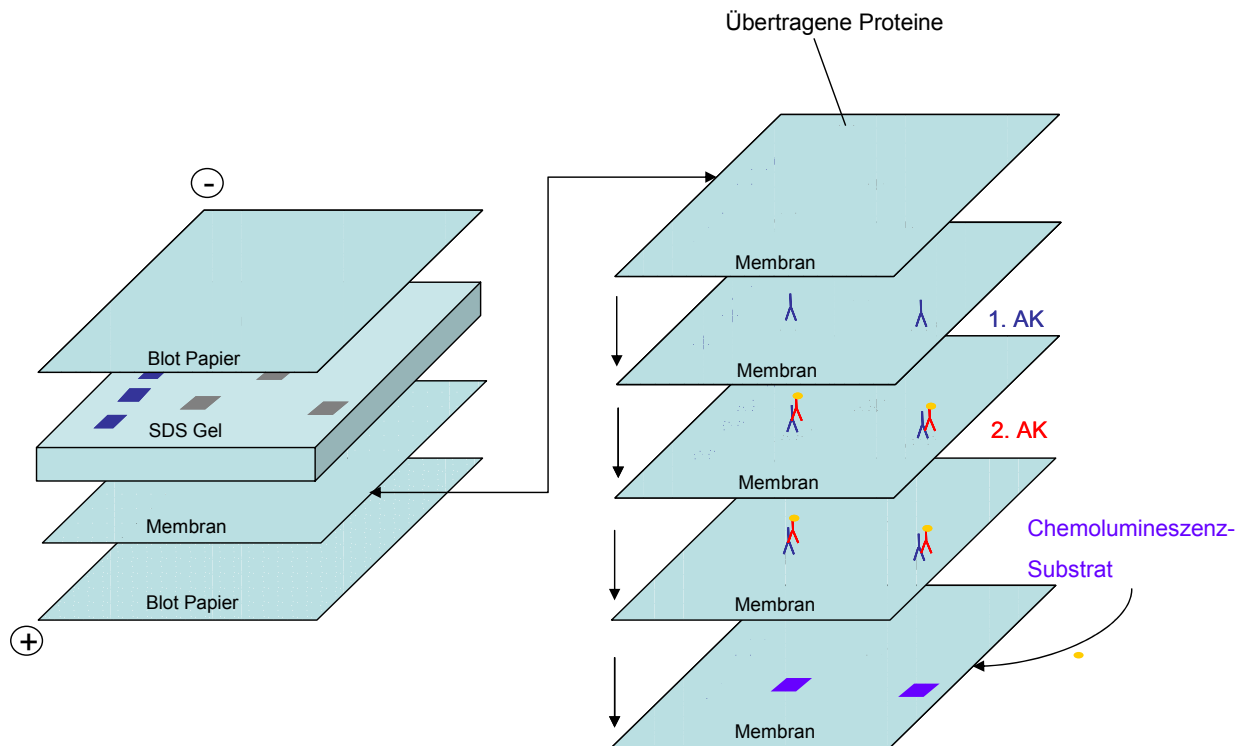


Abb. 10: Schematische Darstellung des Western Blot

3.5.5 Entwicklung

Wir inkubierten die Membran 5 Minuten in Chemolumineszenz Substrat, belichteten mit der Membran einen Röntgenfilm für 2 und 5 Minuten, der dann entwickelt wurde. Die Membran wurde über Nacht bei 4°C in TBS-Tween gelagert.

3.5.6 Inkubation mit Antikörper gegen β -Aktin

Wir inkubierten die Membran 30 Minuten in Tankpuffer bei Raumtemperatur, um die auf der Membran befindlichen Antikörper zu entfernen. Danach wurden sie 10 Minuten mit TBS-Tween gewaschen. Die Behandlung mit dem 1. Antikörper (anti- β -Aktin), der 1/20000 in 1% Magermilchpulver in TBS-Tween verdünnt wurde, erfolgte 1 Stunde bei 30°C. Die Membran wurde 4 mal 15 Minuten mit TBS-Tween gewaschen und mit dem 2. Antikörper (anti-mouse POD, 1/5000 in 3% Magermilchpulver) 1 Stunde bei 30°C inkubiert. Wir inkubierten die Membran 5 Minuten in Chemolumineszenz Substrat, belichteten mit der Membran einen Röntgenfilm für 10 Sekunden, der dann entwickelt wurde.

3.5.7 Densitometrie

Die jeweiligen HO-1 und β -Aktin Banden des Films wurden densitometrisch gemessen (GS-710 Calibrated Imaging Densitometer, Bio Rad) und ausgewertet (Quantity One Bio Rad), wobei β -Aktin als Ladekontrolle diente.

3.6 Relative RNA-Quantifizierung

Die Relative RNA-Quantifizierung führten wir nach folgenden Schritten durch: Zunächst wird die RNA aus dem Darm der Ratte extrahiert und eine homogene und kontaminationsfreie Lösung hergestellt. Diese RNA wurde mit Hilfe der reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben, wobei jeweils gleiche Mengen an Gesamt-RNA eingesetzt wurden. Die cDNA wurde dann im nächsten Schritt durch Real time PCR amplifiziert, wobei die einzelnen Amplifikationsprodukte mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green markiert wurden.

3.6.1 RNA Extraktion

Für die RNA-Extraktion benutzten wir das „RNeasy“-System der Firma Quiagen. Dazu wurden die Proben zunächst in einem mit β -Mercaptoethanol versetzten Puffer durch *Needle-and-Pestle* lysiert. Der Überstand wurde mit dem gleichen Volumen 70%igen Ethanols versetzt, um die Nukleinsäuren auszufällen. Diese wurden mit dem RNeasy-Extraktions-Kit (Quiagen) laut Protokoll aufgereinigt. Die Säulen binden die RNA, diese wird in drei Schritten an der Säule „gewaschen“ und mit Wasser eluiert.

Um DNA- Kontamination auszuschließen, wurde die DNA der Proben in einem weiteren Schritt verdaut. Die Proben wurden mit 1 μ l DNase (DNA free Ambion) im entsprechenden Puffer versetzt und die DNA 30 min bei 37°C verdaut. Beendet wurde die Reaktion durch Zugabe von *DNase-Inactivating* Reagenz.

Der RNA-, sowie der Proteingehalt wurden photometrisch bei 260 und 280 nm gemessen. Um die Reinheit der Proben bewerten zu können, bildeten wir einen Quotienten aus gemessenem Protein- und RNA Gehalt. Der RNA-/Proteingehalt-Quotient der verwendeten Proben lag über 1,7.

3.6.2 Reverse Transkription (RT)

Für die reverse Transkription der RNA benutzten wir das Taqman Transkriptionsreagenz der Firma Applied Biosystems, das Random Hexamere enthält.

Die Transkription von 1 μ g RNA erfolgte in folgenden Schritten:

- 10 Minuten bei 25°C Inkubation
- 60 Minuten bei 37°C RT- Reaktion

- 5 Minuten bei 95°C RT- Inaktivierung

Es liefen jeweils Kontrollen ohne Enzym sowie Kontrollen ohne RNA mit.

3.6.3 Real time PCR

Für die quantitative PCR benutzten wir *qPCR Mastermix plus for SYBR Green* und *qPCR 96-well* Platten wie beschrieben in Tölle et al.(150). Die Primer wurden verdünnt, so dass sich in jedem Ansatz eine Primerendkonzentration von 0,3 µM befand. Die Ansätze (Doppelbestimmung) wurden wie folgt pipettiert:

- Mastermix SYBR- Green 12,5 µl
- Primeransatz (+25 %) der verdünnten Primer
 - F-Primer 0,75 µl
 - R-Primer 0,75 µl
 - dH₂O 4,5 µl 6,0 µl
- DNA- Verdünnung
 - cDNA 1,0 µl
 - dH₂O 5,5 µl

Die Real time PCR wurde in folgenden Zyklen durchgeführt:

- 2 Minuten bei 50°C
- 10 Minuten bei 95°C Denaturierung
- 40 Zyklen:
 - 15 Sekunden bei 95°C Annealing
 - 1 Minute bei 60°C Elongation

3.6.4 Primer Design

Die mRNA Sequenzen der untersuchten Peptide ermittelten wir aus den Datenbanken EMBL und Pub med(151;152).

Das Design erfolgte mit Primer Express (Applied Biosystems, Frankfurt), wobei wir folgende Bedingungen berücksichtigten:

- Annealingtemperatur 95°C (max +/- 2° Abweichung)
- Länge 18-30 Bp
- GC-Gehalt 40-60%,
- keine Basentriplets von Guanin-Cytosin
- kein Thymin am 3'-Ende

Die Sequenzhomologiesuche der Basensequenzen „blast“ erfolgte online unter EMBL-EBI, um spezifische Primer zu erhalten(153).

Die Primer wurden nach angegebenen Sequenzen durch Metabion, Martinsried, hergestellt.

ZielgenForward / Reverse Primer (5'-3')

β-Aktin	TCCACCTTCCAGCAGATGTG GCATTTGCGGTGGACGAT
HO-1	GGTGTCCAGGGAAGGCTTTAAG CATAGACTGGGTTCTGCTTGTTC
iNOS	GGAGAGATTTTTACGACACCC CCATGCATAATTTGGACTTGCA

Tabelle 2: Primer, die für die relative, quantitative PCR benutzt wurden

3.7 Statistische Auswertung und Grafiken

Mit der Software Graphpad InStatTM v. 2.05a wurden die Ergebnisse als mittlere Standardabweichung errechnet. Parameterfreie statistische Tests wurden mit dem Mann-Whitney Test mittels Graphpad InStatTM v. 2.05a Software (Graphpad Software) erstellt. Zum Vergleich konsekutiver Ergebnisse wurde der Kruskal-Wallis Test angewandt. Zum Vergleich von signifikanten Unterschieden in Subgruppen wurde der Dunn's Multiple Comparison Test angewendet. Ab einem $p < 0.05$ wurden Unterschiede als signifikant bewertet.

Um eine Korrelation der Ergebnisse verschiedener Untersuchungen zu ermöglichen, wurde neben der Bestimmung der RNA-Konzentrationen immer ebenfalls eine Referenzprobe bestimmt, auf deren optische Dichte wir die Werte bezogen. Die Werte werden deshalb in „arbitrary units“ (AU) angegeben.

3.7.1 Relative RNA-Quantifizierung

Die Auswertung erfolgte mit der Software ABI 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Frankfurt). Pro Gen wurde eine Baseline festgelegt. Die Baseline ist der Bereich, in dem die Fluoreszenz ausgewertet wurde. Innerhalb dieses Bereiches wurde für alle Gene ein C_T -Wert (Threshold Cycle) festgelegt, also die Zyklenzahl, bei der die Fluoreszenzsteigerung am größten war. Die relative Quantifizierung der RNA erfolgt nach der folgenden Formel: $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Die C_T -Werte einer Probe wurden auf das Kalibratorgen β -Aktin bezogen (ΔC_T). Die so erlangten ΔC_T -Werte wurden zum ΔC_T -Wert einer Kontrollprobe ins Verhältnis gesetzt ($\Delta\Delta C_T$). Durch Umrechnung nach der Formel $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ergibt sich nun der Faktor der Expressionsteigerung und – senkung der Probe verglichen mit der Kontrolle. Auf diese Kontrolle wurden alle Proben bezogen, so dass die Proben untereinander vergleichbar wurden und Drei- und Mehrfachbestimmungen möglich waren.

3.7.2 Western Blot

Die auf dem Film abgebildeten Banden wurden densitometrisch gemessen und ausgewertet. Die Ergebnisse wurden als *arbitrary units* dargestellt, nachdem sie auf die Mittelwerte der Ergebnisse von reifen Tieren ohne H/R bezogen wurden.

4. Ergebnisse

4.1 H/R führt zu einer Permeabilitätssteigerung der Darmwand bei neugeborenen Ratten, nicht aber bei reifen Ratten

Um unser Tiermodell im Hinblick auf die klinische Relevanz zu prüfen, schätzten wir das Ausmaß des „gut-barrier-failure“ anhand der Permeabilität für FITC-Dextran (4 kDa) 48 Stunden nach H/R ab. Vier Stunden nach oraler Gabe von FD-4 wurde die Fluoreszenz im Vollblut als Maß der Aufnahme von FITC-Dextran über den Darm gemessen. Dieses Vorgehen ist eine etablierte Methode zur Bestimmung des Ausmaßes eines Darmschadens(46;146). Die aufgenommene Menge von FITC-Dextran blieb in reifen Tieren vor und nach H/R gleich, während sie bei unreifen Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren etwa um das 20-fache anstieg.

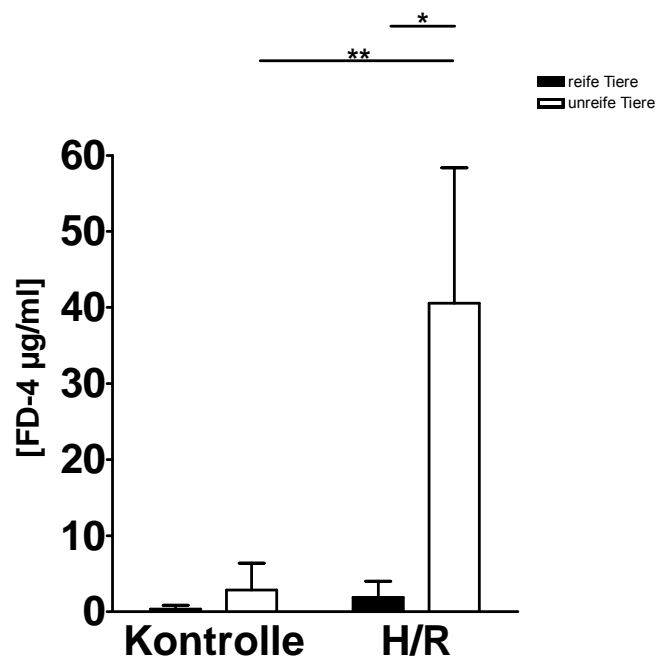


Abb. 11: Konzentration von FITC-Dextran im Blut von unreifen (weiße Balken) im Vergleich zu reifen Ratten (schwarze Balken). Den Ratten wurde 0,6 g FITC-Dextran/g Körpergewicht über eine Magensonde verabreicht und die Konzentration von FITC-Dextran im Serum mit einem Fluoreszenz-Spektrometer gemessen. Die Werte von n=7 Tieren wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben. Die Gruppen unterschieden sich signifikant ($p=0,0001$). (* $p<0,01$, ** $p<0,001$)

4.2 H/R führt zu gesteigerter Aktivität von Caspase-3 bei unreifen, nicht aber bei reifen Ratten

Als biochemisches Korrelat der von uns beobachteten Permeabilitätssteigerung vermuteten wir eine gesteigerte Apoptoserate im Intestinum. Wir untersuchten die Aktivität von Caspase-3 nach H/R als Maß für die Apoptoserate. Als Zeichen einer gesteigerten Apoptose sahen wir eine Zunahme der Aktivität von Caspase-3 bei der unreifen Ratte nach H/R im Vergleich zur Kontrolle. Bei den reifen Tieren konnten wir keine signifikanten Veränderungen feststellen.

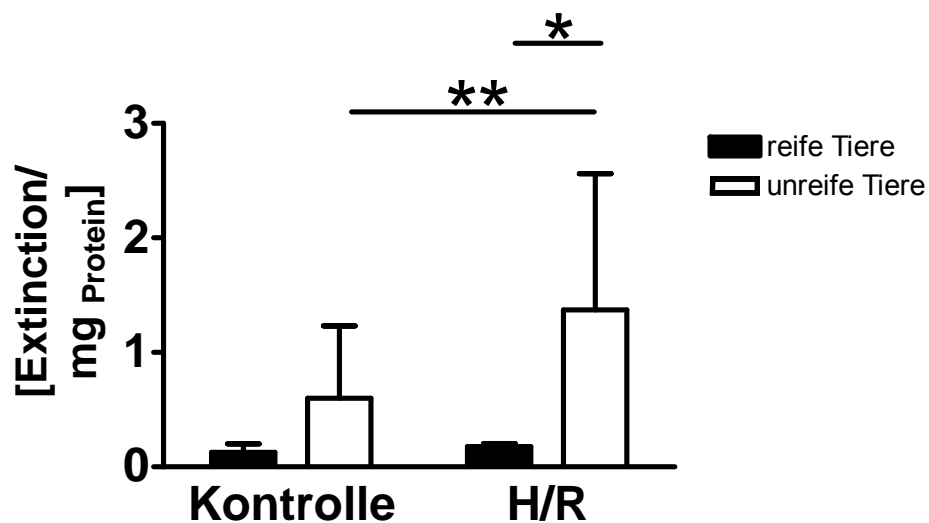


Abb. 12: Aktivitätsmessung von Caspase-3 im kolorimetrischen Test nach H/R im Darm unreifer Ratten (weiße Balken) und im Darm reifer Ratten (schwarze Balken). Die Ergebnisse wurden bezogen auf die Gesamtproteinkonzentration. Werte von n=7 Tieren wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt. Die Gruppen unterschieden sich signifikant ($p=0,0003$). (* $p<0,05$, ** $p<0,001$)

4.3 H/R führt zu einem signifikanten Anstieg der Expression von iNOS bei unreifen, nicht aber bei reifen Ratten

Als weiteren Marker der Darmschädigung durch H/R untersuchten wir die reifeabhängige Expression des pro-inflammatorischen und pro-apoptotischen iNOS, die in Enterozyten von NEC Patienten erhöht ist(154). Die Permeabilitätssteigerung und erhöhte Apoptoserate, die wir im unreifen Intestinum nach 48 Stunden feststellten, wurde begleitet von einer erhöhten Expression von iNOS.

Bei den reifen Tieren hingegen kam es zu keiner signifikanten Änderung der Expression von iNOS 48 Stunden nach H/R.

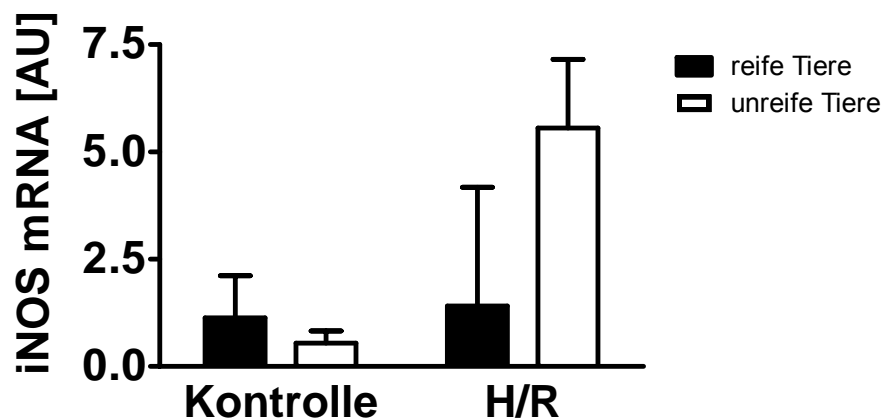


Abb. 13: Relative RNA-Expression von iNOS in Därmen unreifer (weiß) und reifer Ratten (schwarz) nach H/R. mRNA wurde nach Zyklen in der Taqman Analyse mit $2^{-\Delta\Delta CT}$ geschätzt. Die Gruppen unterschieden sich signifikant ($p=0,0003$). ($p^*<0,05$, $**p<0,001$)

4.4 Die Expressionssteigerung von HO-1 nach H/R ist bei unreifen Ratten später und schwächer als bei reifen Ratten

Um das untersuchte Schädigungsmuster von reifem und unreifem Darm zu erklären, untersuchten wir die Expression der Hämoxigenase-1. HO-1 übt im Darm einen protektiven und entzündungshemmenden Effekt aus. Die m-RNA für HO-1 war bei den reifen Tieren 24 Stunden nach H/R signifikant angestiegen. Bei den unreifen Tieren war kein signifikanter Anstieg der Transkription zu sehen. Auf Proteinebene fanden wir einen Anstieg der HO-1-Expression bei reifen Tieren bereits nach 24 Stunden. Ein Anstieg der HO-1-Expression bei den unreifen Tieren trat weniger stark erst nach 48 Stunden ein.

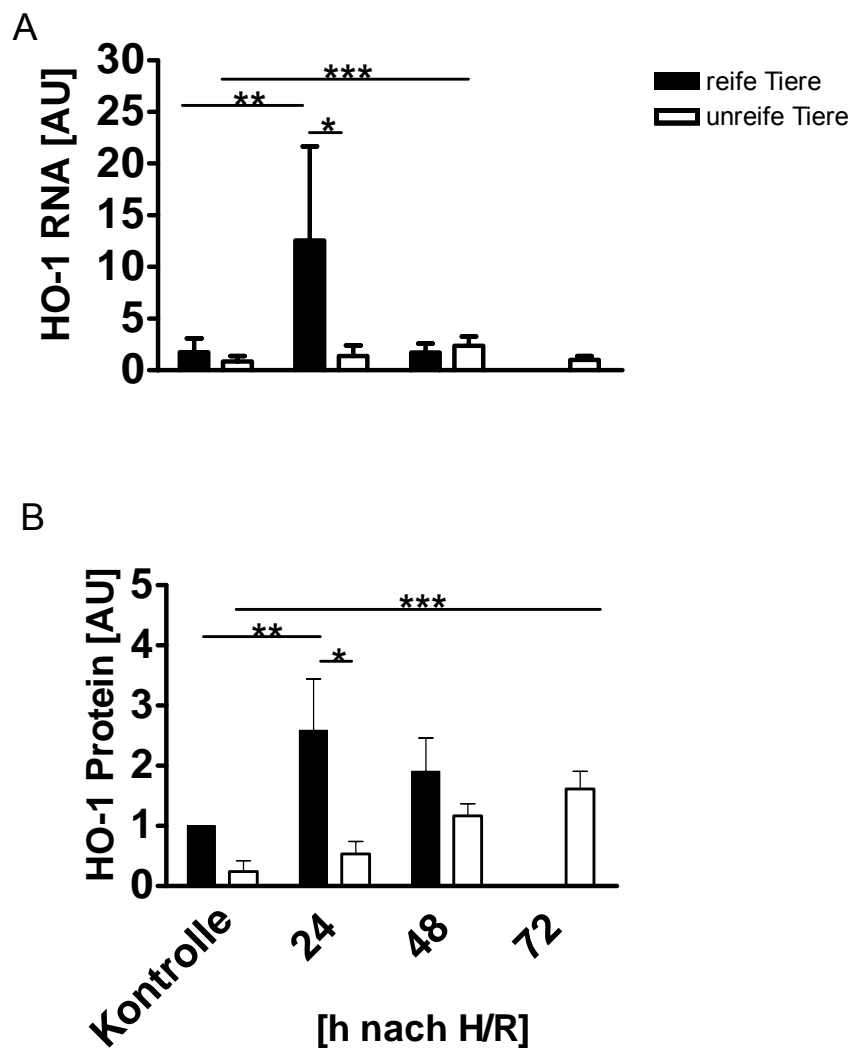




Abb. 14a: Darstellung der relativen Genexpression von HO-1 im Darm reifer (schwarz) und unreifer Ratten (weiß) 24, 48 und 72 Stunden nach H/R mittels semiquantitativer *realtime* PCR. Der ΔC_T -Wert ergibt sich aus der Subtraktion des C_T -Mittelwertes für β -Actin (endogener Standard) vom jeweiligen Mittelwert für HO-1. Der $\Delta\Delta C_T$ -Wert ist das Resultat der Subtraktion des ΔC_T -Wertes der Kontrollgruppe vom C_T -Wert der einzelnen experimentellen Gruppen (24-72 h nach H/R). Die Gruppen unterschieden sich signifikant ($p=0,0281$). ($p^*<0,01$, $**p<0,05$, $***p<0,05$)

Abb. 14b: Auswertung aller densitometrisch gemessenen Western Blots von HO-1 in unreifen (weiße Balken) und reifen Tieren (schwarze Balken), wobei die Kontrolle der reifen Tiere =1 gesetzt wurde. Werte von $n=7$ Tieren wurden als Mittelwerte + Standardabweichung dargestellt. Die Gruppen unterschieden sich signifikant ($p=0,0107$). ($p^*<0,01$, $**p<0,01$, $***P<0,05$)

Abb.14c: Repräsentativer Western Blot von HO-1 mit β -Aktin-Färbung als Ladekontrolle. A-C sind reife Tiere (Kontrolle, 24 Stunden, 48 Stunden nach H/R), D-F sind unreife Tiere (Kontrolle, 24 Stunden, 48 Stunden nach H/R)

4.5 Die Expression der HO-1 steigt nach Induktion durch Hämin 48 Stunden nach H/R bei den unreifen Tieren signifikant an

Wir wiederholten die Versuche mit unreifen Tieren. Vor Schädigung des Darms durch H/R stimulierten wir die HO-1 Expression mit Hämin oder hemmten die Enzymaktivität der HO-1 mit SnPP. Um die Induktion der HO-1 durch Hämin und die Hemmung durch SnPP zu beschreiben, verglichen wir die Expression der HO-1 auf Proteinebene 48 Stunden nach H/R. Der Anstieg der HO-1 nach Induktion durch Hämin 48 Stunden nach H/R war signifikant höher als bei den Tieren, die nur durch H/R behandelt wurden.

Die Expression der HO-1 wurde durch Hemmung mit SnPP nicht signifikant beeinflusst. Die leichte Expressionssteigerung ist durch den dualen Mechanismus, mit dem SnPP die Expression der HO-1 beeinflusst, zu erklären. In vivo führt SnPP zu einer Zunahme der HO-1 Produktion in der Leber. Gleichzeitig hemmt SnPP aber die HO-1 in ihrer katalytischen Fähigkeit(104).

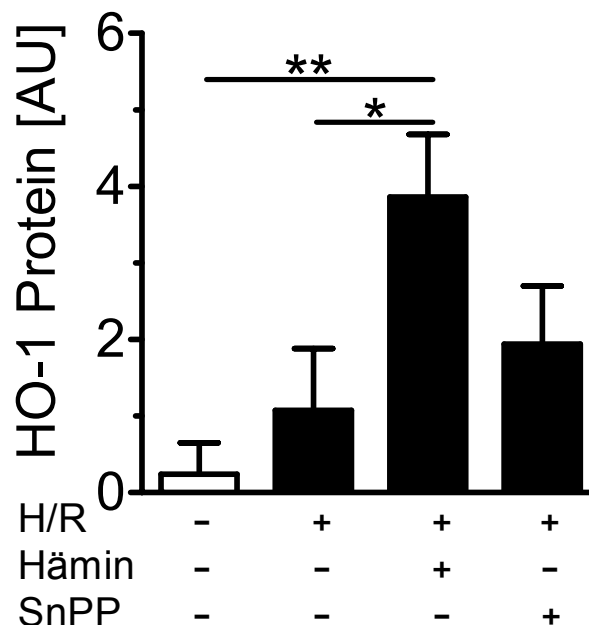


Abb. 15: Proteinexpression der HO-1 bei unreifen Tieren 48h nach H/R (schwarze Balken) und ohne H/R (weißer Balken), nach Induktion durch Hämin und Inhibition durch SnPP. Werte von n=7 Tieren wurden als Mittelwerte + Standardabweichung dargestellt. Die Gruppen unterschieden sich signifikant ($p=0,0003$). (* $p<0,05$, ** $p<0,01$)

4.6. Das „gut-barrier-failure“ bleibt nach Aktivierung der HO-1 durch Hämin bei den unreifen Tieren aus

Um das Ausmaß des Darmschadens nach Gabe von Hämin oder SnPP zu beschreiben, verglichen wir die FITC-Dextran Konzentrationen im Blut der unreifen Tiere nach Gabe von Hämin oder SnPP. Nach Behandlung der unreifen Tiere mit Hämin kam es 48 Stunden nach H/R zu einer signifikant geringeren Konzentration von FITC-Dextran im Blut. Durch Hemmung der HO-1 durch SnPP war diese signifikant höher als ohne Behandlung.

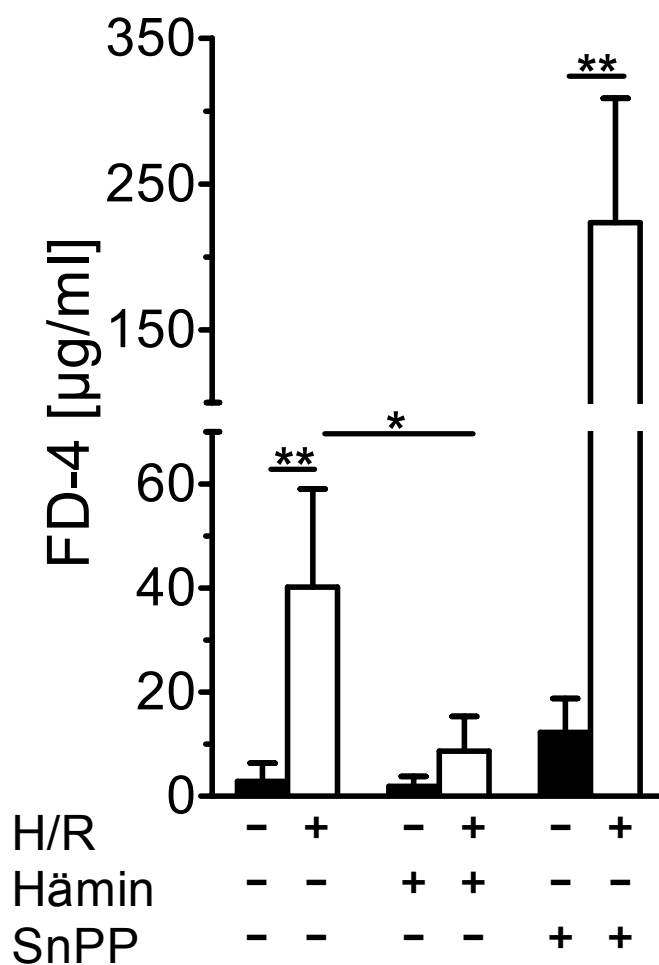


Abb. 16: FITC-Dextran Konzentration im Blut von unreifen Tieren 48h nach H/R (schwarze Balken) und ohne H/R (weiße Balken), nach Induktion durch Hämin und Inhibition durch SnPP. Werte von n=7 Tieren wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben. Die Gruppen unterschieden sich signifikant ($p=0,001$). (* $p<0,05$, ** $p<0,01$)

5. Diskussion

5.1 Das Tiermodell nach Okur et al. als adäquates Modell

Wir untersuchten den Effekt von Hyperkapnie und Reoxigenierung (H/R) auf den Darmbarriereschaden (gut-barrier-failure) und auf die Expression des protektiven Proteins HO-1. Um die Charakteristik der unreifen Antwort auf H/R zu definieren, verglichen wir gesäugte, neugeborene mit 15 Tage alten, reifen Ratten.

Ratten gehören zu den „Nesthockern“, werden blind und taub geboren, können ihre Körpertemperatur noch nicht allein regulieren und sind ohne die Mutter nicht zur Defäkation fähig. In der postnatalen Zeit erfolgen bei der neugeborenen Ratte noch erhebliche Reifungsschritte, die die Nahrungsaufnahme, die gastrointestinale Funktion, den Lebermetabolismus, die Gehirnstruktur und –funktion betreffen(155). Die neugeborene Ratte wird daher als ein adäquates Modell für die Pathogenese von Erkrankungen im Darm des Frühgeborenen, wie der NEC, gehalten. Wir entschieden uns, das experimentelle Enterokolitismodell von Okur et al. zu benutzen, da die Tiere bei diesem Modell von der Mutter gesäugt werden(32). In diesem Modell wurde eine Enterokolitis durch Hyperkapnie und anschließender Reoxigenierung in unreifen Ratten (1 Tag alt) induziert. In reifen Ratten (25-30 Tage alt) konnte experimentelle Enterokolitis durch die gleiche Behandlung ausgelöst werden(55).

In verschiedenen Tiermodellen konnte eine Enterokolitis nur ausgelöst werden, wenn die Tiere mit Formula gefüttert wurden. Wurden sie gesäugt, blieb der Darmschaden aus. In einer Untersuchung von Barlow et al. schützte die Gabe von Muttermilch im Vergleich mit Formula komplett vor Hypoxie-induzierter Enterokolitis(156). Da nur bei Formula ernährten Tieren eine Bakterienüberwucherung post mortem feststellbar war, wird hier die Rolle der Darmflora als wichtiger Faktor diskutiert. Muttermilch schützt vor Enterokolitis durch Induktion der passiven, intestinalen Immunität und Kontrolle der intestinalen Flora(156). In einer anderen Untersuchung aus dem Jahre 1994 bestätigten auch Caplan et al. diesen protektiven Effekt(157). Frühgeborene und neugeborene Ratten wurden mit Formula gefüttert, bakteriell infiziert und einer Asphyxie unterzogen. 77 % der Tiere entwickelten eine Enterokolitis und 86 % starben nach 96 Stunden. Die gesäugten und ansonsten gleich behandelten Tiere überlebten alle und wiesen histologisch keine Zeichen für intestinale Läsionen auf.

Das Tiermodell nach Okur hat den Vorteil, dass der protektive Effekt der Muttermilch in unsere Ergebnisse einbezogen wird. Diese Situation entspricht der der Frühgeborenen, die teilweise trotz der Ernährung mit Muttermilch an Nekrotisierender Enterokolitis erkranken. Bei unseren Tieren war Darmschaden nachweisbar, obwohl sie von der Mutter gesäugt wurden, was das Modell nach Okur als adäquates Modell zur Induktion einer NEC auszeichnet. Die Kombination von Hyperkapnie gefolgt von Hyperoxie in der Reoxigenierungsperiode nach Okur ist typisch für die klinische Situation der schwer an NEC erkrankten Kinder. Der Gewebeschaden resultiert hierbei aus der Periode der Azidose mit reduzierter intestinaler Perfusion, gefolgt von der Freisetzung reaktiver Sauerstoffradikale, Transkriptionsfaktor NfκB, dem proinflammatorischen TNF-α und IL-1β. So spielt H/R eine wichtige Rolle in der Entwicklung des „gut-barrier-failure“(27;158-160). Wir entschieden uns daher für das einzige publizierte Modell, bei dem die Tiere - analog zur Situation der Frühgeborenen - gestillt und bis auf die kurze Phase der H/R (15 min) bei der Mutter verbleiben. So scheiden neben dem Entzug der Muttermilch auch andere auslösende Faktoren wie längere oder häufigere Phasen von Kälte, Stress oder Trennung von der Mutter, wie sie in anderen Modellen vorkommen, weitgehend aus. Unser Modell bleibt daher nahe an der klinischen Situation von Frühgeborenen, bei denen vor allem Schwankungen in den Partialdrücken von O₂ und CO₂, Unreife und die für die Reife zu frühe Translokation von Bakterien durch den Beginn der enteralen Ernährung als Risikofaktoren für die Entwicklung der NEC im Vordergrund stehen.

5.2 „Gut-barrier-failure“ und Apoptose nur bei neugeborenen Ratten

Wir beschreiben mit unseren Untersuchungen frühe Mechanismen der Darmschädigung. Wir konnten das „gut-barrier-failure“ anhand erhöhter intestinaler Permeabilität und anhand der Apoptoserate quantifizieren. Ein makroskopischer oder histologischer Darmschaden als sekundäres Schädigungsphänomen wurde nicht untersucht. FITC-Dextran kann im gesunden Darm nicht resorbiert werden, ist aber bei Permeabilitätserhöhung der Barriere und „gut-barrier-failure“ im Serum nachzuweisen. In unserem Modell kam es nur bei den neugeborenen Ratten zum „gut-barrier-failure“, bei reifen Tieren konnten wir auch mit dieser sensitiven Methode keinen Unterschied zur Kontrollgruppe sehen. Auch eine Erhöhung der Caspase 3 als Zeichen der Apoptose konnten wir nur bei den unreifen Tieren sehen. Wir konnten so Unterschiede zwischen reifen und unreifen Tieren aufzeigen: Nur unreife Tiere zeigten nach H/R eine Störung der Barrierefunktion der Darmschleimhaut und eine erhöhte Apoptoserate der Darmzellen. Die fehlende Integrität der Darmschleimhaut bei den Frühgeborenen- sei es durch Unreife oder durch H/R induzierten Stress- stellt den wichtigsten Faktor für die Entwicklung einer Nekrotisierenden Enterokolitis dar. Hochmolare Kost und die Translokation von Bakterien in die Darmschleimhaut durch die Nahrung und die Umgebung führen dann letztendlich zur intramuralen Entzündung und Pneumatosis intestinalis.

5.3 Inflammatorische Reaktionen in unserem Modell

In Enterozyten von Neugeborenen, die an Nekrotisierender Enterokolitis leiden, ist die Expression von iNOS stark erhöht. Die mRNA Expression von iNOS in den intestinalen Villi einer akuten NEC ist assoziiert mit Apoptose und Akkumulation von nitrierten Proteinen(154). Ständige Überproduktion von NO durch Überexpression von iNOS scheint im Darm schädlich zu sein(51). NO und sein Metabolit Peroxynitrit führen zur Apoptose von Enterozyten und zum "gut-barrier-failure". Nadler et al. setzten Enterozyten Peroxynitrit aus, was zu einem Anstieg der aktivierten Caspase-3 führte(161). Die induzierbare NO-Synthase (iNOS) ist bei Inflammation oder Infektion in der Lage, große Mengen an NO zu produzieren.

Dagegen soll die Stimulation der konstitutiven NO-Synthase (cNOS) vor experimenteller Enterokolitis schützen. Die cNOS setzt kleine Mengen an NO frei und hält so die intestinale Perfusion aufrecht(55).

Wir konnten eine Zunahme der iNOS mRNA Expression nur in den neugeborenen, unreifen Ratten sehen, nicht dagegen in den reifen Ratten. Wie auch schon von Ford et al. beschrieben, ist die Zunahme der iNOS Expression mit Darmschaden und Apoptoseaktivierung assoziiert(154). Hiermit übereinstimmend fanden wir in neugeborenen Ratten als Antwort auf H/R eine erhöhte Expression von iNOS, Darmschaden und erhöhte mRNA Expression von Pro-Caspase 3 sowie Aktivierung der Caspase-3 als Teil der Apoptosekaskade. In den reifen Ratten waren diese Effekte nach H/R nicht zu erkennen.

In den unreifen Kontrolltieren (ohne H/R) konnten wir weder eine Caspase-3 Aktivierung noch eine Expressionssteigerung von iNOS erkennen. Auch in den reifen Ratten ohne H/R konnten wir keine dieser Veränderungen feststellen. Hier stellt unser Modell der experimentellen Enterokolitis die Unterschiede der inflammatorischen Reaktionsmuster dar, wobei schädliche Effekte ausschließlich im unreifen Intestinum nachzuweisen sind.

5.4 HO-1 Expressionssteigerung als Schutz vor intestinaler Zellschädigung

Die Expression der Hämoxxygenase wird durch verschiedene Faktoren induziert, unter anderem durch ihr Substrat Häm. Die Induktion in der Hypoxie wird über HIF (Hypoxia-inducible factor-1 α) vermittelt(69;88;149;162). HIF-1 wurde ursprünglich als ein Hypoxie induzierbarer nuklearer Faktor in Hep3B Zellen identifiziert, der an Sequenzen bindet, die das Erythropoetin (EPO) Gen bei Hypoxie induzieren. Das Produkt EPO wird primär in der fetalen Leber und in der Niere hergestellt(69). Andere Studien weisen HIF-1 und seine Funktion in Zelllinien verschiedenen Gewebes nach (HeLa zervikale Karzinomzellen, Ltk 2 Fibroblasten, c2c12 skeletalen Myoblasten und CHO (chinese hamster ovary) Zellen). Sie legen nahe, dass dieser Transkriptionsfaktor eine generelle Rolle in der Antwort auf Hypoxie in Zellen von Säugetieren spielt und die Expression anderer Hypoxie induzierter Gene regulieren könnte(163). Es wurden Bindungsstellen für HIF-1 in anderen durch Hypoxie induzierbaren Genen identifiziert. Diese kodieren z.B. für die induzierbare NO-Synthase(164), vascular endothelial growth factor (VEGF)(165;166) und die glycolytischen Enzyme Aldolase A, Aldolase 1, Laktatdehydrogenase A und Phosphoglyceratkinase 1(167;168).

In Enterokolitismodellen konnten durch Induktion der HO-1 histomorphologische Veränderungen bei der Ratte vermindert werden. Die Ausschüttung inflammatorischer Metabolite und die Darmschädigung, gemessen an der Permeabilitätsstörung des Epithels, wurden durch die Induktion der HO-1 ebenfalls verringert(85;169).

HO-1 Knock-out Mäuse (HO-1 $^{-/-}$) zeigten, dass das HO-System unerlässlich ist für das Überleben der Mäuse, besonders als Schutz vor oxidativem Stress(170-172). Die HO-1 $^{-/-}$ Mäuse zeigten eine verringerte Geburtenrate, Wachstumsretardierung, eine mikrozytäre-hypochrome Anämie, Eisenablagerung im Gewebe, Hepatosplenomegalie, Lymphadenopathie, Leukozytose und Glomerulonephritis(170).

HO-1 wird als einer der sensitivsten Indikatoren bei zellulärem Stress betrachtet. Ein Anstieg der HO-1 Expression könnte einen adaptiven Mechanismus darstellen, der Zellen durch seine antiapoptotischen Fähigkeiten vor Stress schützt(59;173;174). Wie Zuckerbraun et al. beschreiben, wirkt die HO-1 durch Hemmung der Expression von inflammatorischen Zytokinen und iNOS im Darm protektiv(128). Der frühe Anstieg der HO-1 Expression in reifen Ratten nach H/R ist assoziiert mit dem Fehlen von Apoptose

und „gut-barrier-failure“. Nakoa et al. fanden keinen Anstieg der HO-1 Expression in gesäugten Tieren in einem I/R Modell der NEC und diskutierten den protektiven Effekt der Muttermilch als Grund für dieses Ergebnis(123). In unserem Modell fand sich auch bei den unreifen, gesäugten Tieren ein Anstieg der HO-1 Expression nach H/R. Dieser Anstieg trat in den unreifen Ratten jedoch erst nach dem Anstieg von iNOS, der Aktivierung von Caspase 3 und „gut-barrier-failure“ auf. Die spätere und geringere Expressionssteigerung von HO-1 im Vergleich zu reifen Tieren könnte somit die Ursache für die fehlende Protektion unreifer Tiere sein. Der HO-1 käme damit eine Schlüsselrolle bei der Regulation der intestinalen Inflammation zu.

Eine reifeabhängige Expression der HO-1 wurde nach unserem Wissen bisher nur in der Niere beschrieben. Adachi et al. untersuchten die Expression von HO-1 mRNA im proximalen Tubulus der Rattenniere. In der unreifen Niere (10 Tage alte Ratten) war die Expression von HO-1 mRNA höher als in der reifen Niere (40 Tage alte Ratten). Im Gegensatz zum Darm wurde bei unreifen Nieren eine höhere Resistenz gegenüber oxidativem Stress beobachtet. Diese wird unter anderem auf die vermehrte HO-1 Expression zurückgeführt(175).

Die protektiven Eigenschaften der HO-1 in den verschiedenen Organsystemen wurden vielfach untersucht und genutzt. Die Induktion der HO-1 durch Hämin ist dabei ein etabliertes Modell, diese Protektion zu verstärken(85;98). Nach unserem Wissen gab es noch keine Versuche, die HO-1 bei unreifen Säugern zu induzieren. Wir konnten zeigen, dass die Induktion der HO-1 bei unreifen Tieren zu einer früheren Expressionssteigerung und damit zu einem Ausbleiben des „gut-barrier-failure“ im Darm führt. Der Schutz durch die Stimulierung der HO-Expression bei unreifen Tieren zeigt einen kausalen Zusammenhang zwischen der erhöhten Anfälligkeit der unreifen Tiere im H/R Modell und der späten, mangelnden HO-1 Expression verglichen mit reifen Tieren. Dadurch kommt der späten, mangelnden HO-1 Expression eine entscheidende Rolle in der Pathogenese von Entzündungsreaktionen im unreifen Darm zu. Bei der Prophylaxe der Nekrotisierenden Enterokolitis könnte die Induktion der HO-1 in der Zukunft genutzt werden.

5.5 Mechanismen der durch CO vermittelten Zytoprotektion

CO nimmt als Produkt der Hämoxxygenase eine wichtige Rolle bei der Zytoprotektion ein. Exogenes CO inhibiert die T-Zellproliferation und die Expression und Aktivierung der Caspase 3 und der Caspase 8(176). Auch in unserem Modell zeigte sich bei reifen Tieren nach HO-1 Steigerung ein Ausbleiben der Caspase 3-Aktivierung. Erste Untersuchungen zeigten, dass CO seinen vasodilatatorischen Effekt über cGMP-abhängige Relaxation der glatten Muskulatur ausübt. Ähnlich wie der gut untersuchte Vasodilatator NO (Stickstoffmonoxid) bindet CO an die Häm-Gruppe der löslichen Guanylatcyclase (sGC), die die Umwandlung von GTP zu cGMP katalysiert (177-185). Während die Affinität zu sGC von CO und NO äquivalent ist, ist die Potenz NO-stimulierter cGMP Produktion 30-100 mal größer als die CO stimulierte Produktion(59;186).

NOS und HO-1 werden bei Stress koinduziert. Man geht davon aus, dass HO die Effekte von NOS nach der initialen Stressantwort sowohl reguliert als auch fortführt. NO induziert HO-1 und die nachfolgende Produktion von CO(187), gleichzeitig scheinen HO-1 und CO die Aktivität von NOS in einem Feedback-Mechanismus zu inhibieren(128;188;189). NO ist sowohl ein potentes Vasorelaxanz als auch ein freies Radikal durch die Bildung von Peroxynitrit-Radikalen. Diese Ergebnisse implizieren, dass die Aktivität der HO-1 die Bildung freier NO Radikale begrenzt und gleichzeitig den vasodilatatorischen Effekt des Moleküls durch CO stimulierte cGMP Produktion aufrechterhält(113). Die signifikante anti-inflammatorische(190) und antiapoptotische(191) Wirkung von CO nach Sauerstoff-induziertem Lungenschaden scheint p38 MAPK abhängig zu sein. Eine Vielzahl von Studien hat den spezifischen Effekt von CO auf die inflammatorische Antwort analysiert. Durch Sepsis oder Organtransplantation induzierter Endothelschaden hat eine Kaskade von Ereignissen zur Folge: Margination und Extravasation von Leukozyten, die Expressionssteigerung von endothelialen Zelladhäsionsproteinen (ICAM-1), Sekretion von inflammatorischen Zytokinen (IL-1 β , IL-2, IL-6 und TNF- α) und Proliferation der glatten Muskulatur. Bei Organtransplantationen führt dies zu Gefäßverschlüssen und Transplantatversagen. In verschiedenen Modellen konnte gezeigt werden, dass CO die inflammatorische Antwort moduliert, indem es die Ausschüttung inflammatorischer Zytokine reduziert und die

glatte Muskelzellproliferation unterbindet. Gleichzeitig steigert CO die Produktion anti-inflammatorischer Zytokine (IL-10) über Interaktion mit der MAPK Kaskade(113). CO unterdrückt die T-Zellproliferation und IL-2 Produktion in vitro über Inhibition des ERK Signalwegs(192). CO inhibiert die Produktion von TNF- α , IL-1 β und des Makrophagen inflammatorischen Proteins-1 β , während IL-10 in vivo und in vitro zunehmen(193). Morse et al. haben zeigen können, dass CO die Produktion von IL-6 als Antwort auf Sepsis über den JNK Weg senkt(194).

5.6 Biliverdin und Bilirubin

Bilirubin und Biliverdin zeigen antioxidative Wirkung gegen Peroxynitrit, ein extrem potentes und stabiles Oxidanz, das bei der Interaktion von NO und Superoxid Anion entsteht(195;196). Bilirubin hat anti-inflammatorische Effekte. Eine Studie von Hayashi et al. untersuchte die Beziehung zwischen HO-1 und endothelialer Zell-Leukozyten Interaktion in vivo(197). Die HO-1 Expression wurde in mesenterialem Gewebe induziert. Dies geschah durch intraperitoneale Injektion von Hämin und nachfolgendem oxidativem Stress, entweder durch Infusion von Hydrogen Peroxid oder durch Ischämie-Reperfusion. In den HO-1 induzierten Ratten wurde die Leukozytenadhäsion und Leukozytenwanderung im Vergleich zu Kontrolltieren inhibiert. Weitere Gabe von Bilirubin und Biliverdin, nicht aber von CO verhinderte die Leukozytenadhäsion.

5.7 Ferritin

Die HO-1 unabhängige Wirkung von Ferritin in lebertransplantierten Ratten und Zellkulturen wurde mit Hilfe eines rekombinanten Adenovirus, das das Gen für Ferritin überexprimierte, untersucht. Der Schaden durch Ischämie/ Reperfusion in der Leber wurde durch Ferritin geringer. Der protektive Effekt von Ferritin ist mit einer Inhibition der Apoptose in Endothelzellen und Hepatozyten in vivo assoziiert. Ferritin schützt kultivierte Endothelzellen vor Apoptose, die von einer Vielzahl von Stimuli induziert wird(144).

5.8 Ausblick

In einem klinisch relevanten Modell der NEC ohne Einflüsse von Infektion oder Ernährung, konnten wir zum ersten Mal zeigen, dass „gut-barrier-failure“ eine Folge von verzögerter Expression von Abwehrmechanismen sein könnte, die durch Unreife bedingt ist. Dieser verzögerte Anstieg der protektiven HO-1 Expression könnte zumindest teilweise die hohe Anfälligkeit Frühgeborener für die NEC auf molekularbiologischer Ebene erklären. Die Produkte der enzymatischen Reaktion von HO-1 (CO, Biliverdin, Bilirubin, Ferritin) begrenzen die Entzündungsreaktion durch Hemmung der Apoptose und proinflammatorischer Moleküle sowie durch das Abfangen von Radikalen. Wir konnten zeigen, dass die Induktion der HO-1 bei unreifen Tieren zu einer früheren Expressionssteigerung und damit zu einem Ausbleiben des „gut-barrier-failure“ im Darm führt. Der Schutz durch die Stimulierung der HO-Expression bei unreifen Tieren zeigt einen kausalen Zusammenhang zwischen der erhöhten Anfälligkeit der unreifen Tiere im H/R Modell und der späten, mangelnden HO-1 Expression verglichen mit reifen Tieren. Dadurch kommt der späten, mangelnden HO-1 Expression eine entscheidende Rolle in der Pathogenese von Entzündungsreaktionen im unreifen Darm zu. Aktivierung der HO-1 Expression durch Hämin oder die kontrollierte Therapie mit exogenem CO könnten neue Ansätze in der Prävention der Nekrotisierenden Enterokolitis darstellen. Die Hemmung der HO-1 durch SnPP oder Analoga(198;199), wie sie zur Therapie des Ikterus neonatorum vorgeschlagen wurde, scheint nach unseren Untersuchungen bei Frühgeborenen nicht sinnvoll zu sein.

Zusammenfassung

Hintergrund: Die Nekrotisierende Enterokolitis ist der häufigste gastrointestinale Notfall der Neonatalperiode. Der Hauptrisikofaktor für eine NEC ist die Frühgeburtlichkeit. Ziel unserer Untersuchungen war es, die Unreife als Hauptursache für die NEC auf molekularer Ebene besser zu verstehen.

Methoden: Enterokolitis wurde in unreifen und reifen Ratten durch Hyperkapnie/ Reoxigenierung (H/R) induziert. Die Schädigung des Darms („gut-barrier-failure“) wurde anhand der FITC-Dextran Konzentration im Blut abgeschätzt. Die Expression der Hämoxygenase-1 (HO-1), der induzierbaren NO-Synthetasen (iNOS) und der Caspase-3 wurde durch quantitative PCR und Western Blot Analysen gemessen. Die Aktivität der Caspase-3 wurde kolorimetrisch bestimmt.

Ergebnisse: In reifen Ratten fanden wir eine signifikante Zunahme der HO-1 Expression nach H/R, aber weder „gut-barrier-failure“ noch eine Zunahme der Caspase-3 Aktivität oder der iNOS Expression. Bei den unreifen Tieren kam es 24 Stunden später als bei den reifen Tieren zu einem Anstieg der HO-1 Expression. Dies ging einher mit Apoptose (Aktivierung der Caspase-3), einer Zunahme der iNOS Expression und „gut-barrier-failure“. Bei Aktivierung der HO-1 durch Hämin blieb der Darmschaden aus. Bei Hemmung durch SnPP kam es ohne H/R zum „gut-barrier-failure“.

Schlussfolgerung: In einem klinisch relevanten, nicht-infektiösen Enterokolitis-Modell konnten wir zum ersten Mal zeigen, dass „gut-barrier-failure“ eine Folge verzögerter Expression von Abwehrmechanismen sein könnte. Die verspätete Expression der protektiven HO-1 in unreifen Därmen könnte die erhöhte Anfälligkeit Frühgeborener gegenüber der NEC auf molekularbiologischer Ebene erklären. Die Induktion der HO-1 verhindert den Darmschaden im H/R Modell. Eine Induktion der HO-1 durch Hämin oder eine kontrollierte Therapie mit exogenem CO könnten neue Ansätze in der Prävention der Nekrotisierenden Enterokolitis darstellen.

Schlüsselwörter: Nekrotisierende Enterokolitis, Hyperkapnie/ Reoxigenierung, Hämoxygenase-1, „gut-barrier-failure“,

Literaturverzeichnis

- (1) Thompson AM, Bizzarro MJ. Necrotizing enterocolitis in newborns: pathogenesis, prevention and management. *Drugs* 2008;68(9):1227-38.
- (2) Lin PW, Stoll BJ. Necrotising enterocolitis. *Lancet* 2006 October 7;368(9543):1271-83.
- (3) Meinzen-Derr J, Poindexter B, Wrage L, Morrow AL, Stoll B, Donovan EF. Role of human milk in extremely low birth weight infants' risk of necrotizing enterocolitis or death. *J Perinatol* 2009 January;29(1):57-62.
- (4) Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF). Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Kinderchirurgie. Nekrotisierende Enterokolitis. September 2002. http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/006-116.pdf
- (5) Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF). Leitlinien der Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin. Nekrotisierende Enterokolitis. 1996/2010. http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/024-009I_S2k_Nekrotisierende_Enterokolitis_lang.pdf
- (6) Bell MJ. Neonatal necrotizing enterocolitis. *N Engl J Med* 1978 February 2;298(5):281-2.
- (7) Walsh MC, Kliegman RM. Necrotizing enterocolitis: treatment based on staging criteria. *Pediatr Clin North Am* 1986 February;33(1):179-201.
- (8) Halac E, Halac J, Begue EF, Casanas JM, Indiveri DR, Petit JF et al. Prenatal and postnatal corticosteroid therapy to prevent neonatal necrotizing enterocolitis: a controlled trial. *J Pediatr* 1990 July;117(1 Pt 1):132-8.
- (9) LaGamma EF, Ostertag SG, Birenbaum H. Failure of delayed oral feedings to prevent necrotizing enterocolitis. Results of study in very-low-birth-weight neonates. *Am J Dis Child* 1985 April;139(4):385-9.
- (10) Ostertag SG, LaGamma EF, Reisen CE, Ferrentino FL. Early enteral feeding does not affect the incidence of necrotizing enterocolitis. *Pediatrics* 1986 March;77(3):275-80.
- (11) Eibl MM, Wolf HM, Furnkranz H, Rosenkranz A. Prevention of necrotizing enterocolitis in low-birth-weight infants by IgA-IgG feeding. *N Engl J Med* 1988 July 7;319(1):1-7.
- (12) Carrion V, Egan EA. Prevention of neonatal necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1990 October;11(3):317-23.
- (13) Bicakci U, Tander B, Ariturk E, Aydin BK, Aydin O, Rizalar R et al. Effects of omeprazole and gentamicin on the biochemical and histopathological alterations of the hypoxia/ reoxygenation induced intestinal injury in newborn rats. *Pediatr Surg Int* 2005 October;21(10):800-5.
- (14) Grylack LJ, Scanlon JW. Oral gentamicin therapy in the prevention of neonatal necrotizing enterocolitis. A controlled double-blind trial. *Am J Dis Child* 1978 December;132(12):1192-4.
- (15) Caplan MS. Probiotic and prebiotic supplementation for the prevention of neonatal necrotizing enterocolitis. *J Perinatol* 2009 May;29 Suppl 2:S2-S6.
- (16) Speer CP, Physiologie der Perinatalzeit, Postnatale Adaptation. In: Koletzko (Hrsg.), von Harnack, *Kinderheilkunde*. 11. Auflage. Springer Verlag 1999: 56-57.

- (17) Caplan MS, Sun XM, Hsueh W. Hypoxia causes ischemic bowel necrosis in rats: the role of platelet-activating factor (PAF-acether). *Gastroenterology* 1990 October;99(4):979-86.
- (18) Lelli JLJ, Drongowski RA, Coran AG, Abrams GD. Hypoxia-induced bacterial translocation in the puppy. *J Pediatr Surg* 1992 August;27(8):974-81.
- (19) Gibson DL, Sheps SB, Uh SH, Schechter MT, McCormick AQ. Retinopathy of prematurity-induced blindness: birth weight-specific survival and the new epidemic. *Pediatrics* 1990 September;86(3):405-12.
- (20) Saugstad OD. Chronic lung disease: oxygen dogma revisited. *Acta Paediatr* 2001 February;90(2):113-5.
- (21) Weinberger B, Laskin DL, Heck DE, Laskin JD. Oxygen toxicity in premature infants. *Toxicol Appl Pharmacol* 2002 May 15;181(1):60-7.
- (22) Del Maestro R, Thaw HH, Bjork J, Planker M, Arfors KE. Free radicals as mediators of tissue injury. *Acta Physiol Scand Suppl* 1980;492:43-57.
- (23) Jenkinson SG. Oxygen toxicity. *New Horiz* 1993 November;1(4):504-11.
- (24) Dorey CK, Aouididi S, Reynaud X, Dvorak HF, Brown LF. Correlation of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor with extraretinal neovascularization in the rat. *Arch Ophthalmol* 1996 October;114(10):1210-7.
- (25) Aiello LP. Vascular endothelial growth factor and the eye. Past, present and future. *Arch Ophthalmol* 1996 October;114(10):1252-4.
- (26) Hansbrough F, Priebe CJJ, Falterman KW, Bornside GH, Welsh RA. Pathogenesis of early necrotizing enterocolitis in the hypoxic neonatal dog. *Am J Surg* 1983 January;145(1):169-75.
- (27) Barlow B, Santulli TV. Importance of multiple episodes of hypoxia or cold stress on the development of enterocolitis in an animal model. *Surgery* 1975 May;77(5):687-90.
- (28) Langer JC, Sohal SS, Mumford DA. Mucosal permeability in the immature rat intestine: effects of ischemia-reperfusion, cold stress, hypoxia, and drugs. *J Pediatr Surg* 1993 October;28(10):1380-3.
- (29) Parks DA, Bulkley GB, Granger DN, Hamilton SR, McCord JM. Ischemic injury in the cat small intestine: role of superoxide radicals. *Gastroenterology* 1982 January;82(1):9-15.
- (30) Pitt RM, McKelvey TG, Saenger JS, Shah AK, Jones HP, Mancini EA et al. A tungsten-supplemented diet delivered by transplacental and breast-feeding routes lowers intestinal xanthine oxidase activity and affords cytoprotection in ischemia-reperfusion injury to the small intestine. *J Pediatr Surg* 1991 August;26(8):930-5.
- (31) Vaughan WG, Horton JW, Walker PB. Allopurinol prevents intestinal permeability changes after ischemia-reperfusion injury. *J Pediatr Surg* 1992 August;27(8):968-72.
- (32) Okur H, Kucukaydin M, Kose K, Kontas O, Dogan P, Kazez A. Hypoxia-induced necrotizing enterocolitis in the immature rat: the role of lipid peroxidation and management by vitamin E. *J Pediatr Surg* 1995 October;30(10):1416-9.
- (33) Ruemmele FM, Beaulieu JF, Dionne S, Levy E, Seidman EG, Cerf-Bensussan N et al. Lipopolysaccharide modulation of normal enterocyte turnover by toll-like receptors is mediated by endogenously produced tumour necrosis factor alpha. *Gut* 2002 December;51(6):842-8.
- (34) Nanthakumar NN, Fusunyan RD, Sanderson I, Walker WA. Inflammation in the developing human intestine: A possible pathophysiologic contribution to necrotizing enterocolitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000 May 23;97(11):6043-8.

- (35) Nanthakumar NN, Young C, Ko JS, Meng D, Chen J, Buie T et al. Glucocorticoid responsiveness in developing human intestine: possible role in prevention of necrotizing enterocolitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005 January;288(1):G85-G92.
- (36) Rhee SJ, Walker WA, Cherayil BJ. Developmentally regulated intestinal expression of IFN-gamma and its target genes and the age-specific response to enteric Salmonella infection. *J Immunol* 2005 July 15;175(2):1127-36.
- (37) Hoy CM, Wood CM, Hawkey PM, Puntis JW. Duodenal microflora in very-low-birth-weight neonates and relation to necrotizing enterocolitis. *J Clin Microbiol* 2000 December;38(12):4539-47.
- (38) Dame JB, Juul SE. The distribution of receptors for the pro-inflammatory cytokines interleukin (IL)-6 and IL-8 in the developing human fetus. *Early Hum Dev* 2000 April;58(1):25-39.
- (39) Lin J, Holzman IR, Jiang P, Babyatsky MW. Expression of intestinal trefoil factor in developing rat intestine. *Biol Neonate* 1999 August;76(2):92-7.
- (40) Babyatsky MW, deBeaumont M, Thim L, Podolsky DK. Oral trefoil peptides protect against ethanol- and indomethacin-induced gastric injury in rats. *Gastroenterology* 1996 February;110(2):489-97.
- (41) Mashimo H, Wu DC, Podolsky DK, Fishman MC. Impaired defense of intestinal mucosa in mice lacking intestinal trefoil factor. *Science* 1996 October 11;274(5285):262-5.
- (42) Bhatia AM, Feddersen RM, Musemeche CA. The role of luminal nutrients in intestinal injury from mesenteric reperfusion and platelet-activating factor in the developing rat. *J Surg Res* 1996 June;63(1):152-6.
- (43) Nafday SM, Chen W, Peng L, Babyatsky MW, Holzman IR, Lin J. Short-chain fatty acids induce colonic mucosal injury in rats with various postnatal ages. *Pediatr Res* 2005 February;57(2):201-4.
- (44) DeMeo MT, Mutlu EA, Keshavarzian A, Tobin MC. Intestinal permeation and gastrointestinal disease. *J Clin Gastroenterol* 2002 April;34(4):385-96.
- (45) Taylor CT, Colgan SP. Therapeutic targets for hypoxia-elicited pathways. *Pharm Res* 1999 October;16(10):1498-505.
- (46) Furuta GT, Turner JR, Taylor CT, Hershberg RM, Comerford K, Narravula S et al. Hypoxia-inducible factor 1-dependent induction of intestinal trefoil factor protects barrier function during hypoxia. *J Exp Med* 2001 May 7;193(9):1027-34.
- (47) Semenza GL. Perspectives on oxygen sensing. *Cell* 1999 August 6;98(3):281-4.
- (48) Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 1999;68:383-424.
- (49) Adrain C, Martin SJ. The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends Biochem Sci* 2001 June;26(6):390-7.
- (50) Martin W. Robert F. Furchgott, Nobel laureate (1916-2009) - a personal reflection. *Br J Pharmacol* 2009 October;158(3):633-7.
- (51) Kolios G, Valatas V, Ward SG. Nitric oxide in inflammatory bowel disease: a universal messenger in an unsolved puzzle. *Immunology* 2004 December;113(4):427-37.
- (52) Stuehr DJ. Enzymes of the L-arginine to nitric oxide pathway. *J Nutr* 2004 October;134(10 Suppl):2748S-51S.

- (53) Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 1994 March 1;298 (Pt 2):249-58.
- (54) Stuehr DJ, Griffith OW. Mammalian nitric oxide synthases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 1992;65:287-346.
- (55) Akisu M, Ozmen D, Baka M, Habif S, Yalaz M, Arslanoglu S et al. Protective effect of dietary supplementation with L-arginine and L-carnitine on hypoxia/reoxygenation-induced necrotizing enterocolitis in young mice. *Biol Neonate* 1996 February;81(4):260-5.
- (56) Morris SMJ, Billiar TR. New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis. *Am J Physiol* 1994 June;266(6 Pt 1):E829-E839.
- (57) Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1968 October;61(2):748-55.
- (58) Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme. *J Biol Chem* 1969 December 10;244(23):6388-94.
- (59) Otterbein LE, Choi AM. Heme oxygenase: colors of defense against cellular stress. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000 December;279(6):L1029-L1037.
- (60) Fang J, Akaike T, Maeda H. Antiapoptotic role of heme oxygenase (HO) and the potential of HO as a target in anticancer treatment. *Apoptosis* 2004 January;9(1):27-35.
- (61) Choi AM, Alam J. Heme oxygenase-1: function, regulation, and implication of a novel stress-inducible protein in oxidant-induced lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996 July;15(1):9-19.
- (62) Maines MD. Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *FASEB J* 1988 July;2(10):2557-68.
- (63) McCoubrey WKJ, Huang TJ, Maines MD. Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. *Eur J Biochem* 1997 July 15;247(2):725-32.
- (64) Keyse SM, Tyrrell RM. Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989 January;86(1):99-103.
- (65) Maeshima H, Sato M, Ishikawa K, Katagata Y, Yoshida T. Participation of altered upstream stimulatory factor in the induction of rat heme oxygenase-1 by cadmium. *Nucleic Acids Res* 1996 August 1;24(15):2959-65.
- (66) Vile GF, Tyrrell RM. Oxidative stress resulting from ultraviolet A irradiation of human skin fibroblasts leads to a heme oxygenase-dependent increase in ferritin. *J Biol Chem* 1993 July 15;268(20):14678-81.
- (67) Carraway MS, Ghio AJ, Carter JD, Piantadosi CA. Expression of heme oxygenase-1 in the lung in chronic hypoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000 April;278(4):L806-L812.
- (68) Panchenko MV, Farber HW, Korn JH. Induction of heme oxygenase-1 by hypoxia and free radicals in human dermal fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000 January;278(1):C92-C101.
- (69) Lee PJ, Jiang BH, Chin BY, Iyer NV, Alam J, Semenza GL et al. Hypoxia-inducible factor-1 mediates transcriptional activation of the heme oxygenase-1 gene in response to hypoxia. *J Biol Chem* 1997 February 28;272(9):5375-81.

- (70) Motterlini R, Foresti R, Bassi R, Calabrese V, Clark JE, Green CJ. Endothelial heme oxygenase-1 induction by hypoxia. Modulation by inducible nitric-oxide synthase and S-nitrosothiols. *J Biol Chem* 2000 May 5;275(18):13613-20.
- (71) Taylor JL, Carraway MS, Piantadosi CA. Lung-specific induction of heme oxygenase-1 and hyperoxic lung injury. *Am J Physiol* 1998 April;274(4 Pt 1):L582-L590.
- (72) Lee PJ, Alam J, Sylvester SL, Inamdar N, Otterbein L, Choi AM. Regulation of heme oxygenase-1 expression in vivo and in vitro in hyperoxic lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996 June;14(6):556-68.
- (73) Dennery PA, Spitz DR, Yang G, Tatarov A, Lee CS, Shegog ML et al. Oxygen toxicity and iron accumulation in the lungs of mice lacking heme oxygenase-2. *J Clin Invest* 1998 March 1;101(5):1001-11.
- (74) Ossola JO, Tomaro ML. Heme oxygenase induction by UVA radiation. A response to oxidative stress in rat liver. *Int J Biochem Cell Biol* 1998 February;30(2):285-92.
- (75) Keyse SM, Tyrrell RM. Both near ultraviolet radiation and the oxidizing agent hydrogen peroxide induce a 32-kDa stress protein in normal human skin fibroblasts. *J Biol Chem* 1987 October 25;262(30):14821-5.
- (76) Oshiro S, Takeuchi H, Matsumoto M, Kurata S. Transcriptional activation of heme oxygenase-1 gene in mouse spleen, liver and kidney cells after treatment with lipopolysaccharide or hemoglobin. *Cell Biol Int* 1999;23(7):465-74.
- (77) Camhi SL, Alam J, Otterbein L, Sylvester SL, Choi AM. Induction of heme oxygenase-1 gene expression by lipopolysaccharide is mediated by AP-1 activation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995 October;13(4):387-98.
- (78) Carraway MS, Ghio AJ, Taylor JL, Piantadosi CA. Induction of ferritin and heme oxygenase-1 by endotoxin in the lung. *Am J Physiol* 1998 September;275(3 Pt 1):L583-L592.
- (79) Otterbein L, Sylvester SL, Choi AM. Hemoglobin provides protection against lethal endotoxemia in rats: the role of heme oxygenase-1. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995 November;13(5):595-601.
- (80) Elbirt KK, Whitmarsh AJ, Davis RJ, Bonkovsky HL. Mechanism of sodium arsenite-mediated induction of heme oxygenase-1 in hepatoma cells. Role of mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 1998 April 10;273(15):8922-31.
- (81) Eyssen-Hernandez R, Ladoux A, Frelin C. Differential regulation of cardiac heme oxygenase-1 and vascular endothelial growth factor mRNA expressions by hemin, heavy metals, heat shock and anoxia. *FEBS Lett* 1996 March 18;382(3):229-33.
- (82) Rizzardini M, Zappone M, Villa P, Gnocchi P, Sironi M, Diomedea L et al. Kupffer cell depletion partially prevents hepatic heme oxygenase 1 messenger RNA accumulation in systemic inflammation in mice: role of interleukin 1beta. *Hepatology* 1998 March;27(3):703-10.
- (83) Terry CM, Clikeman JA, Hoidal JR, Callahan KS. Effect of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 alpha on heme oxygenase-1 expression in human endothelial cells. *Am J Physiol* 1998 March;274(3 Pt 2):H883-H891.
- (84) Choi AM, Sylvester S, Otterbein L, Holbrook NJ. Molecular responses to hyperoxia in vivo: relationship to increased tolerance in aged rats. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995 July;13(1):74-82.
- (85) Attuwaybi BO, Kozar RA, Moore-Olufemi SD, Sato N, Hassoun HT, Weisbrodt NW et al. Heme oxygenase-1 induction by hemin protects against gut ischemia/reperfusion injury. *J Surg Res* 2004 May 1;118(1):53-7.

- (86) Attuwaybi BO, Hassoun HT, Zou L, Kozar RA, Kone BC, Weisbrodt NW et al. Hypothermia protects against gut ischemia/reperfusion-induced impaired intestinal transit by inducing heme oxygenase-1. *J Surg Res* 2003 November;115(1):48-55.
- (87) Bakken AF, Thaler MM, Schmid R. Metabolic regulation of heme catabolism and bilirubin production. I. Hormonal control of hepatic heme oxygenase activity. *J Clin Invest* 1972 March;51(3):530-6.
- (88) Datta PK, Lianos EA. Nitric oxide induces heme oxygenase-1 gene expression in mesangial cells. *Kidney Int* 1999 May;55(5):1734-9.
- (89) Doi K, Akaike T, Fujii S, Tanaka S, Ikebe N, Beppu T et al. Induction of haem oxygenase-1 nitric oxide and ischaemia in experimental solid tumours and implications for tumour growth. *Br J Cancer* 1999 August;80(12):1945-54.
- (90) Hara E, Takahashi K, Takeda K, Nakayama M, Yoshizawa M, Fujita H et al. Induction of heme oxygenase-1 as a response in sensing the signals evoked by distinct nitric oxide donors. *Biochem Pharmacol* 1999 July 15;58(2):227-36.
- (91) Polte T, Abate A, Dennery PA, Schroder H. Heme oxygenase-1 is a cGMP-inducible endothelial protein and mediates the cytoprotective action of nitric oxide. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000 May;20(5):1209-15.
- (92) Koizumi T, Negishi M, Ichikawa A. Induction of heme oxygenase by delta 12-prostaglandin J2 in porcine aortic endothelial cells. *Prostaglandins* 1992 February;43(2):121-31.
- (93) Rossi A, Santoro MG. Induction by prostaglandin A1 of haem oxygenase in myoblastic cells: an effect independent of expression of the 70 kDa heat shock protein. *Biochem J* 1995 June 1;308 (Pt 2):455-63.
- (94) Lautier D, Luscher P, Tyrrell RM. Endogenous glutathione levels modulate both constitutive and UVA radiation/hydrogen peroxide inducible expression of the human heme oxygenase gene. *Carcinogenesis* 1992 February;13(2):227-32.
- (95) Stuhlmeier KM. Activation and regulation of Hsp32 and Hsp70. *Eur J Biochem* 2000 February;267(4):1161-7.
- (96) Shibahara S, Muller RM, Taguchi H. Transcriptional control of rat heme oxygenase by heat shock. *J Biol Chem* 1987 September 25;262(27):12889-92.
- (97) Abbasoglu SD, Erbil Y, Eren T, Giris M, Barbaros U, Yucel R et al. The effect of heme oxygenase-1 induction by octreotide on radiation enteritis. *Peptides* 2006 June;27(6):1570-6.
- (98) Gan HT, Chen JD. Induction of heme oxygenase-1 improves impaired intestinal transit after burn injury. *Surgery* 2007 March;141(3):385-93.
- (99) National Center for Biotechnology Information. Pub Chem Compound.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=pccompound&cmd=search&term=hemin>
- (100) Tsiftoglou AS, Tsamadou AI, Papadopoulou LC. Heme as key regulator of major mammalian cellular functions: molecular, cellular, and pharmacological aspects. *Pharmacol Ther* 2006 August;111(2):327-45.
- (101) Suzuki H, Tashiro S, Sun J, Doi H, Satomi S, Igarashi K. Cadmium induces nuclear export of Bach1, a transcriptional repressor of heme oxygenase-1 gene. *J Biol Chem* 2003 December 5;278(49):49246-53.
- (102) Shibahara S. The heme oxygenase dilemma in cellular homeostasis: new insights for the feedback regulation of heme catabolism. *Tohoku J Exp Med* 2003 August;200(4):167-86.

- (103) Sun J, Hoshino H, Takaku K, Nakajima O, Muto A, Suzuki H et al. Hemoprotein Bach1 regulates enhancer availability of heme oxygenase-1 gene. *EMBO J* 2002 October 1;21(19):5216-24.
- (104) Sardana MK, Kappas A. Dual control mechanism for heme oxygenase: tin(IV)-protoporphyrin potently inhibits enzyme activity while markedly increasing content of enzyme protein in liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987 April;84(8):2464-8.
- (105) Drummond GS, Kappas A. Chemoprevention of neonatal jaundice: potency of tin-protoporphyrin in an animal model. *Science* 1982 September 24;217(4566):1250-2.
- (106) Drummond GS, Kappas A. Prevention of neonatal hyperbilirubinemia by tin protoporphyrin IX, a potent competitive inhibitor of heme oxidation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981 October;78(10):6466-70.
- (107) Simionatto CS, Anderson KE, Drummond GS, Kappas A. Studies on the mechanism of Sn-protoporphyrin suppression of hyperbilirubinemia. Inhibition of heme oxidation and bilirubin production. *J Clin Invest* 1985 February;75(2):513-21.
- (108) Drummond GS, Kappas A. An experimental model of postnatal jaundice in the suckling rat. Suppression of induced hyperbilirubinemia by Sn-protoporphyrin. *J Clin Invest* 1984 July;74(1):142-9.
- (109) Petrache I, Otterbein LE, Alam J, Wiegand GW, Choi AM. Heme oxygenase-1 inhibits TNF-alpha-induced apoptosis in cultured fibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000 February;278(2):L312-L319.
- (110) Takizawa S, Hirabayashi H, Matsushima K, Tokuoka K, Shinohara Y. Induction of heme oxygenase protein protects neurons in cortex and striatum, but not in hippocampus, against transient forebrain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1998 May;18(5):559-69.
- (111) Zhou J, Zhu X, Zhang G, Ling T. Protective effect of hemoglobin-induced heme oxygenase-1 on injured lungs caused by limb ischemia-reperfusion in rats. *Chin J Traumatol* 2002 April;5(2):86-91.
- (112) Tullius SG, Nieminen-Kelha M, Buelow R, Reutzel-Selke A, Martins PN, Pratschke J et al. Inhibition of ischemia/reperfusion injury and chronic graft deterioration by a single-donor treatment with cobalt-protoporphyrin for the induction of heme oxygenase-1. *Transplantation* 2002 September 15;74(5):591-8.
- (113) Kirkby KA, Adin CA. Products of heme oxygenase and their potential therapeutic applications. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006 March;290(3):F563-F571.
- (114) Adin CA, Croker BP, Agarwal A. Protective effects of exogenous bilirubin on ischemia-reperfusion injury in the isolated, perfused rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005 April;288(4):F778-F784.
- (115) Amersi F, Shen XD, Anselmo D, Melinek J, Iyer S, Southard DJ et al. Ex vivo exposure to carbon monoxide prevents hepatic ischemia/reperfusion injury through p38 MAP kinase pathway. *Hepatology* 2002 April;35(4):815-23.
- (116) Fondevila C, Shen XD, Tsuchiyashi S, Yamashita K, Csizmadia E, Lassman C et al. Biliverdin therapy protects rat livers from ischemia and reperfusion injury. *Hepatology* 2004 December;40(6):1333-41.
- (117) Liu XM, Chapman GB, Peyton KJ, Schafer AI, Durante W. Carbon monoxide inhibits apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 2002 August 1;55(2):396-405.

- (118) Neto JS, Nakao A, Kimizuka K, Romanosky AJ, Stolz DB, Uchiyama T et al. Protection of transplant-induced renal ischemia-reperfusion injury with carbon monoxide. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004 November;287(5):F979-F989.
- (119) Otterbein LE, Mantell LL, Choi AM. Carbon monoxide provides protection against hyperoxic lung injury. *Am J Physiol* 1999 April;276(4 Pt 1):L688-L694.
- (120) Mancuso C, Preziosi P, Grossman AB, Navarra P. The role of carbon monoxide in the regulation of neuroendocrine function. *Neuroimmunomodulation* 1997 September;4(5-6):225-9.
- (121) Motterlini R, Gonzales A, Foresti R, Clark JE, Green CJ, Winslow RM. Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide contributes to the suppression of acute hypertensive responses in vivo. *Circ Res* 1998 September 7;83(5):568-77.
- (122) Nakao A, Kimizuka K, Stolz DB, Seda NJ, Kaizu T, Choi AM et al. Protective effect of carbon monoxide inhalation for cold-preserved small intestinal grafts. *Surgery* 2003 August;134(2):285-92.
- (123) Nakao A, Kimizuka K, Stolz DB, Neto JS, Kaizu T, Choi AM et al. Carbon monoxide inhalation protects rat intestinal grafts from ischemia/reperfusion injury. *Am J Pathol* 2003 October;163(4):1587-98.
- (124) Nakao A, Neto JS, Kanno S, Stolz DB, Kimizuka K, Liu F et al. Protection against ischemia/reperfusion injury in cardiac and renal transplantation with carbon monoxide, biliverdin and both. *Am J Transplant* 2005 February;5(2):282-91.
- (125) Ott MC, Scott JR, Bihari A, Badhwar A, Otterbein LE, Gray DK et al. Inhalation of carbon monoxide prevents liver injury and inflammation following hind limb ischemia/reperfusion. *FASEB J* 2005 January;19(1):106-8.
- (126) Song R, Kubo M, Morse D, Zhou Z, Zhang X, Dauber JH et al. Carbon monoxide induces cytoprotection in rat orthotopic lung transplantation via anti-inflammatory and anti-apoptotic effects. *Am J Pathol* 2003 July;163(1):231-42.
- (127) Wang H, Lee SS, Gao W, Czismadia E, McDaid J, Ollinger R et al. Donor treatment with carbon monoxide can yield islet allograft survival and tolerance. *Diabetes* 2005 May;54(5):1400-6.
- (128) Zuckerbraun BS, Otterbein LE, Boyle P, Jaffe R, Upperman J, Zamora R et al. Carbon monoxide protects against the development of experimental necrotizing enterocolitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005 September;289(3):G607-G613.
- (129) Gourley GR. Bilirubin metabolism and kernicterus. *Adv Pediatr* 1997;44:173-229.
- (130) Gopinathan V, Miller NJ, Milner AD, Rice-Evans CA. Bilirubin and ascorbate antioxidant activity in neonatal plasma. *FEBS Lett* 1994 August 1;349(2):197-200.
- (131) Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* 1987 February 27;235(4792):1043-6.
- (132) Vachharajani TJ, Work J, Issekutz AC, Granger DN. Heme oxygenase modulates selectin expression in different regional vascular beds. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000 May;278(5):H1613-H1617.
- (133) Dore S, Snyder SH. Neuroprotective action of bilirubin against oxidative stress in primary hippocampal cultures. *Ann N Y Acad Sci* 1999;890:167-72.
- (134) Mayer M. Association of serum bilirubin concentration with risk of coronary artery disease. *Clin Chem* 2000 November;46(11):1723-7.

- (135) Schwertner HA, Jackson WG, Tolan G. Association of low serum concentration of bilirubin with increased risk of coronary artery disease. *Clin Chem* 1994 January;40(1):18-23.
- (136) Hopkins PN, Wu LL, Hunt SC, James BC, Vincent GM, Williams RR. Higher serum bilirubin is associated with decreased risk for early familial coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996 February;16(2):250-5.
- (137) Vitek L, Jirsa M, Brodanova M, Kalab M, Marecek Z, Danzig V et al. Gilbert syndrome and ischemic heart disease: a protective effect of elevated bilirubin levels. *Atherosclerosis* 2002 February;160(2):449-56.
- (138) Temme EH, Zhang J, Schouten EG, Kesteloot H. Serum bilirubin and 10-year mortality risk in a Belgian population. *Cancer Causes Control* 2001 December;12(10):887-94.
- (139) Ohru T, Yasuda H, Yamaya M, Matsui T, Sasaki H. Transient relief of asthma symptoms during jaundice: a possible beneficial role of bilirubin. *Tohoku J Exp Med* 2003 March;199(3):193-6.
- (140) Heyman E, Ohlsson A, Girschek P. Retinopathy of prematurity and bilirubin. *N Engl J Med* 1989 January 26;320(4):256-Heyman, E.
- (141) Halliwell B. The wanderings of a free radical. *Free Radic Biol Med* 2009 March 1;46(5):531-42.
- (142) Balla G, Jacob HS, Balla J, Rosenberg M, Nath K, Apple F et al. Ferritin: a cytoprotective antioxidant strategem of endothelium. *J Biol Chem* 1992 September 5;267(25):18148-53.
- (143) Nath KA, Balla G, Vercellotti GM, Balla J, Jacob HS, Levitt MD et al. Induction of heme oxygenase is a rapid, protective response in rhabdomyolysis in the rat. *J Clin Invest* 1992 July;90(1):267-70.
- (144) Berberat PO, Katori M, Kaczmarek E, Anselmo D, Lassman C, Ke B et al. Heavy chain ferritin acts as an antiapoptotic gene that protects livers from ischemia reperfusion injury. *FASEB J* 2003 September;17(12):1724-6.
- (145) Llanos AR, Moss ME, Pinzon MC, Dye T, Sinkin RA, Kendig JW. Epidemiology of neonatal necrotising enterocolitis: a population-based study. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2002 October;16(4):342-9.
- (146) Tagesson C, Sjudahl R, Thoren B. Passage of molecules through the wall of the gastrointestinal tract. I. A simple experimental model. *Scand J Gastroenterol* 1978;13(5):519-24.
- (147) Napolitano LM, Koruda MJ, Meyer AA, Baker CC. The impact of femur fracture with associated soft tissue injury on immune function and intestinal permeability. *Shock* 1996 March;5(3):202-7.
- (148) Motterlini R, Foresti R, Vandegriff K, Intaglietta M, Winslow RM. Oxidative-stress response in vascular endothelial cells exposed to acellular hemoglobin solutions. *Am J Physiol* 1995 August;269(2 Pt 2):H648-H655.
- (149) Maines MD, Trakshel GM, Kutty RK. Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal heme oxygenase. Only one molecular species of the enzyme is inducible. *J Biol Chem* 1986 January 5;261(1):411-9.
- (150) Tolle A, Schlame M, Charlier N, Guthmann F, Rustow B. Vitamin E differentially regulates the expression of peroxiredoxin-1 and -6 in alveolar type II cells. *Free Radic Biol Med* 2005 May 15;38(10):1401-8.
- (151) European Molecular Biology Laboratory (EMBL). <http://www.embl.de>

- (152) U.S. National Library of Medicine National Institutes of Health (Pub Med).
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>
- (153) European Molecular Biology Laboratory- European Bioinformatics Institutes (EMBL-EBI).
<http://www.ebi.ac.uk/>
- (154) Ford H, Watkins S, Reblock K, Rowe M. The role of inflammatory cytokines and nitric oxide in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg* 1997 February;32(2):275-82.
- (155) Henning SJ. Postnatal development: coordination of feeding, digestion, and metabolism. *Am J Physiol* 1981 September;241(3):G199-G214.
- (156) Barlow B, Santulli TV, Heird WC, Pitt J, Blanc WA, Schullinger JN. An experimental study of acute neonatal enterocolitis--the importance of breast milk. *J Pediatr Surg* 1974 October;9(5):587-95.
- (157) Caplan MS, Hedlund E, Adler L, Hsueh W. Role of asphyxia and feeding in a neonatal rat model of necrotizing enterocolitis. *Pediatr Pathol* 1994 November;14(6):1017-28.
- (158) Czyrko C, Steigman C, Turley DL, Drott HR, Ziegler MM. The role of reperfusion injury in occlusive intestinal ischemia of the neonate: malonaldehyde-derived fluorescent products and correlation of histology. *J Surg Res* 1991 July;51(1):1-4.
- (159) Cazals V, Nabeyrat E, Corroyer S, de Keyzer Y, Clement A. Role for NF-kappa B in mediating the effects of hyperoxia on IGF-binding protein 2 promoter activity in lung alveolar epithelial cells. *Biochim Biophys Acta* 1999 January 11;1448(3):349-62.
- (160) D'Angio CT, LoMonaco MB, Chaudhry SA, Paxhia A, Ryan RM. Discordant pulmonary proinflammatory cytokine expression during acute hyperoxia in the newborn rabbit. *Exp Lung Res* 1999 July;25(5):443-65.
- (161) Nadler EP, Upperman JS, Dickinson EC, Ford HR. Nitric oxide and intestinal barrier failure. *Semin Pediatr Surg* 1999 August;8(3):148-54.
- (162) Otani K, Shimizu S, Chijiwa K, Morisaki T, Yamaguchi T, Yamaguchi K et al. Administration of bacterial lipopolysaccharide to rats induces heme oxygenase-1 and formation of antioxidant bilirubin in the intestinal mucosa. *Dig Dis Sci* 2000 December;45(12):2313-9.
- (163) Wang GL, Semenza GL. General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993 May 1;90(9):4304-8.
- (164) Melillo G, Musso T, Sica A, Taylor LS, Cox GW, Varesio L. A hypoxia-responsive element mediates a novel pathway of activation of the inducible nitric oxide synthase promoter. *J Exp Med* 1995 December 1;182(6):1683-93.
- (165) Levy AP, Levy NS, Wegner S, Goldberg MA. Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *J Biol Chem* 1995 June 2;270(22):13333-40.
- (166) Liu Y, Cox SR, Morita T, Kourembanas S. Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer. *Circ Res* 1995 September;77(3):638-43.
- (167) Firth JD, Ebert BL, Pugh CW, Ratcliffe PJ. Oxygen-regulated control elements in the phosphoglycerate kinase 1 and lactate dehydrogenase A genes: similarities with the erythropoietin 3' enhancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994 July 5;91(14):6496-500.
- (168) Semenza GL, Roth PH, Fang HM, Wang GL. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 1994 September 23;269(38):23757-63.

- (169) Yasuhara M. [L-glutamine-induced heme oxygenase-1 protects small intestine from warm ischemia and reperfusion injury in the rat]. *Hokkaido Igaku Zasshi* 2001 January;76(1):21-34.
- (170) Poss KD, Tonegawa S. Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997 September 30;94(20):10925-30.
- (171) Kapturczak MH, Wasserfall C, Brusko T, Campbell-Thompson M, Ellis TM, Atkinson MA et al. Heme oxygenase-1 modulates early inflammatory responses: evidence from the heme oxygenase-1-deficient mouse. *Am J Pathol* 2004 September;165(3):1045-53.
- (172) Agarwal A, Nick HS. Renal response to tissue injury: lessons from heme oxygenase-1 GeneAblation and expression. *J Am Soc Nephrol* 2000 May;11(5):965-73.
- (173) Brouard S, Otterbein LE, Anrather J, Tobiasch E, Bach FH, Choi AM et al. Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis. *J Exp Med* 2000 October 2;192(7):1015-26.
- (174) Tamion F, Richard V, Lacoume Y, Thuillez C. Intestinal preconditioning prevents systemic inflammatory response in hemorrhagic shock. Role of HO-1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002 August;283(2):G408-G414.
- (175) Adachi S, Zelenin S, Matsuo Y, Holtback U. Cellular response to renal hypoxia is different in adolescent and infant rats. *Pediatr Res* 2004 March;55(3):485-91.
- (176) Song R, Mahidhara RS, Zhou Z, Hoffman RA, Seol DW, Flavell RA et al. Carbon monoxide inhibits T lymphocyte proliferation via caspase-dependent pathway. *J Immunol* 2004 January 15;172(2):1220-6.
- (177) Cooke JP, Tsao PS. Cytoprotective effects of nitric oxide. *Circulation* 1993 November;88(5 Pt 1):2451-4.
- (178) Furlong B, Henderson AH, Lewis MJ, Smith JA. Endothelium-derived relaxing factor inhibits in vitro platelet aggregation. *Br J Pharmacol* 1987 April;90(4):687-92.
- (179) Kajimura M, Goda N, Suematsu M. Organ design for generation and reception of CO: lessons from the liver. *Antioxid Redox Signal* 2002 August;4(4):633-7.
- (180) Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991 June 1;88(11):4651-5.
- (181) Linas S, Whittenburg D, Repine JE. Nitric oxide prevents neutrophil-mediated acute renal failure. *Am J Physiol* 1997 January;272(1 Pt 2):F48-F54.
- (182) Ramos KS, Lin H, McGrath JJ. Modulation of cyclic guanosine monophosphate levels in cultured aortic smooth muscle cells by carbon monoxide. *Biochem Pharmacol* 1989 April 15;38(8):1368-70.
- (183) Utz J, Ullrich V. Carbon monoxide relaxes ileal smooth muscle through activation of guanylate cyclase. *Biochem Pharmacol* 1991 April 15;41(8):1195-201.
- (184) Yu L, Gengaro PE, Niederberger M, Burke TJ, Schrier RW. Nitric oxide: a mediator in rat tubular hypoxia/reoxygenation injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994 March 1;91(5):1691-5.
- (185) Schultz G, Bohme E, Munske K. Guanyl cyclase. Determination of enzyme activity. *Life Sci* 1969 December 15;8(24):1323-32.
- (186) Ryter SW, Otterbein LE. Carbon monoxide in biology and medicine. *Bioessays* 2004 March;26(3):270-80.

- (187) Durante W, Kroll MH, Christodoulides N, Peyton KJ, Schafer AI. Nitric oxide induces heme oxygenase-1 gene expression and carbon monoxide production in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1997 April;80(4):557-64.
- (188) McMillan K, Bredt DS, Hirsch DJ, Snyder SH, Clark JE, Masters BS. Cloned, expressed rat cerebellar nitric oxide synthase contains stoichiometric amounts of heme, which binds carbon monoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992 December 1;89(23):11141-5.
- (189) White KA, Marletta MA. Nitric oxide synthase is a cytochrome P-450 type hemoprotein. *Biochemistry* 1992 July 28;31(29):6627-31.
- (190) Otterbein LE, Otterbein SL, Ifedigbo E, Liu F, Morse DE, Fearn C et al. MKK3 mitogen-activated protein kinase pathway mediates carbon monoxide-induced protection against oxidant-induced lung injury. *Am J Pathol* 2003 December;163(6):2555-63.
- (191) Zhang X, Shan P, Otterbein LE, Alam J, Flavell RA, Davis RJ 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 January 10;278(2):1248-58.
- (192) Pae HO, Oh GS, Choi BM, Chae SC, Kim YM, Chung KR et al. Carbon monoxide produced by heme oxygenase-1 suppresses T cell proliferation via inhibition of IL-2 production. *J Immunol* 2004 April 15;172(8):4744-51.
- (193) Otterbein LE, Bach FH, Alam J, Soares M, Tao LH, Wysk M et al. Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat Med* 2000 April;6(4):422-8.
- (194) Morse D, Pischke SE, Zhou Z, Davis RJ, Flavell RA, Loop T et al. Suppression of inflammatory cytokine production by carbon monoxide involves the JNK pathway and AP-1. *J Biol Chem* 2003 September 26;278(39):36993-8.
- (195) Kaur H, Hughes MN, Green CJ, Naughton P, Foresti R, Motterlini R. Interaction of bilirubin and biliverdin with reactive nitrogen species. *FEBS Lett* 2003 May 22;543(1-3):113-9.
- (196) Minetti M, Mallozzi C, Di Stasi AM, Pietraforte D. Bilirubin is an effective antioxidant of peroxynitrite-mediated protein oxidation in human blood plasma. *Arch Biochem Biophys* 1998 April 15;352(2):165-74.
- (197) Hayashi S, Takamiya R, Yamaguchi T, Matsumoto K, Tojo SJ, Tamatani T et al. Induction of heme oxygenase-1 suppresses venular leukocyte adhesion elicited by oxidative stress: role of bilirubin generated by the enzyme. *Circ Res* 1999 October 15;85(8):663-71.
- (198) Morisawa T, Wong RJ, Bhutani VK, Vreman HJ, Stevenson DK. Inhibition of heme oxygenase activity in newborn mice by azalanstat. *Can J Physiol Pharmacol* 2008 October;86(10):651-9.
- (199) Rodgers PA, Seidman DS, Wei PL, Dennery PA, Stevenson DK. Duration of action and tissue distribution of zinc protoporphyrin in neonatal rats. *Pediatr Res* 1996 June;39(6):1041-9.

Abkürzungen

A	Adenosin
Abb.	Abbildung
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor
APS	Amonium Persulfat
Aqua dest.	Destiliertes Wasser
AU	arbitrary units
cNOS	konstitutive NO-Synthasen
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
CARD	Caspase Rekrutierungsdomäne
cDNA	kopierte DNA
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CHO	Chinese Hamster ovary
CO	Kohlenmonoxid
CO ₂	Kohlendioxid
COX	Cyclooxygenase
C _T	Treshold Cycle
Cyt C	Cytochrom C
DD	Death Domäne
DED	Death Effector Domäne
DIC	disseminierte intravasale Gerinnung
dl	Deziliter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDRF	Endothelium-derived relaxing factor
eNOS	endotheliale NO-Synthetasen
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-tetraacetat
EPO	Erythropoetin
Fas	Apoptose-regulierende Faktoren
FD-4	FITC-Dextran
FITC	Fluoreszin-iso-thio-cyanol
g	gramm
g	9,81 m/s ² Erdanziehung
G	Guanin
GMP	Guanosinmonophosphat
h	Stunden
Hb	Hämoglobin
HCl	Salzsäure
HDL	High-density Lipoprotein
Hep	Hepatozyten
HIF	Hypoxia-inducible-factor
HO	Hämoxygenase
H/R	Hyperkapnie/ Reoxigenierung
HSP	Hitzeschockprotein
HsO ₂	Hydrogenperoxid
ICAM	Zelladhäsionsmolekül

IL	Interleukin
iNOS	induzierbare NO-Synthetasen
I/R	Ischämie/ Reperfusion
JNK	c-Jun N-terminale Kinasen
kD	Kilo Dalton
kg	Kilogramm
LH	luteinisierendes Hormon
LPS	Lipopolysaccharide
mA	Milliampere
MAPK	Mitogen-activated protein-Kinasen
max.	maximal
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
µmol	Mikromol
mRNA	messenger RNA
MCP-1	Monozyten-Chemotaktisches-Protein-1
MPO	Myeloperoxidase
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NEC	Nekrotisierende Enterokolitis
NEM	N'ethylmaleinimide
NfκB	Nukleärer Faktor κB
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthetasen
NSAR	Nicht-steroidale Anti-Rheumatika
O ₂	Sauerstoff
OH--	Hydroxylradikal
OSA	Organspezifischer Autoantikörper
PBS	Phosphat Buffer Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PFC	Persistierende fetale Zirkulation
pH	potentia Hydrogenii
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pNA	p-nitroaniline
POD	Peroxydase
ppm	parts per million
PVDF	Nitrozellulose- Membran
RDS	Atemnotsandrom (Respiratory Distress Syndrome)
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
SDS	Lauryl Sulfat
sGC	lösliche Guanylatcyclase
SnMP	Zinn- Mesoporphyrin
SnPP	Zink-Protoporphyrin-IX
T	Tyrosin
TBS	Tert-Butyldimethylsilyl
TEMED	Tetramethyl- ethylenediamine
TFF-3	Trefoil-factor-3

TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
UDPGT	Uridindiphosphat-Glucuronosyl-Transferase
UV	Ultraviolett
VEGF	Vascular epithelial growth factor
VLBW	very low birth weight (Geburtsgewicht <1500g)
ZNS	Zentrales Nervensystem

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Ausgeprägte Pneumatosis Intestinalis im Röntgenbild bei Nekrotisierender Enterokolitis	10
Abb. 2: Makroskopisches Bild einer Nekrotisierenden Enterokolitis	10
Abb. 3: Circulus vitiosus des perinatalen Sauerstoffmangels	12
Tabelle 1: Untersuchungen zur entwicklungsabhängigen Darmschädigung	18
Abb. 4: Apoptose Kaskade der Caspasen	21
Abb. 5: Synthese von NO aus Arginin durch die NO-Synthase(51)	23
Abb. 6: Häm-Gruppe und Porphyrin-Ring	24
Abb. 7: Enzymatische Reaktion der Hämoxygenase, modifiziert nach Otterbein et al.(58) und Fang et al.(59)	24
Abb. 8: Hämin (98)	27
Abb. 9: Strukturformel Bilirubin	31
Abb. 10: Schematische Darstellung des Western Blot	46
Tabelle 2: Primer, die für die relative, quantitative PCR benutzt wurden	50
Abb. 11: Konzentration von FITC-Dextran im Blut von unreifen (weiße Balken) im Vergleich zu reifen Ratten (schwarze Balken).	53
Abb. 12: Aktivitätsmessung von Caspase-3 im kolorimetrischen Test nach H/R im Darm unreifer Ratten (weiße Balken) und im Darm reifer Ratten (schwarze Balken).	54
Abb. 13: Relative RNA-Expression von iNOS in Därmen unreifer (weiß) und reifer Ratten (schwarz) nach H/R	55
Abb. 14a: Relative RNA-Expression von HO-1 in Därmen von reifen (schwarz) und unreifen Ratten (weiß) 24, 48 und 72 Stunden nach H/R	57
Abb. 14b: Auswertung aller densitometrisch gemessenen Western Blots von HO-1 in unreifen (weiße Balken) und reifen Tieren (schwarze Balken)	57
Abb.14c: Repräsentativer Western Blot von HO-1 mit β -Aktin-Färbung als Ladekontrolle	57
Abb. 15: Proteinexpression der HO-1 bei unreifen Tieren 48h nach H/R (schwarze Balken) und ohne H/R (weiße Balken)	58
Abb. 16: FITC-Dextran Konzentration im Blut von reifen und unreifen Tieren 48h nach H/R (schwarze Balken) und ohne H/R (weiße Balken), nach Induktion durch Hämin und Inhibition durch SnPP	59

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Eidesstattliche Erklärung

Ich, Judith Pietzcker, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Die reifeabhängige Expression der Hämoxygenase-1 in einem Tiermodell der Nekrotisierenden Enterokolitis“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, 15. März 2011

Judith Pietzcker

Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. Florian Guthmann und meinem Betreuer Herrn Dr. med. Christof Kluthe für die großartige fachliche und mentale Unterstützung, Herrn Prof. Dr. sc. nat. Bernd Rüstow für seine wertvolle Kritik, Frau Ruth Herrmann für die geduldige und freundliche praktische Anleitung, meinen Eltern für den uneingeschränkten Rückhalt und meinem Mann für die nötige Motivation und das Durchhaltevermögen, das zur Fertigstellung dieser Arbeit nötig war.