# Regulation der Apoptose von Immun- und Parenchymzellen im hämorrhagischen Schockmodell der Maus

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Kerstin Jasse

aus Berlin

Januar, 2009

Die vorliegende Arbeit wurde von März 2005 bis Januar 2009 unter der Leitung von Herrn Dr. med. S. K. Tschöke in den Forschungseinrichtungen für Experimentelle Medizin, Campus Benjamin Franklin, Charité Universitätsmedizin Berlin erstellt.

- 1. Gutachter: Prof. Dr. med. W. Ertel
- 2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. T. Schmülling

Disputation am: <u>12.05.2009</u>

# Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Ertel danke ich für die Bereitstellung des Themas und für die gute Betreuung.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Schmülling danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Herrn Dr. med. Hostmann danke ich für die Bereitschaft, mir die Operationstechnik des hämorrhagischen Schockmodells der Maus beizubringen und für die Leitung der tierexperimentellen Arbeit sowie für die vielen guten Ratschläge.

Ich danke den Kollegen für die Diskussions- und Hilfsbereitschaft.

# Abkürzungsverzeichnis

# Abkürzungsverzeichnis

APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
CD	cluster of differentiation
cDNA	Komplementäre DNA
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	1,4-Dithiothreitol
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethylethyl)-tetraessigsäure
FACS	Fluorescence-activated-cell-sorter
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FSC	Forwardscatter
H <sub>2</sub> O bidest.	H <sub>2</sub> O bidestilliert
HEPES Puffer	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure Puffer
HES	Hydroxyethylstärke
HRP	Meerettichperoxidase
HS	Hämorrhagischer Schock
HS-Tiere	Hämorrhagischer Schock-Tiere
kDa	Kilodalton
LP	Laparotomie
Mo-MLV RT	Moloney-Maus-Leukämie-Virus Reverse Transkriptase
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
R-PE	R-Phycoerythrin
RTD-PCR	Real-time detection PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Sidescatter
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
ТМВ	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TUNEL	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP Nick-
	End Labeling

### Inhaltsverzeichnis

# INHALTSVERZEICHNIS

1. E	INLI	EITUNG	1
1.1	De	finition des hämorrhagischen Schocks	1
1.2	Pat	thophysiologie des HS	3
1.3	Pat	thogenese des MOF: Second hit-Theorie	4
1.4	Ко	mplikationen nach dem hämorrhagischen Schock	6
1.5	Tie	rmodelle zur Untersuchung des Schocks	8
1.6	Au	swirkungen des HS auf die Apoptose	9
1.7	Ар	optose	11
1.8	Ka	spasen	11
1.9	Ka	spase-abhängige Signalwege der Apoptose	12
1.10	Inh	ibitoren und Aktivatoren in der Apoptose	14
1.11	Re	gulierung der Apoptose durch die Bcl-2-Familie	15
1.12	Zie	Isetzung der Arbeit	16
2. M	IATE	ERIAL UND METHODEN	17
2. M 2.1	IATE Ma	ERIAL UND METHODEN	17 17
2. M 2.1	IATE Ma 1.1	ERIAL UND METHODEN terial	<b>17</b> <b>17</b> 17
<b>2. M</b> <b>2.1</b>	IATE Ma 1.1 1.2	ERIAL UND METHODEN terial Chemikalien Medikamente	<b>17</b> <b>17</b> 17 19
<b>2. M</b> <b>2.1</b>	IATE Ma 1.1 1.2 1.3	ERIAL UND METHODEN terial Chemikalien Medikamente Allgemeine Verbrauchsmittel Chimikalien	<b>17</b> <b>17</b> 17 19 20
<b>2. M</b> <b>2.1</b> 2.2 2.2 2.2	IATE Ma 1.1 1.2 1.3 1.4	ERIAL UND METHODEN terial Chemikalien Medikamente Allgemeine Verbrauchsmittel Chirurgische Verbrauchsmittel Coröte	<b>17</b> <b>17</b> 17 19 20 21
<b>2. M</b> <b>2.1</b> 2.2 2.2 2.2 2.2	<b>IATE</b> <b>Ma</b> 1.1 1.2 1.3 1.4 1.5 1.6	ERIAL UND METHODEN terial Chemikalien Medikamente Allgemeine Verbrauchsmittel Chirurgische Verbrauchsmittel Geräte	<b>17</b> <b>17</b> 17 19 20 21 21
<b>2. M</b> <b>2.1</b> 2.7 2.7 2.7 2.7 2.7	<b>IATE</b> <b>Ma</b> 1.1 1.2 1.3 1.4 1.5 1.6 1.7	ERIAL UND METHODEN terial Chemikalien Medikamente Allgemeine Verbrauchsmittel Chirurgische Verbrauchsmittel Geräte Kits	<b>17</b> <b>17</b> 17 19 20 21 21 23 23
<b>2. M</b> <b>2.1</b> 2.2 2.2 2.2 2.2 2.2 2.2 2.2 2.2	<b>IATE</b> <b>Ma</b> 1.1 1.2 1.3 1.4 1.5 1.6 1.7 1.8	ERIAL UND METHODEN terial Chemikalien Medikamente Allgemeine Verbrauchsmittel Chirurgische Verbrauchsmittel Geräte Kits Enzyme und Pufferlösungen Immunglobuline	<b>17</b> <b>17</b> 17 19 20 21 21 23 23 23 23
<b>2. M</b> <b>2.1</b> 2.2 2.2 2.2 2.2 2.2 2.2 2.2 2.2 2.2	IATE Ma 1.1 1.2 1.3 1.4 1.5 1.6 1.7 1.8 2.1.8	ERIAL UND METHODEN terial Chemikalien Medikamente Allgemeine Verbrauchsmittel Chirurgische Verbrauchsmittel Geräte Kits Enzyme und Pufferlösungen Immunglobuline	<b>17</b> <b>17</b> 17 19 20 21 23 23 23 24 24
<b>2. M</b> <b>2.1</b> 2.2 2.2 2.2 2.2 2.2 2.2 2.2 2.2	IATE Ma 1.1 1.2 1.3 1.4 1.5 1.6 1.7 1.8 2.1.8 2.1.8	ERIAL UND METHODEN	<b>17</b> <b>17</b> 17 19 20 21 23 23 23 23 24 24 24
<b>2. M</b> <b>2.1</b> 2.7 2.7 2.7 2.7 2.7 2.7 2.7 2.7	IATE Ma 1.1 1.2 1.3 1.4 1.5 1.6 1.7 1.8 2.1.8 2.1.8 1.9	ERIAL UND METHODEN	<b>17</b> <b>17</b> <b>1</b> 7 19 20 21 21 23 23 23 24 24 24 25
2. M 2.1 2.2 2.2 2.2 2.2 2.2 2.2 2.2 2.2 2.2	<b>IATE</b> <b>Ma</b> 1.1 1.2 1.3 1.4 1.5 1.6 1.7 1.8 2.1.8 2.1.8 1.9 1.10	ERIAL UND METHODEN	<b>17</b> <b>17</b> <b>17</b> 17 19 20 21 21 23 24 24 24 24 24 24 25 25
<b>2. M</b> <b>2.1</b> 2.2 2.2 2.2 2.2 2.2 2.2 2.2 2.2 2.2 2.	IATE Ma 1.1 1.2 1.3 1.4 1.5 1.6 1.7 1.8 2.1.8 2.1.8 2.1.8 2.1.8 1.9 1.10 1.11	ERIAL UND METHODEN	<b>17</b> <b>17</b> <b>17</b> <b>1</b> 7 <b>1</b> 9 <b>20</b> <b>21</b> <b>21</b> <b>21</b> <b>23</b> <b>24</b> <b>24</b> <b>24</b> <b>24</b> <b>25</b> <b>25</b> <b>26</b>
<b>2.</b> M <b>2.1</b> 2.2 2.2 2.2 2.2 2.2 2.2 2.2 2.2 2.2 2.	IATE Ma 1.1 1.2 1.3 1.4 1.5 1.6 1.7 1.8 2.1.8 2.1.8 1.9 1.10 1.11 1.12	ERIAL UND METHODEN	<b>17</b> <b>17</b> <b>17</b> <b>1</b> 9 20 21 23 23 23 23 23 24 24 24 24 25 25 26 27
2. M 2.1 2.2 2.2 2.2 2.2 2.2 2.2 2.2 2.2 2.2	<b>IATE</b> <b>Ma</b> 1.1 1.2 1.3 1.4 1.5 1.6 1.7 1.8 2.1.8 2.1.8 2.1.8 1.9 1.10 1.11 1.12 1.13	ERIAL UND METHODEN	<b>17</b> <b>17</b> <b>17</b> <b>1</b> 9 20 21 23 23 23 23 23 24 24 24 25 25 26 27 27
2. M 2.1 2.2 2.2 2.2 2.2 2.2 2.2 2.2 2.2 2.2	IATE Ma 1.1 1.2 1.3 1.4 1.5 1.6 1.7 1.8 2.1.8 2.1.8 2.1.8 1.10 1.11 1.12 1.13 Me	ERIAL UND METHODEN	<b>171717171</b> 9 <b>202123232424242425262728</b>

#### Inhaltsverzeichnis

2. 2.	.2.2 .2.3	Hämorrhagischer Schock-Operation	28 29
2.	.2.4 2.2.4 2.2.4	Blutentnahme 1 Blutbildanalyse 2 ELISA	29 29 29
2. 2. 2. 2. 2. 2.	.2.5 .2.6 .2.7 .2.8 .2.9 .2.2.9 .2.2.9 .2.2.9	Entnahme der Organe Durchflusszytometrie Isolierung von Proteinen aus den Gewebeproben Proteinbestimmung Enzymatische Aktivitätsmessungen 1 Bestimmung der Aktivität der Kaspasen-3 und -7 2 Messung der Aktivität der Initiatorkaspasen-8 und -9	30 31 31 31 31 31 31
2. 2. 2. 2. 2. 2.	.2.10 .2.11 .2.12 .2.13 .2.14 .2.15	Analyse der Expression von Bax und Bcl-2 mittels Western Blot Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebeproben Konzentrationsbestimmung der isolierten RNA cDNA-Synthese RTD-PCR TUNEL	32 33 33 33 34 34
3. E	RGE	EBNISSE	35
3.1	Dif	ferentielle Blutbildbestimmung	35
3.2	IL-(	6 Konzentration im Blut	39
-			
3.3	An	nexinfärbung auf murinen T-Lymphozyten der Milz	40
3.3 3.4 3.5	An Na An	nexinfärbung auf murinen T-Lymphozyten der Milz chweis der DNA-Fragmentation anhand der TUNEL-Methode alvse des extrinsischen Signalweges der Apoptose	40 41
3.3 3.4 3.5 3. 3.	An Na An 5.1 5.2	nexinfärbung auf murinen T-Lymphozyten der Milz chweis der DNA-Fragmentation anhand der TUNEL-Methode alyse des extrinsischen Signalweges der Apoptose Expression des TNF-Rezeptors I auf T-Lymphozyten Expression des Fas-Rezeptors auf T-Lymphozyten	40 41 42 43 50
3.3 3.4 3.5 3. 3. 3.	An Na An 5.1 5.2 An	nexinfärbung auf murinen T-Lymphozyten der Milz chweis der DNA-Fragmentation anhand der TUNEL-Methode alyse des extrinsischen Signalweges der Apoptose Expression des TNF-Rezeptors I auf T-Lymphozyten Expression des Fas-Rezeptors auf T-Lymphozyten alyse der HS-induzierten Apoptose parenchymatöser Organe	40 41 42 43 50 54
3.3 3.4 3.5 3. 3.6 3.6 3. 3. 3.3	An Na An 5.1 5.2 An 6.1 6.2 6.3	nexinfärbung auf murinen T-Lymphozyten der Milz chweis der DNA-Fragmentation anhand der TUNEL-Methode alyse des extrinsischen Signalweges der Apoptose Expression des TNF-Rezeptors I auf T-Lymphozyten Expression des Fas-Rezeptors auf T-Lymphozyten alyse der HS-induzierten Apoptose parenchymatöser Organe Aktivität der Kaspasen-3 und -7 Parenchymatöse Kaspase-8-Aktivitäten Organspezifische Aktivität der Initiatorkaspase-9	40 41 42 50 54 54 58
3.3 3.4 3.5 3.6 3.6 3.3 3.3 3.7	An Na An 5.1 5.2 An 6.1 6.2 6.3 An	nexinfärbung auf murinen T-Lymphozyten der Milz chweis der DNA-Fragmentation anhand der TUNEL-Methode alyse des extrinsischen Signalweges der Apoptose Expression des TNF-Rezeptors I auf T-Lymphozyten Expression des Fas-Rezeptors auf T-Lymphozyten alyse der HS-induzierten Apoptose parenchymatöser Organe Aktivität der Kaspasen-3 und -7 Parenchymatöse Kaspase-8-Aktivitäten Organspezifische Aktivität der Initiatorkaspase-9	40 41 42 50 54 54 58 60
3.3 3.4 3.5 3.6 3.6 3.3 3.3 3.7 3.7	An Na An 5.1 5.2 An 6.1 6.2 6.3 An 7.1 7.2	nexinfärbung auf murinen T-Lymphozyten der Milz chweis der DNA-Fragmentation anhand der TUNEL-Methode alyse des extrinsischen Signalweges der Apoptose Expression des TNF-Rezeptors I auf T-Lymphozyten Expression des Fas-Rezeptors auf T-Lymphozyten alyse der HS-induzierten Apoptose parenchymatöser Organe Aktivität der Kaspasen-3 und -7 Parenchymatöse Kaspase-8-Aktivitäten Organspezifische Aktivität der Initiatorkaspase-9 alysen zur Genexpression mitochondrialer Gene Untersuchungen zur Genexpression des <i>bcl-2</i> HS-induzierte Genexpression des mitochondrialen <i>bax</i>	40 41 42 43 50 54 54 58 58 60 61
3.3 3.4 3.5 3.6 3.6 3.3 3.7 3.7 3.3 3.8	An Na An 5.1 5.2 An 6.1 6.2 6.3 An 7.1 7.2 HS	nexinfärbung auf murinen T-Lymphozyten der Milz chweis der DNA-Fragmentation anhand der TUNEL-Methode alyse des extrinsischen Signalweges der Apoptose Expression des TNF-Rezeptors I auf T-Lymphozyten Expression des Fas-Rezeptors auf T-Lymphozyten alyse der HS-induzierten Apoptose parenchymatöser Organe Aktivität der Kaspasen-3 und -7 Parenchymatöse Kaspase-8-Aktivitäten Organspezifische Aktivität der Initiatorkaspase-9 alysen zur Genexpression mitochondrialer Gene Untersuchungen zur Genexpression des bcl-2 HS-induzierte Expression des Bcl-2 auf Proteinebene	40 41 42 50 54 54 58 60 61 61 64
3.3 3.4 3.5 3.6 3.6 3.7 3.7 3.7 3.8 3.8 3.9	An Na An 5.1 5.2 An 6.1 6.2 6.3 An 7.1 7.2 HS HS	nexinfärbung auf murinen T-Lymphozyten der Milz chweis der DNA-Fragmentation anhand der TUNEL-Methode alyse des extrinsischen Signalweges der Apoptose Expression des TNF-Rezeptors I auf T-Lymphozyten Expression des Fas-Rezeptors auf T-Lymphozyten alyse der HS-induzierten Apoptose parenchymatöser Organe Aktivität der Kaspasen-3 und -7 Parenchymatöse Kaspase-8-Aktivitäten Organspezifische Aktivität der Initiatorkaspase-9 alysen zur Genexpression mitochondrialer Gene Untersuchungen zur Genexpression des <i>bcl-2</i> HS-induzierte Expression des Bcl-2 auf Proteinebene	40 41 42 50 50 54 58 60 61 61 61 64 64

#### Inhaltsverzeichnis

4.	Di	iskussion	76
4.	1	Analyse des HS anhand der Blutbildbestimmung	76
4.	2	Systemische Inflammation	76
4.	3	HS-induzierte Apoptose in der Milz	78
4.	4	HS-induzierte Apoptose im Nierenparenchym	80
4.	5	HS-induzierte Apoptose in der Lunge	82
4.	6	HS-induzierte Apoptose in der Leber	83
4.	7	Einfluss des Second Hits auf die Apoptose	84
4.	8	Ausblick	85
5.	Ζι	usammenfassung	86
6.	Sı	ummary	87
7.	Li	teraturverzeichnis	88
8.	Er	rfolgte Publikationen	95
9.	Le	ebenslauf	96
10.	А	nhang	97
10	0.1	Abbildungsverzeichnis	97
1	0.2	Tabellenverzeichnis	99

# 1. Einleitung

# 1.1 Definition des hämorrhagischen Schocks

Der Begriff Schock bezeichnet die mangelhafte Durchblutung der vitalen Organsysteme aufgrund des Missverhältnisses von Sauerstoff-Angebot und Sauerstoff-Verbrauch (Adams et al. 2007).

Der hämorrhagische Schock (Blutungsschock) ist oft eine Komplikation eines Unfalls infolge einer stark auftretenden Blutung, der jedoch auch bei der Ruptur eines Aneurysmas, gastrointestinalen Blutungen oder infolge äußerer Blutungen wie z. B. bei Schnittverletzungen auftreten kann (Adams et al. 2007; Berchtold et al. 2006).

Der **traumatisch-hämorrhagische Schock** wird bei einer starken Blutung mit ausgeprägter Gewebeverletzung und Trauma von Organen oder Knochen induziert. Er kann bei Verletzungen der intra-abdominalen Organe (Milz, Leber), Weichteilverletzungen, multiplen Frakturen (Femurfraktur, Tibiafraktur) verursacht werden (Berchtold et al. 2006).

Pathogenetisch teilt man den Schock in folgende Gruppen ein: der distributive Schock, der kardiogene Schock, der obstruktive und der hypovolämische Schock. Den distributiven Schock unterteilt man weiter in den septischen, anaphylaktischen und neurogenen Schock. Die obstruktiven Schockformen werden oft dem kardiogenen Schock zugeordnet (Ziegenfuß 2007).

Eine häufige Form des Schocks ist der hypovolämische Schock. Er beschreibt den Schockzustand, der aufgrund einer akuten Verringerung des zirkulierenden Blutvolumens oder durch Plasma- oder Wasserverluste eintritt (Berchtold et al. 2006). Eine Unterform ist der **hypovolämische Schock im engeren Sinne**. Dieser Schockzustand beschreibt einen Mangel des zirkulierenden Plasmavolumens aufgrund eines Flüssigkeitverlustes. Eine starke Blutung ist an der Entstehung des Schocks nicht beteiligt (Adams et al. 2007).

Der Volumenmangelschock kann noch in weitere Schockformen unterteilt werden, unter diesen befindet sich der Blutungsschock.

Der Schweregrad des hämorrhagischen Schocks wird anhand des Blutverlustes; des Pulses, des systolischen und diastolischen Blutdrucks, der Blutdruck-Amplitude, der Kapillarfüllung, der Atemfrequenz, des Urinflusses pro h und der Farbe der Extremitäten in vier Klassen eingeteilt, wobei die Klasse 1 durch den geringsten (<15 %) und die Klasse 4 durch den stärksten Blutverlust gekennzeichnet wird (über 40 % Blutverlust) (Berchtold et al. 2006). Der Blutungsschock mit einer nachfolgenden Substitution von Flüssigkeit und

Elektrolyten bewirkt verschiedene Veränderungen der Funktionen von Immunzellen. Unter letzteren Zellen kann man Monozyten, T- und B-Zellen, neutrophile Granulozyten, Phagozyten und natürliche Killerzellen finden, die aufgrund des Schocks in ihrer Funktion beeinflusst werden.

Affected Cells	Observed Findings
Reticuloendothelial cells	↓ phagocytic activity
Phagocytes	hepatic macrophage com- plement-receptor clearance
Peritoneal and splenic mac- rophages	<ul> <li>↓ decreased cytotoxicity</li> <li>↓ Fc and C3b receptor expression</li> <li>↑ TGF-ß productive capacity</li> </ul>
Kupffer cells	<ul> <li>capacity to release inflam- matory cytokines (TNF, IL-1, and IL-6)</li> <li>cytotoxicity</li> </ul>
Monocytes	1 IL-1 productive capacity
Natural killer cells	↓ cytotoxicity
Neutrophils	1 neutrophil adhesiveness
T cells	<ul> <li>↓ blastogenesis</li> <li>↓ lymphocyte reactivity</li> <li>↓ lymphokine release</li> </ul>
B cells	<ul> <li>antibody production</li> <li>frequency and number of</li> <li>B-cell clonal precursors spe- cilic for bacterial antigens</li> </ul>
Accessory cells	
Monocytes, peritoneal, spienic macrophage, and Kupffer cells	<ul> <li>↓ antigen presentation</li> <li>↓ MHC class II expression</li> <li>↓ number of la antigen positive cells</li> <li>↓ antigen catabolism</li> <li>↑ PGE<sub>2</sub> release</li> </ul>

#### Auswirkungen des hämorrhagischen Schocks auf die Funktion der Immunzellen

TGF- $\beta$  = transforming growth factor type beta; TNF = turnor necrosis factor; IL = interleukin; MHC = major histocompatibility complex; PGE<sub>2</sub> = prostaglandin E<sub>2</sub>.

Abbildung 1: Veränderte Funktionen der Immunzellen nach einem hämorrhagischen Schock (verändert nach Chaudry et Ayala 1993).

Durch ausgedehnte Verbrennungen oder Verätzungen kommt es zu einem starken Flüssigkeitsverlust, der zu einem Mangel des zirkulierenden Plasmavolumens ohne größerer Blutung führt. Man bezeichnet diese Schockform als **traumatisch-hypovolämischen Schock** (Adams et al. 2007).

### 1.2 Pathophysiologie des HS

Nach einem hämorrhagischen Schock wird die Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren wie den Zytokinen TNF- $\alpha$  (Tumornekrosefaktor- $\alpha$ ), IL-1 (Interleukin-1), IL-6 induziert. Es kommt zu einer starken systemischen proinflammatorischen Antwort (Hyperinflammation) mit der zusätzlichen Freisetzung von Komplementfaktoren und der Anreicherung von immunkompetenten Zellen im beschädigten Gewebe. Diese Immunantwort wird als SIRS (engl. "systemic inflammatory response syndrome") bezeichnet. Das "American College of Chest Physicians" und die "Society of Critical Care Medicine" definierten 1991 den Begriff SIRS (ACCP/SCCM Consensus Conference 1992). Es ist die Abkürzung für "systemic inflammatory response syndrome" und beschreibt eine systemische Inflammation mit der verstärkten Produktion von proinflammatorischen Molekülen (Osuchowski et al. 2006) wie das IL-6, der TNF- $\alpha$ , das IL-1 $\beta$  und das IL-8.

Die Freisetzung dieser Mediatoren charakterisiert einen hyperinflammatorischen Zustand. Im Verlauf einer immunologischen Gegenregulation findet die Produktion antiinflammatorischer Moleküle wie IL-10 statt, die als CARS (engl. "compensatory antiinflammatory response syndrome") bezeichnet wird (Keel et Trentz 2005). Studien zeigten, dass das Zytokinmuster von T<sub>H</sub>1-Zellen die zelluläre Immunantwort über die Produktion von IL-2 und Interferon- $\gamma$  aktiviert (Modrow et Falke 1998). Das Zytokinmuster von T<sub>H</sub>2-Zellen fördert eine T<sub>H</sub>2-Immunantwort, da die Zellen die Interleukine IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13 produzieren (Menger et Vollmar 2004).

Die deregulierte Funktion von T-Zellen nach einem Trauma wird in einer verminderten Immunantwort der  $T_H1$ -Zellen und einer verstärkten Antwort der  $T_H2$ -Zellen deutlich. Es findet also eine Verschiebung der proinflammatorischen Immunantwort, die von den  $T_H1$ -Zellen verursacht wird, zu einer antiinflammatorischen Antwort statt, für die die  $T_H2$ -Zellen verantwortlich sind (Menger et Vollmar 2004, Tschoeke et Ertel 2007).



Abbildung 2: Pathophysiologie nach einem Trauma (verändert nach Moore et Moore 1995).

Die Abbildung 2 beschreibt die zeitliche Abfolge der pro- oder antiinflammatorischen Immunreaktionen, die nach einem Trauma zu einer Inflammation, Immunsuppression oder einer Multiorgandysfunktion führen können.

### 1.3 Pathogenese des MOF: Second hit-Theorie

Bei der Entstehung des Multiorganversagens wirken verschiedene Faktoren zusammen. Dabei wird die Verletzung selbst als ein "first hit" und die daraus resultierende chirurgische Maßnahme bzw. die Resubstitution nach dem hämorrhagischen Schock als "second hit" angesehen (Hietbrink et al. 2006).

Nach der "second-hit"-Theorie wird das Immunsystem durch verschiedene zeitlich getrennte Verletzungen stimuliert (Rotstein 2003). Dabei unterscheidet man primäre Verletzungen (engl. "first hit") wie z. B. Organ- und Gewebeverletzungen, Frakturen mit lokalem Gewebetrauma. Bei vielen Trauma-Patienten kann es im weiteren Verlauf des stationären Aufenthalts zu einem zweiten Ereignis (engl. "second hit") kommen. Darunter versteht man eine Operation mit weiteren Gewebeschädigungen, Hämorrhagie, Ischämie/Reperfusion-Verletzungen, Hypoxie oder Infektionen (Dunham et al.1995; Keel et Trentz 2005).

Nach der "Two Hit"-Theorie prädisponiert ein "second hit" in Form von einer weiteren Operation oder auch einer Infektion zu einer Organdysfunktion. Für die Pathogenese ist die zeitliche Abfolge der Stimuli von großer Bedeutung, da die Immunreaktion des Organismus durch das erste Ereignis beeinflußt wird. Die Abbildung 3 verdeutlicht die Zusammenhänge der Theorie.



Abbildung 3: Entstehung der Organdysfunktion nach der "Two-Hit"-Theorie (verändert nach Cobb et al. 2000).

Bei der Reaktion auf die verschiedenen Reize, die an der Entstehung der Organdysfunktion beteiligt sind, unterscheiden sich die adaptiven Immunantworten einzelner Zelltypen von denen der Gewebeverbände oder Organsysteme. Einzelne Zellen zeigen eine veränderte Genexpression als Reaktion auf den Stressfaktor. Bei einem hämorrhagischen Schock findet auf diese Weise eine Anpassung auf die nach der Hämorrhagie resultierende Hypoxie statt. Der Organismus hingegen setzt Katecholamine frei, um die Folgen des Blutverlustes zu begrenzen und trotz des hämorrhagischen Schocks die Sauerstoffversorgung der Organe aufrechtzuerhalten (Cobb et al. 2000).

## 1.4 Komplikationen nach dem hämorrhagischen Schock

Während des hämorrhagischen Schocks ist eine Störung der Mikrozirkulation zu beobachten, die zu einer Vasokonstriktion der Arteriolen führt. Unter der Mikrozirkulation versteht man das Netz von feinsten Arteriolen, Kapillaren und Venülen des Blutsystems. Aufgrund der Vasokonstriktion findet eine Agglutination von Erythrozyten und Thrombozyten statt, wodurch der Sauerstoffaustausch und die Versorgung der betroffenen Gewebe mit Stoffwechselmetaboliten behindert werden. Diese Ereignisse können zur Schädigung von Geweben und Organen führen.

Bei einem Blutverlust von 20-30 % bewirkt der HS eine Kreislaufzentralisation. Infolge einer Gegenregulation erfolgt eine verminderte Durchblutung der Muskulatur, Abdominalorgane und Nieren. Bei einer länger andauernden Hypoxie von mehr als 2 h kann es zum akuten Nierenversagen kommen. Auch in der Leber führt eine anhaltende Hypoxie zu einer Dysfunktion. Der Abbau toxischer Substanzen wird erschwert (Siewert 2007). In der Lunge kann nach einer systemischen Inflammation ein alveoläres Ödem auftreten, das den Austausch von Sauerstoff behindert (Berchtold et al. 2006). Nach einem hämorrhagischen Schock kann es aufgrund des Missverhältnisses von Sauerstoffbedarf und Sauerstoffangebot zu einer Ischämie der Organe kommen. Eine länger anhaltende Ischämie oder Hypoxie bewirkt verschiedene zelluläre Schäden wie z. B. die verminderte Bildung von ATP, eine veränderte Aktivität der ATP-abhängigen Ionen-Pumpen, d. h. eine verstärkte Aufnahme von Natrium und Kalzium in die Zelle (Eltzschig et Collard 2004). Während der Ischämiephase wird ATP in den Zellen zu Hypoxanthin abgebaut. Um eine irreversible Schädigung der Organsysteme in Folge der Ischämie zu vermeiden, ist eine Substitution von Flüssigkeit und Elektrolyten notwendig. Allerdings besteht bei einer Reinfusion das Risiko eines Ischämie-Reperfusion-Schadens. In der Reperfusionsphase erfolgt der Abbau von Hypoxanthin zu Xanthin, wobei Sauerstoffradikale entstehen. Aufgrund der Aktivität der Xanthinoxidase wird Xanthin zu Harnsäure abgebaut (Abbildung 4). Es kommt dort zur Freisetzung weiterer Sauerstoffradikale, die die Entstehung zellulärer Schäden in Parenchym- und Endothelzellen verursachen (Berchtold et al. 2006).



Abbildung 4: Übersicht der Stoffwechselwege, die zum Ischämie-Reperfusion-Schaden nach einem Trauma führen (verändert nach Keel et Trentz 2005).

In einer Immunreaktion verursachen aktivierte polymorphonukleäre Leukozyten eine verstärkte Bildung von Sauerstoffradikalen und die Degranulation von extrazellulären Proteasen (Martins et al. 2003). Darunter befinden sich Elastasen, die Proteine der extrazellulären Matrix degradieren können (Keel et Trentz 2005). Diese Vorgänge können in Endothel- und Parenchymzellen zur Apoptose führen. Diesen Prozess bezeichnet man als oxidativen Stress (engl. "respiratory burst").

Als eine weitere Komplikation tritt das Capillary-leak-Syndrom auf, das durch einer Störung der Permeabilität der vasalen Endothelzellen gekennzeichnet ist und damit in einen Austritt von intravasaler Flüssigkeit in das Interstitium resultiert. Das auftretende Ödem führt zur Störung des Sauerstoffaustausches und der Stoffwechselendprodukte und schließlich zur Zelldysfunktion (Berchtold et al. 2006).

Nach einem hämorrhagischen Schock besitzen die Patienten eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber nachfolgenden Infektionen bzw. entwickeln eine Sepsis (Chaudry et Ayala 1993). Klinische Anzeichen für eine Sepsis sind unter anderem Fieber, eine periphere Zyanose und septische Mikroembolien, die in schweren Fällen eine Organdysfunktion verursachen können (Ragaller et al. 2007). Die Sepsis bewirkt in Patienten ein supprimiertes

Immunsystem, das durch eine verminderte Immunabwehr gegenüber sekundären Infektionen gekennzeichnet ist. Die Immunsuppression zeichnet sich z. B. durch eine verstärkte Apoptose der zirkulierenden Lymphozyten aus, die sowohl über den intrinsischen als auch über den extrinsischen Signalweg vermittelt wird (Hotchkiss et al. 2005) sowie durch eine verminderte zelluläre Immunantwort aus, die auf der verringerten Proliferation von T-Zellen aufgrund der Expression von PGE<sub>2</sub> beruht (Harris et al. 2002). PGE<sub>2</sub> wirkt sich außerdem immunsuppressiv aus, da es die Aktivierung von Makrophagen inhibiert (Chaudry et Ayala 1993).

### 1.5 Tiermodelle zur Untersuchung des Schocks

Es wurden verschiedene Tiermodelle etabliert, um die immunologischen Prozesse, die nach einer schweren Blutung auftreten, besser untersuchen zu können. So wurden geeignete Behandlungstherapien wie z. B. die kontinuierliche Flüssigkeitsresubstitution und die Verabreichung einer Bolus-Injektion tierexperimentell ermittelt (Hatoum et al. 2002; Krausz et Hirsh 2003).

Ebenso wurde in verschiedenen Studien, die Nagetiere als Versuchstiere beinhalten, die Lösung, mit der die Tiere nach einem massiven Blutverlust reinfundiert wurden, erprobt. Dabei gibt es Untersuchungen, bei denen iso- und hypertonische Kochsalzlösungen,

Ringer-Laktat-Lösung und HES verwendet wurden (Brod et al. 2006; Deitch et al. 2003; Krausz et al. 2001; Krausz et al. 2006; Murao et al. 2003; Powers et al. 2003).

Zur Untersuchung des Einflusses des hämorrhagischen Schocks auf immunologische und pathophysiologische Prozesse verwendet man verschiedene Modelle, die sich hinsichtlich der Art der Blutentnahme und der Vergleichbarkeit zur Pathophysiologie in Trauma-Patienten unterscheiden. Es wurde das Modell der unkontrollierten Hämorrhagie, der Abnahme eines definierten Blutvolumens und des definierten Blutdrucks etabliert (Lomas-Niera et al. 2005). Die unkontrollierte Hämorrhagie kann bei den Versuchstieren durch eine Ruptur der Milz oder der Lazeration der Aorta induziert werden. So wurde ein unkontrollierter hämorrhagischer Schock bei Wistar Ratten durch Transsektion der Milz und einer Arterie der Milz induziert (Nan et al. 2004). Dieses Modell zeigt die Situation der schwer verletzten Trauma-Patienten auf, die aufgrund der Gegebenheiten des Unfallhergangs nicht sofort intensivmedizinisch versorgt werden können.

Ein weiteres Modell sieht die Abnahme eines bestimmten Blutvolumens vor. Meistens erfolgt die Blutentnahme über einen Mikrokatheter oder bei der Verwendung von Mäusen und

Ratten als Versuchstiere über die Schwanzvene. Gleichzeitig zur Blutentnahme wird der Blutdruck kontrolliert. Das Tiermodell, das in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, beruht auf der Blutentnahme arteriellen Blutes bis das Tier einen konstant niedrigen Blutdruck aufweist. Der definierte Blutdruck richtet sich nach der verwendeten Tierart. In dieser Arbeit wurde der Wert auf 35 +/- 5 mmHg festgelegt. Die Blutentnahme erfolgt über einen Mikrokatheter, gleichzeitig wurde der Blutdruck ständig überwacht.

Allen vorgestellten Modellen ist gemeinsam, dass nach der Dauer des hämorrhagischen Schocks eine Substitution mit Kochsalzlösung, Ringer-Laktat-Lösung oder mit dem entnommenen Blut durchgeführt wurde. Durch verschiedene Autoren wurde aber gezeigt, dass abhängig von der verwendeten Reinfusionslösung entweder pro- oder auch antiapoptotische Effekte eingeleitet werden können. In hämorrhagischen Ratten wurde im Lungenparenchym nach der Substitution mit Ringer-Laktat-Lösung eine verstärkte Apoptose nachgewiesen, bei deren Regulation der mitochondriale Signalweg involviert ist (Deb et al. 2000). Bei Verwendung von hypertonischer Kochsalzlösung konnte die Apoptose im Vergleich zur Reinfusion mit Ringer-Laktat-Lösung im Dünndarm hämorrhagischer Mäuse verringert werden. Dieses Ergebnis konnte sowohl anhand der verminderten Aktivierung der Kaspase-3 als auch in der TUNEL-Färbung nachgewiesen werden (Murao et al. 2003).

### 1.6 Auswirkungen des HS auf die Apoptose

Es gibt viele Untersuchungen, die der Fragestellung nachgehen, ob die Aktivierung der Apoptose auf zellulärer Ebene und in Organen nach dem hämorrhagischen Schock induziert wird. Dabei wurden hauptsächlich Ergebnisse aus Tiermodellen aber auch Studien mit humanen Zellen in der Zellkultur publiziert. Deshalb wurden in diesem Zusammenhang geeignete Infusionslösungen und die damit verbundenen Apoptoseraten analysiert. Bei der Verwendung von Ringer-Laktat-Lösung, die in einem dreifachen Volumen des entnommenen Blutes substituiert wurde, als Infusionslösung nach dem Schock in hämorrhagischen Ratten, waren apoptotische Hepatozyten nachzuweisen (Deb et al. 1999). In anderen tierexperimentellen Studien wurde in einem mit einer aktiven Blutung kombinierten Volumen-kontrollierten schweren hämorrhagischen Schockmodell der Ratte infolge der Teilamputation des Schwanzes der programmierte Zelltod verschiedener Organe untersucht. In Abhängigkeit von dem verabreichten Volumen der isotonischen Kochsalzlösung bei der Reinfusion und damit von der Höhe des eingestellten mittleren arteriellen Blutdruck in der prähospitalen Phase, die sich direkt nach der Hämorrhagie nach Amputation anschließt, wurde eine größere Anzahl an apoptotischen Zellen bei einem höher

eingestellten MAP (mittleren arteriellen Blutdruck) in dieser Phase in der Leber, Niere und in der Mucosa des Dünndarms nachgewiesen als bei einem geringeren (Lu et al. 2005). Daraus wird deutlich, dass eine frühzeitige Reinfusion mit einem großen Volumen an Reinfusionslösung eine Schädigung von Zellen bewirkt.

Es gibt weitere Untersuchungen, die sich mit den Mediatoren beschäftigen, die nach einem HS produziert werden und schließlich die Apoptose in den Zellen oder in dem Parenchym induzieren. Es wurde nachgewiesen, dass die mesenteriale Lymphflüssigkeit in hämorrhagischen Ratten Endothelzellen schädigt und auch für die Aktivierung von Immunzellen wie z. B. neutrophilen Granulozyten verantwortlich ist (Upperman et al. 1998). So entstand in einem traumatisch-hämorrhagischen Schockmodell der Ratte, bei der zusätzlich eine Laparotomie durchgeführt wurde, eine Apoptose in Endothelzellen der Lunge. Die Induktion des programmierten Zelltods wurde auf Faktoren in den traumatischhämorrhagischen Ratten eine 100fach höhere Konzentration an apoptotischen Zellen nachgewiesen werden als in Kontroll-Tieren. Es wurde zusätzlich ermittelt, dass sich die Anzahl apoptotischer Zellen in den hämorrhagischen Tieren auf Niveau der Sham-Tiere verringert, wenn die Lymphflüssigkeit, die den Darm umgibt, aufgrund einer Ligation des mesenterialen Lymphganges die systemische Zirkulation nicht erreichen kann (Lu et al. 2004).

Für Studien zum hämorrhagischen Schock mit humanen Zellen wurden kultivierte HUVECs (engl. "human umbilical vein endothelial cells") verwendet. In einer Kombination aus dem Tiermodell und einem Zellkulturexperiment mit humanen Zellen wurde die Apoptose untersucht. Es zeigte sich in der Zellkultur bei der Inkubation von HUVECs mit 5% iger mesenterialer Lymphflüssigkeit der traumatisch-hämorrhagischen Ratten aus dem beschriebenen Tiermodell eine erhöhte Apoptoserate im Vergleich zu den entsprechenden Sham-Tieren (Lu et al. 2004). Dieses Ergebnis wurde in einem analogen Modell bestätigt und weiter nachgewiesen, dass eine Aktivierung der Kaspasen-3, -8 und -9 erfolgt (Davidson et al. 2004).

# 1.7 Apoptose

Die Apoptose oder der programmierte Zelltod ist ein komplex regulierter Prozess, der zuerst 1972 beschrieben wurde (Kerr et al. 1972). Die Apoptose ist durch biochemische und morphologische Kennzeichen, wie z. B. die Hyperkondensation von Chromatin, Kernfragmentation, Bildung von apoptotischen Körperchen (membrangebundene Vesikel) gekennzeichnet (Robertson et al. 2000; Shi 2004). Biochemische Merkmale sind initial die Verlagerung von Phosphatidylserin auf die Zelloberfläche und als späte Phase der Nachweis von DNA Fragmenten, die durch die DNA-Spaltung zwischen den Nukleosomen entstehen (Chang et Yang 2000; Perl et al. 2005).

Der programmierte Zelltod besitzt eine wichtige Funktion bei der Aufrechterhaltung der Zellhomöostase (Adams 2003) sowie bei der Embryonalentwicklung der Extremitäten der Vertebraten (Zuzarte-Luis et Hurle 2005). Eine gestörte Apoptose kann zu neurodegenerativen Krankheiten, Autoimmunkrankheiten, kardiovaskulären Krankheiten, Immundefizienz und Krebs führen (Cory et al. 2003; Danial et Korsmeyer 2004; Zimmermann et Green 2001). Der programmierte Zelltod wird über verschiedene Signalwege, in denen Enzym-Kaskaden eine bedeutende Rolle spielen, induziert.

### 1.8 Kaspasen

Bei den Kaspasen handelt es sich um Cystein-Proteasen, die spezifisch ihr Substrat hinter einem Aspartat-Rest spalten. Die aktiven Kaspasen weisen eine große (17-20 kDa) und kleine Untereinheit (9-12 kDa) auf (Stennicke et Salvesen 2000). Die inaktiven Proteine werden Zymogene oder Prokaspasen genannt. Die Zymogene besitzen eine N-terminale Prodomäne, eine große und kleine Untereinheit. Zur Aktivierung müssen die Zymogene proteolytisch in der Region zwischen der großen und kleinen Untereinheit gespalten werden (Stennicke et Salvesen 2000).

Aktive Kaspasen zeigen einen tetrameren Aufbau aus zwei großen und zwei kleinen Untereinheiten.

Man unterscheidet nach ihrer Funktion die Initiatorkaspasen (z. B. Kaspasen-8 und -9), die Effektorkaspasen (z. B. Kaspasen-3 und -7) und die Interleukin-1β-converting enzyme (ICE)-like caspases. Letztere besitzen eine wichtige Funktion bei der inflammatorischen Immunantwort und tragen erst nach der Überexpression zur Ausführung der Apoptose bei

(Shiozaki et Shi 2004). Die Initiator- und Effektorkaspasen sind Enzyme, die innerhalb der Kaspase-abhängigen Signalwege der Apoptose eine entscheidende Funktion ausüben. Sie unterscheiden sich sowohl in ihrer Funktion, als auch in der Art der Aktivierung. Die Aktivierung der Initiatorkaspasen erfolgt in dem extrinsischen Signalweg der Apoptose durch Protein-Protein-Interaktionen, während die Effektorkaspasen von vorangeschalteten Kaspasen proteolytisch gespalten werden (Hengartner 2000). Man kennt zwei verschiedene Elemente, die viele Kaspasen N-terminal besitzen. Dabei handelt es sich um die beiden Domänen Todeseffektor-Domäne DED und die caspase activation and recruitment domain CARD. Die Kaspase-8 beinhaltet die DED. Diese Region ist wichtig für die Interaktion und Anlagerung der Kaspase an entsprechende Adaptermoleküle des Apoptose-Signalweges, der über die Aktivierung von Todesrezeptoren vermittelt wird. Andere Kaspasen wie die Kaspase-9 enthalten die CARD (Hengartner 2000). Diese Domäne dient der Interaktion mit der CARD des Apaf-1, der im intrinsischen Weg der Apoptose von Bedeutung ist (Li et al. 1997).

# 1.9 Kaspase-abhängige Signalwege der Apoptose

Die Kaspase-abhängigen Signalwege, die zur Induktion der Apoptose führen, werden als intrinsischer und extrinsischer Signalweg bezeichnet. Bei dem zuerst genannten Weg führen verschiedene Stimuli, wie ionisierende Strahlung oder Chemotherapeutika zur Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien (Stennicke et Salvesen 2000). Nach der Freisetzung findet die Bildung eines Multiproteinkomplexes statt, der als Apoptosom bezeichnet wird. Dieser Komplex besteht aus Cytochrom c, einem Apoptose aktivierenden Protease Faktor-1 (Apaf-1), Desoxyadenosintriphosphat (dATP) und der Prokaspase-9 (Wang et al. 2005). Innerhalb dieses Komplexes findet die Aktivierung der Kaspase-9 statt, die als Initiatorkaspase die Effektorkaspasen-3 und -7 aktiviert.

Letztere bewirken die Spaltung verschiedener zellulärer Substrate, wodurch die Apoptose eingeleitet wird. Beispiele für Substrate der Effektorkaspasen sind die Kaspase-aktivierte DNase, die CAD abgekürzt wird und die PARP (poly-[ADP-Ribose]-Polymerase). CAD liegt in nicht apoptotischen Zellen im Komplex mit dem Inhibitor ICAD vor. Dieser Komplex wird auch als DFF (engl. "DNA fragmentation factor") bezeichnet. Bei apoptotischen Zellen aktiviert die Kaspase-3 die DNase indirekt, indem sie den Inhibitor ICAD spaltet (Sakahira et

al. 1998). PARP ist assoziiert mit anderen Proteinkomplexen und hat innerhalb dieses Komplexes eine wichtige Funktion bei der Reparatur von DNA (Robertson et al. 2000).

Es wurden zahlreiche weitere Substrate identifiziert. Unter diesen findet man z. B. Gerüstproteine des Zytoskeletts, Regulatoren des Zellzykluses, Reparaturenzyme, Transkriptionsfaktoren, Proteine der Signaltransduktion (Chang et Yang 2000).

Bei dem extrinsischen Signalweg wird die Apoptose über die spezifische Bindung von Liganden an entsprechende Oberflächenrezeptoren induziert. Diese Rezeptoren gehören zur Familie der TNF-Rezeptoren. Bekannte Rezeptoren sind der Fas- (CD95) und der TNF-Rezeptor. Der entsprechende Ligand für den Fas-Rezeptor ist der Fas-L bzw. für den TNF-Rezeptor TNF. Die Bindung induziert eine Konformationsänderung bzw. Oligomerisierung der Rezeptoren (Wang et al. 2005). Danach erfolgt die Anlagerung bestimmter Adapterproteine. Das Adapterprotein für Fas wird als FADD (Fas assoziiertes Protein mit Todesdomäne) bezeichnet. FADD besitzt eine Domäne, mit der es mit der Prokaspase-8 interagieren kann, die DED (Todeseffektor-Domäne) (Cho et Choi 2002). Innerhalb des gebildeten DISC (engl. "death-inducing signaling complex") wird die Prokaspase aktiviert (Boatright et Salvesen 2003). Die aktive Kaspase-8 kann in einer Enzymkaspade verschiedene inaktive Effektorkaspasen wie z. B. die Prokaspase-3 und -7 proteolytisch spalten und somit aktivieren. Allerdings kann man die beiden Kaspase-abhängigen Wege der Regulation der Apoptose nicht getrennt voneinander betrachten, da sie miteinander verbunden sind. Die Initiatorkaspase-8 hat eine wichtige Rolle dabei.

So spaltet die aktive Initiatorkaspase-8 das proapoptotische Protein Bid, wobei ein aminoterminaler Glycinrest exponiert wird. Nach einer Modifikation des Restes findet eine Translokation zu den Mitochondrien statt (Zha et al. 2000). Das gespaltene Protein Bid (tBid) aktiviert proapoptotische Proteine wie z. B. Bax (Zinkel et al. 2005). Dadurch wird die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien in das Zytosol bewirkt.



Abbildung 5: Schematische Darstellung der Signalwege der Apoptose. Es sind der extrinsische, der durch die Bindung der Liganden an Todesrezeptoren induziert wird, und der mitochondrial-vermittelte intrinsische Weg gezeigt (Ranger et al. 2001). Die Signalwege wurden im obigen Abschnitt näher beschrieben.

# 1.10 Inhibitoren und Aktivatoren in der Apoptose

Man kennt verschiedene Proteine, die inhibitorisch bei der Regulation der Apoptose wirken. Diese werden Inhibitoren der Apoptose Proteine (IAP) genannt. Sie besitzen ein Strukturmotiv, das als BIR bezeichnet wird (Budihardjo et al. 1999). BIR ist die Abkürzung für Baculovirus IAP Wiederholung, von denen viele Inhibitoren mehrere enthalten. Die Regulierung der Apoptose durch Inhibitoren ist ein sehr komplexer Prozess, da die Inhibitoren ihrerseits wieder von anderen Proteinen in ihrer Funktion inhibiert werden können. Ein bekannter Inhibitor der IAP-Proteine ist Smac bzw. DIABLO, das im Intermembranraum der Mitochondrien lokalisiert ist. Smac steht für "second mitochondrial activator of caspases". Bei der Aktivierung des mitochondrial-vermittelten Signalweges der Apoptose wird es aus den Mitochondrien in das Zytosol freigesetzt, interagiert mit verschiedenen Inhibitoren und blockiert die Funktion der Inhibitoren.

# 1.11 Regulierung der Apoptose durch die Bcl-2-Familie

Am Mitochondrium wirken viele verschiedene Proteine. Unter diesen findet man die Proteine der Bcl-2 Familie. Die Mitglieder dieser Proteinfamilie teilt man entsprechend ihrer Funktion in pro- oder antiapoptotische Proteine sowie nach vorhandenen Proteindomänen in drei verschiedene Gruppen ein.

Zu der Gruppe 1 gehören antiapoptotische Proteine. Unter diesen befindet sich das gut untersuchte Protein Bcl-2. Die Proteine dieser Gruppe besitzen jeweils vier konservierte Domänen, die als Bcl-2 homologe Regionen 1-4 (BH 1-4) bezeichnet werden. Viele Mitglieder der Gruppe 1 zeichnen sich durch eine Transmembrandomäne am C-Terminus aus (Kaufmann et Hengartner 2001). Die zuletzt genannte Proteindomäne ermöglicht den antiapoptotischen Proteinen die Integration in die äußere Mitochondrienmembran, wo sie mit anderen Proteinen der Bcl-2 Familie interagieren und auf diese Weise ihre antiapoptotische Funktion ausüben können. Es konnte gezeigt werden, dass das Protein Bcl-2 aufgrund einer Heterodimerisierung mit Bax antiapoptotisch wirkt (St. Clair et al. 1997).

Die Gruppe 2 besteht aus proapoptotischen Proteinen, die drei hochkonservierte Regionen BH 1-3 aufweisen, die homolog zu den entsprechenden Domänen der Gruppe 1 Proteine sind. Den Proteinen der Gruppe 2 fehlt die BH 4 Domäne der antiapoptotischen Proteine, die sich am N-Terminus befindet (Kaufmann et Hengartner 2001). Ein wichtiges proapoptotisches Protein ist Bax. Man kann bei Bax eine C-terminale Transmembrandomäne nachweisen (Cory et al. 2003). Die proapoptotische Funktion von Bax kann durch eine Heterodimerisierung mit antiapoptotischen Proteinen der Bcl-2 Familie unterdrückt werden (Oltvai et al. 1993).

Die Gruppe 3 beinhaltet proapoptotische Proteine, die nur die BH 3 Domäne besitzen. Bid wird in diese Gruppe eingeordnet. Es enthält neben der BH-3 Domäne zwei Spaltungsstellen, an denen es durch die Aktivität der aktiven Kaspase-8 und Granzym B gespalten werden kann. Es weist keine C-terminale hydrophobe Transmembrandomäne auf (Li et al. 1998). Die Mitglieder dieser Proteinfamilie interagieren mit ihrer BH 3 Domäne mit Proteinen der Gruppe 1 und 2. Die pro- und antiapoptotischen Proteine der Bcl-2 Familie unterscheiden sich nicht nur in ihrer Funktion und dem strukturellen Aufbau sondern auch in der Lokalisation innerhalb der Zelle. So findet man das Bcl-2 aufgrund der Mitochondrienmembran Transmembrandomäne in der äußeren integriert. Die proapoptotischen Proteine dagegen befinden sich hauptsächlich im Zytosol. Erst nach der Aktivierung sind sie in der Nähe der Mitochondrienmembran zu finden.

15

### 1.12 Zielsetzung der Arbeit

Der hämorrhagische Schock stellt oftmals eine schwerwiegende Komplikation nach einem Gewebetrauma mit starker Blutung dar, die zu MODS, MOF (Multiorganversagen) und Sepsis führen kann und damit den Heilungsverlauf stark beeinträchtigt. Damit die daraus resultierenden gesundheitlichen Konsequenzen für die Patienten besser eingeschätzt und behandelt sowie die immunologischen Prozesse im Organismus untersucht und verstanden werden können, wurden verschiedene Tiermodelle etabliert. Das in dieser Arbeit verwendete Tiermodell simuliert einen hämorrhagischen Schock, um den Zusammenhang zwischen dem Schock sowie der Induktion der zellulären und parenchymatösen Apoptose, die zur Organdysfunktion, MODS und MOF führen kann, in einem zeitlichen Verlauf zu untersuchen. In der Leber, Lunge, Milz und Niere sollen die Auswirkungen des HS auf parenchymatöse Organe, die Regulation der HS-induzierten Apoptose sowie die organspezifisch regulierte Apoptose analysiert werden. In diesen Organen soll ermittelt werden, ob die Aktivierung der Apoptose nach dem HS über den extrinsischen oder intrinsischen Signalweg vermittelt abläuft. Zur Überprüfung, welcher Signalweg involviert ist, werden die Aktivitäten der Initiator- und Effektorkaspasen in den Organen gemessen. Einen zusätzlichen Nachweis über die Regulierung der Apoptose weist die Expression mitochondrialer Gene bax und bcl-2 in den Parenchymzellen nach, da beide Genprodukte im intrinsischen Signalweg involviert sind. Weiter wird in den T-Lymphozyten einschließlich der Subpopulationen, die aus der Milz isoliert wurden, festgestellt, ob der TNF-Rezeptor oder Fas-Rezeptor und damit der extrinsische Signalweg an der Weiterleitung der apoptotischen Signale hauptsächlich beteiligt ist. Es ist oft notwendig, dass bei traumatisierten Patienten infolge der multiplen Verletzungen, die einen HS hervorgerufen haben, mehrere Operationen vorgenommen werden. Daher soll in dieser Arbeit auch ermittelt werden, ob eine Laparotomie, die 24 h nach dem HS durchgeführt wird, einen additiven Effekt auf die Induktion der Apoptose in den Splenozyten oder dem Nierenparenchym bewirkt.

# 2.1 Material

# 2.1.1 Chemikalien

Albumin Fraktion V	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat	Fluka, Taufkirchen, Deutschland
Annexin V- Fluoresceinisothiocyanate	Caltag Laboratories (International) GmbH, Hamburg, Deutschland
7-Aminoactinomycin D	Calbiochem, San Diego, USA
Calciumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche, Mannheim, Deutschland
DEPC	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
dNTP Set 100 mM Lösungen	Amersham Biosciences, München, Deutschland
DTT	Roth, Karlsruhe, Deutschland
EGTA	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	J. T. Baker, Deventer, Niederlande
Fötales Kälberserum	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Glycin	Fluka, Taufkirchen, Deutschland
HEPES Puffer	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Immobilon Western HRP Substrat	Millipore GmbH, Schwalbach, Deutschland
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Magnesiumchlorid-Hexahydrat
2-Mercaptoethanol
Methanol
Natriumazid
Natriumchlorid
Oligo-Primer dT(pd (T) <sub>12-18</sub>
Paraformaldehyd
PBS Dulbecco
Polymyxin B-Sulfat
Ponceau S Lösung
Precision Plus Protein Standards Kaleidoscope
Qiazol Lysis Reagent
RNA later RNA Stabilisation Reagent
Roti-Block
Roti-Load 1
Roti-Mark Prestained
Roti-Nanoquant
Rotiphorese Gel 30
RNase Away
SDS ultrapure
Schwefelsäure
TEMED
Tissue Tek

Roth, Karlsruhe, Deutschland Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland Roth, Karlsruhe, Deutschland Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland Fluka, Taufkirchen, Deutschland Amersham Biosciences, München, Deutschland Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland Biochrom AG, Berlin, Deutschland Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland Qiagen, Hilden, Deutschland Qiagen, Hilden, Deutschland Roth, Karlsruhe, Deutschland Molecular BioProducts, Inc., San Diego, USA Roth, Karlsruhe, Deutschland Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland Fluka, Taufkirchen, Deutschland Sakura, Zoeterwoude, Niederlande

ТМВ	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Trichlormethan	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trizma base, minimum 99,9 % titration	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Trockenmilchpulver	Fluka, Taufkirchen, Deutschland
Trypanblau 0,5%ige Lösung	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Tween-20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Triton X-100	Fluka, Taufkirchen, Deutschland
Vectashield Mounting Medium with DAPI	Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching, Deutschland

### 2.1.2 Medikamente

Heparin-Natrium-5000-ratiopharm 5000 I.E./0,2 ml
Isotonische Kochsalzlösung
Rimadyl Injektionslösung
Rompun 2 %
Ketamin 10 %

Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland Pfizer Pharma GmbH, Karlsruhe, Deutschland Bayer AG, Leverkusen, Deutschland WDT, Garbsen, Deutschland

# 2.1.3 Allgemeine Verbrauchsmittel

Deckgläser Haemozytometer	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
F96 PP black	Thermo Fisher Scientific Inc. (Nunc GmbH & Co. KG), Wiesbaden,
	Deutschland
Immuno Platten	Thermo Fisher Scientific Inc. (Nunc GmbH & Co. KG), Wiesbaden,
	Deutschland
Kryoröhrchen	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
96 MicroWell Platten	Thermo Fisher Scientific Inc. (Nunc GmbH & Co. KG), Wiesbaden
Objektträger SuperFrost Plus	G. Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig, Deutschland
Optical Flat Cap Strips	Biozym, Hess. Oldendorf, Deutschland
Protran BA 83 Nitrocellulose 0,2 µm	Whatman Schleicher & Schuell GmbH, Dassel, Deutschland
Röhrchen für die Durchflusszytometrie	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Röhrchen mit zwei-Positionen-Kappe, 5 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
0,2 ml LP Strip Tubes 8-Strips	Biozym, Hess. Oldendorf, Deutschland
U 96 PP 0,5 ml white	Thermo Fisher Scientific Inc. (Nunc GmbH & Co. KG), Wiesbaden,
	Deutschland
Zellsieb 40 µm Porengrösse	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

Alle nicht aufgeführten Verbrauchsmittel wurden von der Firma Sarstedt AG & Co. bezogen.

### 2.1.4 Chirurgische Verbrauchsmittel

Injekt-H 1 ml Heparin 25000 I.E. Microlance 3 (22 G x 1 ¼ "; 30 G x ½ "; 18 G x 1½ ") Cannulation System Microvette Pur-Zellin Vicryl Plus 5-0 chirurgisches Nahtmaterial resorbierbar

#### 2.1.5 Geräte

5810 R; 5415 D ABC Animal Blood Counter Agilent 2100 Bioanalyser Axioskop 40 BPA Blood Pressure Analyser mit Powerware 5115 Blutdruckmessgerät DNA Engine Opticon Continuous Fluorescence Detector FACS Calibur GeniusSpectra Fluorplus GFL Schüttelapparate 3005 HERAcell 150 B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland
Ethicon Products Deutschland, Norderstedt/ Glashütte, Deutschland

Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland Scil Animal Care Company, Viernheim, Deutschland Agilent Technologies GmbH & Co. KG, Waldbronn, Deutschland Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland Digi-Med, Louisville, Kentucky, USA Sanimed GmbH, Ibbenbüren, Deutschland MJ Research, Inc., Waltham, USA Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, Deutschland

KL 1500 electronic	Schott AG, Mainz, Deutschland
Kryostat	Microm International GmbH, Walldorf, Deutschland
LAS 3000	Fujifilm Europe GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Mastercycler	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
mbq 52 ac	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland
Mini Protean 3 Electrophoresis System mit Glasplatten und Kämmen	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Minishaker MS 2	IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Mini Trans-Blot Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Multifuge 1 S-R	Thermo Fisher Scientific Inc., Langenselbold, Deutschland
Nasen- und Ohrenhaartrimmer 4145	Quelle GmbH, Fürth, Deutschland
Neubauer Zählkammer	LO-Labor Optik GmbH, Friedrichsdorf, Deutschland
Olympus Camedia C-4000 Zoom mit Adapter C3040-ADL	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Perfusor fm	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
pH 210 Microprocessor pH Meter	Hanna Instruments Deutschland GmbH, Kehl am Rhein, Deutschland
PowerPac Basic	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Scout Pro	Ohaus Waagen Vertriebs GmbH, Giessen, Deutschland
Simplicity 185 Water System	Millipore GmbH, Schwalbach, Deutschland
Stemi SV 11	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland
Titramax 100	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Ultra-Turrax T 25 basic	IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Wasserbad WBU 45	Memmert GmbH und Co. KG, Schwabach, Deutschland

Es wurden chirurgische Pinzetten, darunter eine Pinzette mit spitz zulaufenden Branchen, und Scheren von der Firma Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland und eine Mikroschere von der Firma Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland bezogen.

# 2.1.6 Kits

Agilent RNA 6000 Nano Assay	Agilent Technologies GmbH & Co. KG,
	Waldbronn, Deutschland
Agilent RNA 6000 Nano Assay Series II	Agilent Technologies GmbH & Co. KG,
RNA ladder	Waldbronn, Deutschland
Apo-ONE Homogeneous Caspase-3/7	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Assay	
Caspase-Glo 8 Assay	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Caspase-Glo 9 Assay	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
DeadEnd Fluorometric TUNEL System	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Invisorb Spin Cell RNA Mini Kit	Invitek GmbH, Berlin, Deutschland
OptEIA Mouse IL-6 ELISA Set	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Recombinant Mouse IL-6	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
Quantitect Custom Assay	Qiagen, Hilden, Deutschland
Quantitect Probe PCR Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland

# 2.1.7 Enzyme und Pufferlösungen

DNase I RNase-frei 2 U/µI	Applied Biosystems, Applera Deutschland
	GmbH, Darmstadt, Deutschland
Mo-MLV RT	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Mo-MLV RT Puffer	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
RNasin Ribonuclease Inhibitor 40 U/µl	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland

# 2.1.8 Immunglobuline

### 2.1.8.1 Durchflusszytometrie

Ē					
-	Tahelle 1 <sup>.</sup> P	Primäre Immund	Iobuline gegen Mai	is und die entsprech	enden Isotvokontrollen

Antigen	Konjugation	Klonbezeichnung	Isotyp	Hersteller
CD3	R-PE	CT-CD3	Rat lgG2a	Caltag Laboratories (International) GmbH, Hamburg, Deutschland
CD4	APC	RM4-5	Rat IgG2a	Caltag Laboratories (International) GmbH, Hamburg, Deutschland
CD8	APC	CT-CD8a	Rat lgG2a	Caltag Laboratories (International) GmbH, Hamburg, Deutschland
CD95	Biotin	Jo2	Hamster IgG	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
CD120α	Biotin	55R-170	Armenische Hamster IgG <sub>2</sub> , λ2	Biolegend, San Diego, USA

Tabelle 2: Sekundäre Immunglobuline der Durchflusszytometrie

Antigen	Konjugation	Hersteller
Streptavidin	FITC	BD Biosciences,
		Heidelberg, Deutschland

# 2.1.8.2 Western Blot-Analysen

Tabelle 3: Primäre Immunglobuline, die gegen Epitope der Maus gerichtet sind

Antigen	Bezeichnung	Ursprung	Тур	Hersteller
Bax	(N-20)	Kaninchen	polyklonaler	Santa Cruz
	sc-493		lgG	Biotechnology, Inc.,
				Heidelberg,
				Deutschland
Bcl-2	(C-2)	Maus	monoklonaler	Santa Cruz
	sc-7382		lgG₁	Biotechnology, Inc.,
				Heidelberg,
				Deutschland
β-Aktin	A5441	Maus	monoklonaler	Sigma-Aldrich Chemie
			lgG	GmbH, Taufkirchen,
				Deutschland

Spezies	Bezeichnung	Konjugation	Ursprung	Hersteller
Anti-Maus	P0447	HRP	Ziege	DakoCytomation
			-	GmbH, Hamburg,
				Deutschland
Anti-	P0448	HRP	Ziege	DakoCytomation
Kaninchen			-	GmbH, Hamburg,
				Deutschland

Tabelle 4: Sekundäre Immunglobuline (IgG)

# 2.1.9 Primer für die RTD-PCR

Die in der nachfolgenden Tabelle aufgeführten Primer sind im Quantitect Custom Assay der Firma Qiagen enthalten.

Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Primer

Produkt	Gen	Konjugation	Primer-Sequenz in 5' $\rightarrow$ 3' Orientierung
Mm_Bax_FAM_1	bax	FAM	1) CTTTTTGCTACAGGGTTTCATC
			2) TGCTGTCCAGTTCATCTCCAAT
Mm_Actb_FAM_1	beta	FAM	1) TGGGACGACATGGAGAA
	Aktin		2) GAAGGTCTCAAACATGATCTGG
Mm_Bcl2_FAM_1	bcl-2	FAM	1) GGATGACTGAGTACCTGAA
			2) AGCCAGGAGAAATCAAACAGAG

# 2.1.10 Angesetzte Puffer und Polyacrylamidgele

### Lysepuffer für die Proteinisolation

25 mM HEPES Puffer (pH 7,5), 0,1 % Triton-X-100, 5 mM Magnesiumchlorid, 2 mM DTT, 1 Tablette Protease-Inhibitor auf 10 ml Lysepuffer, 1 mM EGTA

### Puffer für die Western Blot-Analysen

10x Laufpuffer für 1 Liter: 30 g Trizma base;144,2 g Glycin; 10 g SDS
4x Transferpuffer für 1 Liter: 9,69 g Tris base; 45 g Glycin; 200 ml Methanol
Waschpuffer: 0,05 % Tween-20 in PBS
Blockierungspuffer A: 5 % Trockenmilchpulver in PBS; 0,05 % Tween-20
Blockierungspuffer B: 1x Rotiblock
Puffer C für 1 Liter (pH 6,7): 7,64 g Trizma base; 20 g SDS; 100 mM 2-Mercaptoethanol

### Puffer für die Zellaufarbeitung der Durchflusszytometrie

PBS, 2 % Fötales Kälberserum und Polymyxin B-Sulfat

### Färbepuffer für die Durchflusszytometrie

PBS, 1 % Albumin Fraktion V; 0,01 % Natriumazid

### Annexin V-Färbepuffer für die Durchflusszytometrie

10 mM HEPES; 150 mM Natriumchlorid, 1,8 mM Calciumchlorid, 1 mM Magnesiumchlorid, 5 mM Kaliumchlorid; pH 7,4

12 % Trenngel		4 % Sammelgel
Chemikalien	Volumen in ml	Volumen in ml
Rotiphorese Gel 30	4	0,67
1 M Trizma base	2,5	1,25
20 % SDS	0,05	0,025
H <sub>2</sub> O bidest.	3,35	3
5 % APS	0,1	0,05
TEMED	0,01	0,01

Tabelle 6: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele

### 2.1.11 Chemikalien für die cDNA-Synthese und RTD-PCR

### Puffer A für die cDNA-Synthese

1x Reaktionspuffer, 0,01 M DTT, 250  $\mu\text{M}$  dNTPs, 4 U DNase und 20 U RNase-Inhibitor

### Komponenten für die RTD-PCR

Für die RTD-PCR wurden 1  $\mu$ l cDNA, 12,5  $\mu$ l PCR Master Mix, 9  $\mu$ l H<sub>2</sub>O, 2,5  $\mu$ l Quantitect Custom Assay in weißen LP Strip Tubes verwendet. Der PCR Master Mix und das H<sub>2</sub>O sind Bestandteile des Quantitect Probe PCR Kits.

### 2.1.12 Software und Statistik

2100 Expert	Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co. KG, Waldbronn, Deutschland
Alpha Digidoc	Alpha Innotech, Grödig/Salzburg, Österreich
Cell Quest	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
FlowJo	TreeStar Inc., Ashland, USA
Image Reader LAS 3000	Fujifilm Europe GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Opticon Monitor Analysis Software	MJ Research, Inc., Waltham, USA
Sigma Plot	Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland

Die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde mit dem t-Test der Software Sigma Plot durchgeführt. Die Ergebnisse der Tiergruppen wurden bei einem P≤0,05 als signifikant gegenüber der Kontroll-Gruppe bewertet und mit einem Stern gekennzeichnet. Die Ergebnisse der Diagramme wurden als arithmetische Mittel unter Berücksichtigung des Standardfehlers aufgetragen.

### 2.1.13 Verwendete Tiere

Für diese Arbeit wurden männliche, gesunde C57BL/6 Mäuse (*Mus musculus*) im Alter von 8 bis 12 Wochen (25 bis 30 g Körpergewicht) verwendet. Sie wurden aus der Zucht der Charité-Universitätsmedizin Berlin, Forschungseinrichtungen für Experimentelle Medizin (FEM) Krahmerstrasse 6-10, 12207 Berlin erworben.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Experimentelle Tiergruppen

In dieser Arbeit wurden vier unterschiedliche Gruppen untersucht, auf die im Folgenden näher eingegangen wird. Die erste Gruppe besteht aus den Kontroll-Tieren. Dabei handelt es sich um gesunde Mäuse, die keiner chirurgischen Behandlung unterzogen und mittels einer cervikalen Dislokation getötet wurden. Die zweite Gruppe beinhaltet die Sham-Tiere. Die Mäuse wurden narkotisiert, die *Arteria femoralis* beiderseits freipräpariert und jeweils mit einem Mikrokatheter katheterisiert, wobei der eine Katheter zur Überwachung an ein Blutdruckmessgerät angeschlossen und der andere mit einem Stopfen verschlossen wurde. Dieser Zustand wurde in Analogie zu der unter Punkt 2.2.2 beschriebenen HS-Operation 60 min beibehalten. Die dritte Gruppe bilden die HS-Tiere. Bei diesen Tieren wurde die Operation angewendet, die im nächsten Abschnitt beschrieben wird. Als vierte Gruppe wurden HS-Tiere verwendet, bei denen 24 h nach der HS-Operation eine Laparotomie durchgeführt wurde. Diese Operation ist unter Punkt 2.2.3 näher beschrieben.

### 2.2.2 Hämorrhagischer Schock-Operation

Zur Durchführung der HS-Operation wurde eine intra peritoneale Injektionsnarkose mit 120 mg/kg Ketamin und 6 mg/kg Xylazin verwendet. Nach der Rasur der Mäuse in der Leistengegend beider Hinterläufe wurde die Arteria femoralis unter einem Stereomikroskop (Stemi SV 11) beiderseits freipräpariert. Danach wurden die spitz zulaufenden Branchen einer Pinzette vorsichtig unter die Arterie geschoben. Das Gefäß wurde proximal der linken Branche der Pinzette mit chirurgischem Nahtmaterial angeschlungen und mit einer Mikroschere inzidiert. Dann wurde ein Mikrokatheter in die eröffnete Arterie geschoben. Während der eine Mikrokatheter zur Messung der Vitalparameter (Puls, systolischer und diastolischer arterieller Druck) an ein Blutdruckmessgerät angeschlossen wurde, wurde der kontralaterale zum gezielten Ablassen von Blut verwendet. Über diesen Katheter wurde solange Blut entnommen bis der arterielle Blutdruck der HS-Maus auf 35 +/- 5 mmHg abgefallen war. Dieser Zustand wurde 60 min aufrechterhalten. Danach wurde die Maus über einen Katheter mit isotonischer Kochsalzlösung reinfundiert, wobei das Volumen dem dreifachen Volumen des entnommenen Blutes entsprach. Nun wurden die Katheter entfernt, die Gefäße mit chirurgischem Nahtmaterial legiert. Die Schmerzanalgesie nach der Operation wurde mit Rimadyl durchgeführt und die Wunden wurden mit drei Einzelknopfnähten verschlossen.

### 2.2.3 Laparotomie

Die Laparotomie wurde als zweite chirurgische Maßnahme 24 h nach der HS-Operation durchgeführt, damit der Einfluss einer zusätzlichen Gewebeverletzung auf die Apoptose der Parenchymzellen untersucht werden konnte. Zur Anästhesie wurde eine Injektionsnarkose verwendet, die im Abschnitt 2.2.2 beschrieben wurde. Die Tiere wurden vor der Operation am Thorax rasiert. Es wurde eine 1,5 cm lange thorako-abdominale Inzision gesetzt und nach der Präparation der Haut das Peritoneum eröffnet. Anschließend wurden die Organe inspiziert. Danach wurde das Peritoneum mit drei Einzelknopfnähten dicht verschlossen und die Wunde mit einer Hautnaht versehen. Zur Schmerzanalgesie wurde Rimadyl verabreicht.

### 2.2.4 Blutentnahme

Für die Bestimmung der Zellzahlen im differentiellen Blutbild wurden 0 h, 24 h, 72 h, 7 und 14 Tage nach der Operation 50 µl Blut aus der Kaudalvene von Kontroll-, Sham- und HS-Mäusen entnommen. Zusätzlich wurden die Mäuse mit einer Injektionsnarkose, die im Abschnitt 2.2.2 beschrieben wurde, in eine kurzzeitige Narkose versetzt. Die Blutentnahme erfolgte intra-cardial. Dieses Vollblut wurde zur Konzentrationsbestimmung des IL-6 verwendet.

#### 2.2.4.1 Blutbildanalyse

Die Analyse wurde in dem ABC Animal Blood Counter nach dem Protokol des Herstellers durchgeführt.

#### 2.2.4.2 ELISA

Zur Bestimmung der IL-6 Konzentration im Plasma der Kontroll-, Sham- und HS-Tiere wurde das entnommene Vollblut der Tiere für 10 min bei 400 g zentrifugiert und das Plasma abgenommen. Der quantitative Immunotest wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt, die Absorbtion bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen und dabei die angegebene Referenzwellenlänge berücksichtigt.
## 2.2.5 Entnahme der Organe

Die Mäuse der Gruppen 2 und 3 wurden 0 h, 24 h, 72 h nach Beendigung der Operation über eine cervikale Dislokation getötet und folgende Organe untersucht: Lunge, Leber, Milz und Niere. Die genannten Organe wurden auch bei den getöteten Kontroll-Mäusen entnommen. Bei den Laparotomie-Tieren wurden die beiden Organe Milz und Niere 0 h, 24 h und 72 h nach Abschluss der Laparotomie entnommen. Ein Teil der Milz wurde jeweils bei den vier untersuchten Gruppen in ein Zellsieb mit der Porengröße von 40 µm gegeben und durch Druck eines Stempels einer Spritze homogenisiert. Die Zellsuspension wurde mit PBS verdünnt und für Analysen der Durchflusszytometrie verwendet. Für die RNA-Isolierung wurde jeweils ein Drittel jedes Organs der Gruppen 1-3 in 250 µl RNA later gegeben und bei 4 °C über Nacht gelagert. Der Rest wurde für die Protein-Isolierung sofort im flüssigen Stickstoff schockgefroren.

## 2.2.6 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (engl. "FACS") ist eine Methode zur Untersuchung von Zellen, wobei diese anhand verschiedener Parameter wie z. B. ihrer Größe und Granularität unterschieden werden können. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Detektion von Zellen, die mit einem Antikörper gekoppelt wurden, der seinerseits mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert ist. Bei der Detektion der markierten Zellen werden diese in einem Probenstrom an einem Laser vorbeigelenkt, wobei das monochromatische Licht des Lasers, wenn es auf die zu untersuchenden Zellen trifft, gestreut und reflektiert wird. Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht außerdem auf der Messung der emitierten Wellenlängen der an die verschiedenen Antikörper konjugierten Fluorochrome.

Für die Durchflusszytometrie wurde ein Gewebestück der Milz der experimentellen Gruppen auf ein Zellsieb mit der Porengröße von 40 μm gegeben, mit Hilfe eines Stempels einer Spritze homogenisiert und mit PBS verdünnt. Nach der Zentrifugation bei 300 g für 5 min wurde die Zellsuspension mit Lösung B gewaschen. Es wurden 0,5 10<sup>6</sup> Zellen in 50 μl Färbepuffer bzw. Annexinfärbepuffer mit den primären Antikörpern anti-mouse CD3-PE; CD4-APC, CD8-APC, CD95-Biotin, CD120α-Biotin bzw. Annexin V-PE und den entsprechenden Isotypkontrollen für 20 min lichtgeschützt auf Eis inkubiert. Für die Färbung mit Annexin V wurde keine Isotypkontrolle verwendet. Durch die anschließende Zentrifugation bei 300 g für 5 min und dem Waschen mit Lösung B wurden nichtgebundene Antikörper entfernt. Die nachfolgende Inkubation mit dem sekundären Antikörper Streptavidin-FITC wurde bei den Zellen durchgeführt, die zuvor mit Biotin gekoppelten

Antikörpern inkubiert wurden. Die Inkubation wurde in identischer Weise zu der Inkubation mit primären Antikörpern durchgeführt. Die Messung erfolgte am FACS Calibur mit der Software Cell Quest. Die Auswertung der Rohdaten wurde mit Hilfe der Software FlowJo durchgeführt.

# 2.2.7 Isolierung von Proteinen aus den Gewebeproben

Die gefrorenen Gewebeproben wurden mit Hilfe eines Homogenisators in Lysepuffer zerkleinert und bei 24652 g bei 4 °C für 20 min zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

# 2.2.8 Proteinbestimmung

Für die quantitative Proteinbestimmung wurden die Proteinlysate entsprechend der zu erwartenden Konzentration 1:300 bzw. 1:600 mit H<sub>2</sub>O bidest. verdünnt und der Farbstoff Roti-Nanoquant hinzugegeben. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration der Proben wurde eine Standardproteinreihe definierter Konzentrationen nach Angaben des Herstellers pipettiert und Roti-Nanoquant hinzugegeben. Als Standardprotein wurde Albumin Fraktion V eingesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min wurde die Farbreaktion in einem Fluoreszenzphotometer gemessen und ausgewertet.

# 2.2.9 Enzymatische Aktivitätsmessungen

Es sollte die Beteiligung der Effektorkaspasen-3 und -7 bzw. der Initiatorkaspasen-8 und -9 des Kaspase-abhängigen Weges der Apoptose an der resultierenden Organdysfunktion untersucht werden.

## 2.2.9.1 Bestimmung der Aktivität der Kaspasen-3 und -7

Diese Untersuchung beruht auf der Messung der Aktivität der Kaspasen-3 und -7 in den Proteinproben. Aufgrund der Umsetzung des hinzugegeben Substrats entstehen fluoreszierende Signale. Zur Untersuchung der Kaspase-Aktivität in den entnommenen Organen der Mäuse wurden jeweils 30 µg Protein eingesetzt. Es wurde das Kit: Apo-One Homogeneous Caspase 3/7 Assay verwendet. Nach dem Protokoll des Herstellers wurde

das Puffer/Substrat-Gemisch zum Protein hinzugegeben und die Proben lichtgeschützt 30 min auf einem Schüttler inkubiert. Danach wurden die fluoreszierenden Signale in einem Fluoreszenzphotometer bei einer Anregungswellenlänge von 490 nm und einer Emissionswellenlänge von 535 nm gemessen.

## 2.2.9.2 Messung der Aktivität der Initiatorkaspasen-8 und -9

Zusätzlich wurde die Aktivität der Kaspasen-8 und -9 in den Proteinlysaten der Organe bestimmt. Dazu wurden 30 µg Protein eingesetzt. Zur Aktivitätsmessung wurde der Apo-One Caspase-Glo 8/9 Assay verwendet, wobei nach den Anweisungen des Herstellers vorgegangen wurde. Nach einer Inkubationszeit von 30 min wurde die resultierende Lumineszenz in einem Fluoreszenzphotometer bestimmt.

# 2.2.10 Analyse der Expression von Bax und Bcl-2 mittels Western Blot

Es wurde die Expression der mitochondrialen Proteine Bax und Bcl-2 zu den Zeitpunkten 0 h, 24 h und 72 h in den Kontroll-, Sham- und HS-Tieren untersucht. Dazu wurden jeweils 60  $\mu$ g Protein der Milz, Leber, Niere (nur bei Bcl-2 Detektion) und 80  $\mu$ g Protein der Lunge, Niere (Bax Detektion) mit dem Auftragspuffer Roti-Load 1 gemischt, 5 min bei 95 °C denaturiert und auf ein denaturierendes SDS-Polyacrylamid Gel (12%iges Trenngel, 4%iges Sammelgel) aufgetragen. Als Proteinmarker wurden die Proteinmarker Rotimark Prestained oder Precision Plus Protein Standard Kaleidoscope verwendet. Nach der Gel-Elektrophorese wurde das Gel auf eine Nitrocellulose-Membran (0,2  $\mu$ m) geblottet. Der Proteintransfer erfolgte bei 120 V und 60 min mit dem Mini Protean 3 Electrophoresis System.

Nach dem Proteintransfer wurde die Membran in Blockierungspuffer A für 1 h bei Raumtemperatur geblockt und bei 4 °C mit dem primären Antikörper *Maus anti-Bcl-2* (1:300 in Blockierungspuffer A) inkubiert. Nach 3 x 5 min waschen in PBS wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper *Ziege anti-Maus* (1:5000 in Blockierungspuffer A) für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Membran mit PBS gespült. Zur Detektion wurde das Immobilon Western HRP Substrate Luminol Reagent/ Immobilon Western HRP Substrate Peroxide Solution und das Detektionsgerät LAS-3000 mit der Software Image Reader LAS-3000 verwendet. Die Membran wurde anschließend für 20 min in Puffer C bei 37 °C inkubiert, um die gebundenen Antikörper von der Membran zu entfernen. Nach dem erneuten Waschen der Membran wurde sie für 1 h in Blockierungspuffer B inkubiert, um unspezifische Bindungen abzusättigen. Nun konnte sie in analoger Weise mit dem nächsten primären Antikörper *Kaninchen anti-Bax* (1:300 bzw. 1:50

in Blockierungspuffer A bzw. B) bei 4 °C über Nacht inkubiert werden. Als sekundärer Antikörper wurde der polyklonale *Ziege anti-Kaninchen* Antikörper in der Verdünnung 1:2500 in Blockierungspuffer A oder B verwendet.

Als Ladungskontrolle wurde der *Maus anti-β-Aktin* Antikörper (1:5000 in Blockierungspuffer A oder B) benutzt.

# 2.2.11 Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebeproben

Zur Isolierung von Gesamt-RNA wurden die in RNA later gelagerten Gewebeproben der Gruppen 1-3 in jeweils 1 ml Qiazol überführt, mit Hilfe des Ultra-Turraxs homogenisiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 200 µl Trichlormethan hinzugegeben, das Homogenisat durchmischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zentrifugation bei 12000 g, 4 °C für 15 min wurde die Phasentrennung in wässriger, Interphase und organischer Phase erreicht. Da sich die Nukleinsäuren in der wässrigen Phase befinden, wurde diese abgenommen und die RNA mit Hilfe des Invisorb Spin Cell RNA Mini Kits isoliert. Die weitere Isolierung wurde in Analogie zum Protokoll des Herstellers durchgeführt.

# 2.2.12 Konzentrationsbestimmung der isolierten RNA

Für die Konzentrationsbestimmung der Gesamt-RNA wurde das Kit RNA 6000 Nano Series II verwendet, das RNA-Chips beinhaltet, in die eine Gel-Matrix, ein RNA Größenmarker (RNA 6000 Nano Series II RNA Ladder) und 12 RNA-Proben pipettiert wurden. Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Die Messung der RNA erfolgte in dem Bioanalyser 2100 mit der Software 2100 Expert.

# 2.2.13 cDNA-Synthese

Für die Umschreibung der RNA in cDNA wurde 1  $\mu$ g RNA eingesetzt. Nach der Zugabe von 2  $\mu$ l Oligo-p(dT)<sub>12-18</sub> Primern und der Inkubation von 10 min bei 75 °C wurde der Puffer A hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 37 °C und 5 min bei 75 °C wurden 200 U Mo-MLV RT und 40 U RNase-Inhibitor hinzugegeben. Dann erfolgte die cDNA-Synthese für 60 min bei 42 °C. Danach wurde die Reverse Transkriptase durch die Inkubation bei 94 °C, 5 min inaktiviert. Die Inkubationsschritte erfolgten im PCR-Cycler.

# 2.2.14 RTD-PCR

Es wurde die organ- und gewebespezifische Expression der an dem Kaspase-abhängigen Weg der Apoptose beteiligten mitochondrialen Gene *bax* und *bcl-2* untersucht. Für die RTD-PCR wurde 1 µl cDNA eingesetzt. Es wurden das Quantitect Probe PCR Kit und der für jedes Gen spezifische Quantitect Custom Assay verwendet.

Zeit	Temperatur in °C	
2 min	50	
15 min	95	
15 s	94	
30 s	56	46 Zyklen
30 s	76	

Tabelle 7: Inkubationsprotokoll der RTD-PCR

Die RTD-PCR wurden in dem DNA Engine Opticon Continuous Fluorescence Detector durchgeführt. Für die Auswertung wurde die Software Opticon Monitor verwendet. Die Berechnung der relativen Expressionen der Gene *bax und bcl-2* erfolgte nach der Formel: 2 <sup>- $\Delta$ CT</sup>, wobei sich  $\Delta$ CT= CT des untersuchten Gens – CT des  $\beta$ -Aktins berechnet.

# 2.2.15 TUNEL

Die TUNEL-Analyse wurde durchgeführt, um die Apoptose von Parenchymzellen zu einem späten Zeitpunkt zu detektieren. Die Methode dient dem Nachweis der *in situ* DNA Fragmentation. Es wurden Proben der Milz der ersten drei Tiergruppen in Tissue Tek eingebettet, in flüssigen Stickstoff gefroren und 6-8 µm Gewebe-Schnitte an einem Kryostat angefertigt und auf einen Objektträger transferiert. Für die TUNEL-Färbung wurde das Kit DeadEnd Fluorometric TUNEL System verwendet. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskopes Axioskop 40, der Digitalkamera Olympus C-4000 und der Software Alpha Digidoc.

# 3. Ergebnisse

Der HS bewirkt eine Minderdurchblutung der Organe und eine systemische Inflammation mit der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen. Aber der Blutungsschock beeinflusst nicht nur immunologische Antworten, sondern auch die Apoptose in den verschiedenen Organsystemen. Im Folgenden verdeutlichen die Ergebnisse den Einfluss des HS auf die IL-6 Konzentration im Plasma und auf das Blutbild. Einige Studien im Tiermodell weisen die Auswirkungen des Traumas und des HS auf die parenchymatöse Apoptose nach (Guan et al. 2002). Deshalb beschäftigt sich diese Arbeit mit dem Einfluss des HS auf die Apoptose in den Organen, die anhand der folgenden Untersuchungen charakterisiert wird: Aktivierung von Apoptoserezeptoren und Kaspasen, der DNA-Fragmentation, der Expression mitochondrialer Gene und der Verlagerung von Phosphatidylserin auf die Zelloberfläche.

# 3.1 Differentielle Blutbildbestimmung

Die Abbildungen 6 und 7 beinhalten zur Beurteilung des hämorrhagischen Schockzustands sowie der Dauer der resultierenden Blutbildveränderungen verschiedene Parameter der Blutbild-Analyse.





Hämoglobinkonzentration nach dem HS

Abbildung 6: Differentielle Blutbild-Analyse der Lymphozytenanzahl (A) und Hämoglobinkonzentration (B) nach dem HS in Kontroll-Tieren (weiß), Sham-Tieren (grau) und HS-Mäusen (grün). Die Ergebnisse repräsentieren vier Experimente.



Die Lymphozytenanzahl im Vollblut in den HS-Tieren nimmt nach dem HS ab, der stärkste Rückgang erfolgt zu dem Zeitpunkt t = 24 h. Die Sham-Mäuse zeigen bei den Zeitpunkten 0 h bis 72 h deutlich höhere Werte als die entsprechenden HS-Tiere (Abbildung 6 A). Sowohl in den HS-Tieren als auch in den Sham-Tieren nehmen die Hämoglobin-Konzentrationen in dem Untersuchungszeitrahmen von 0 h bis 72 h ab (Abbildung 6 B). Die Konzentrationen in ersteren liegen zu jedem Zeitpunkt deutlich niedriger als in den Sham-Tieren. Die Kontroll-Tiere besitzen eine höhere Konzentration des Blutfarbstoffes als die Sham-Tiere.



Abbildung 7: Blutbild-Analyse der Parameter Erythrozytenkonzentration (A) und Hämatokrit (B) im hämorrhagischen Schockmodell der Maus in Kontroll-Tieren (weiß), Sham-Tieren (grau) und HS-Mäusen (grün). Die Ergebnisse sind repräsentativ für vier Experimente.

Die Erythrozytenkonzentration in der Abbildung 7 A fällt infolge des HS in den HS-Tieren von 0 h bis 72 h kontinuierlich ab. Die Werte der Sham-Tiere liegen deutlich höher als die der HS-Tiere, zeigen aber auch im Verlauf der Zeitkinetik eine Abnahme der Erythrozytenkonzentration. Die Kontroll-Tiere besitzen eine hohe Anzahl an Erythrozyten. Die Sham- und HS-Tiere weisen eine Abnahme der Hämatokrit-Konzentration über den betrachteten Zeitraum nach. Die Hämatokrit-Werte in den HS-Tiere weisen eine Zeitpunkt 0 h bis 72 h von 39 % auf 26 %. Die Daten der Sham-Tiere weisen eine im Verlauf des Experiments geringfügige Abnahme des Hämatokrits auf, wobei zu dem Zeitpunkt 0 h Werte gemessen werden, die denen der Kontroll-Tiere entsprechen (Abbildung 7 B).



Abbildung 8: (A) Lymphozyten- und (B) Hämoglobinkonzentration nach dem HS in Kontroll-Tieren (weiß), Sham-Tieren (grau) und HS-Mäusen (grün). Die Ergebnisse repräsentieren vier Experimente.

Die Abbildung 8 verdeutlicht, dass sich die Anzahl der Lymphozyten und die Hämoglobinkonzentration im Blut 14 Tage nach der Operation wieder normalisiert haben. Bei beiden Parametern entsprechen die Werte in den HS-Mäusen schon 7 Tage nach dem HS dem Ergebnis der Kontroll-Tiere. Aber die Sham-Tiere weisen eine geringere Lymphozyten- und Hämoglobinkonzentration auf. Dieses deutet auf kleinere lokale Blutungen während der Präparation der *Arteria femoralis* hin.



Abbildung 9: Differentielle Blutbildanalyse mit den Parametern A) Hämatokrit- und B) Erythrozytenkonzentration im HS-Modell der Maus. Kontroll-Tiere (weiß), Sham-Tiere (grau) und HS-Mäuse (grün). Die Ergebnisse repräsentieren vier Experimente.

Die Abbildung 9 beinhaltet, dass in den HS-Tieren die Blutwerte wie z. B. die Erythrozytenanzahl und die Hämatokritkonzentration nach 7 Tagen wieder Normalwerte erreichen. Lediglich die Sham-Tiere weisen zu diesem Zeitpunkt noch geringere Werte der untersuchten Parameter im Blutbild auf als die Kontroll-Tiere.

# 3.2 IL-6 Konzentration im Blut



Sekretion des proinflammatorischen Interleukin-6

Abbildung 10: IL-6 Konzentration im Plasma in den HS-, Sham- und Kontroll-Tieren nach dem HS. Es wurde die Konzentration des Zytokins in den HS-Mäusen zusätzlich als grüne Trendlinie und die Werte der Sham-Tiere als graue Linie gezeigt. Die Ergebnisse repräsentieren drei Experimente.



Die Insertion des Mikrokatheters und die Präparation der *Arteria femoralis* beiderseits bewirken in den Sham-Tieren zu dem Zeitpunkt t = 24 h einen Anstieg der IL-6-Konzentration im Plasma, die 72 h wieder geringer wird. In den HS-Tieren wird 24 h nach dem Schockzustand eine sehr starke Konzentration des Zytokins gemessen, die zu dem letzten Zeitpunkt wieder Normalwerte erreicht.

# 3.3 Annexinfärbung auf murinen T-Lymphozyten der Milz

Für die Analysen der Apoptose wurde die Verlagerung von Phosphatidylserin von der zytoplasmatischen Seite der Zellen auf die extrazelluläre Seite gemessen. Diese Verlagerung ist ein Merkmal der frühen Apoptose. Die Untersuchungen erfolgen in einer Färbung und Inkubation mit Annexin V, das sich an das Phosphatidylserin anlagert. In der Abbildung 11 wurden die CD3- und Annexin V-positiven T-Lymphozyten nach der Induktion des HS aufgetragen. Es wurden dabei Ergebnisse der HS-Mäuse, Sham- und Kontroll-Tiere verwendet. Die nachfolgende Abbildung 11 verdeutlicht, dass in den HS-Tieren zu dem Zeitpunkt t = 24 h eine im Vergleich zu der Kontrolle hohe Anzahl an Annexin V-positiven T-Zellen nachzuweisen ist. Die Sham-Tiere zeigen zu dem entsprechenden Zeitpunkt ein Ergebnis, das sich nicht von demjenigen der Kontroll-Tiere unterscheidet. Zu den Zeitpunkten 0 h und 72 h weisen die hämorrhagischen Tieren Werte auf, die leicht gegenüber den Kontroll-Tieren erhöht sind.



Abbildung 11: Analyse der frühen Apoptose in T-Lymphozyten der Milz nach dem HS durch Inkubation mit Annexin V. Dargestellt sind die Ergebnisse zu den Zeitpunkten 0 h, 24 h, 72 h nach der Induktion des Schocks in den HS-Tieren (grüne Balken), Sham-Tieren (graue Säulen) und den Kontroll-Mäusen (weißer Balken). Für dieses Experiment wurden jeweils fünf Mäuse verwendet (n = 5).

# 3.4 Nachweis der DNA-Fragmentation anhand der TUNEL-Methode

Die TUNEL-Methode dient dem Nachweis der *in situ* DNA-Fragmentationen. Bei der fortgeschrittenen Apoptose entstehen diese z. B aufgrund der Kaspase-aktivierten DNase CAD.



Kontrolle





HS 0 h

HS 24 h

HS 72 h

Abbildung 12: Nachweis der *in situ* DNA-Fragmentation 0 h, 24 h und 72 h nach dem HS mit der TUNEL-Methode. Es wurden 6 µm Kryoschnitte der Milz angefertigt und angefärbt. Alle gezeigten Abbildungen wurden in der Vergrößerung 400x angefertigt.

Die HS-induzierten DNA-Fragmentationen in der Milz stellt die Abbildung 12 dar. In der Abbildung 12 weisen die Sham-Mäuse bei 0 h und 72 h eine gegenüber den Kontroll-Tieren erhöhte DNA-Fragmentation auf, bei 24 h eine nur geringfügig höhere.

Die HS-Tiere zeigen wesentlich höhere Apoptoseraten als die Sham-Tiere des entsprechenden Zeitpunktes. Bei den hämorrhagischen Mäusen findet eine bei 0 h und 72 h gegenüber der Kontrolle stark erhöhte DNA-Fragmentation statt.

# 3.5 Analyse des extrinsischen Signalweges der Apoptose

Die Analysen untersuchen die Beteiligung des extrinsischen Signalweges an der Apoptose in T-Zellen, die aus der Milz isoliert wurden, nach Induktion des HS. Dabei wurde die Expression der Todesrezeptoren TNF-Rezeptor I (CD120α) und Fas-Rezeptors (CD95) auf den Zelloberflächen der T-Zellen analysiert. Die Untersuchungen befassen sich zusätzlich mit den T-Zellensubpopulationen zytotoxische T-Zellen (CD8-positive Zellen) und T-Helferzellen (CD4-positive Zellen).

Dieser Ergebnisteil enthält die Daten der Durchflusszytometrie sowohl in Form von Abbildungen, die die Ergebnisse von drei Mäusen in einer Gruppe bzw. Zeitpunkt zusammenfassen, als auch als Histogramme, die die Expression des TNF-Rezeptors darstellen. Letztere zeigen jeweils das Ergebnis eines Tieres stellvertretend für die Daten der untersuchten Mäuse. Bei den abgebildeten Histogrammen wurden die Kurvenverläufe der Isotyp-Kontrollen mit dem Graphen des untersuchten Todesrezeptors überlagert. Die Überlagerung wurde mit dem Computerprogramm FlowJo erstellt.

## 3.5.1 Expression des TNF-Rezeptors I auf T-Lymphozyten

Die Expression des TNF-Rezeptors I auf der Zelloberfläche der T-Lymphozyten der Milz in der Durchflusszytometrie repräsentieren die Abbildungen 14 A bis C. Aufgrund der heterogenen Funktion wurden neben der Gesamtpopulation auch zytotoxische CD8<sup>+</sup> und Tuntersucht. Die Abbildungen 13 A und B verdeutlichen Helferzellen CD4<sup>+</sup> die Vorgehensweise bei der Auswertung der T-Lymphozyten der Milz in der Durchflusszytometrie.



Abbildung 13: Gating Strategie zur Auswertung der FACS-Analysen. In der Abbildung A wurden die Zellen der Kontroll-Tiere abhängig von ihrer Größe (FSC) und Granularität (SSC) aufgetragen und die T-Lymphozyten in einem Lymphogate (ovale Begrenzung) eingegrenzt. Die Abbildung B beinhaltet die weitere Strategie bei der Auswertung. Es wurden die CD3-positiven Zellen (Quadrat) gegen den FSC aufgetragen. Diese Strategie wurde sowohl bei der Auswertung der Ergebnisse der HS- und Sham-Tiere als auch analog bei den CD4- und CD8-positiven Zellen angewendet. Die Abbildung C beinhaltet die Anzahl an CD3- und CD120α-positiven T-Zellen von einem Kontroll-Tier, wobei die Isotypkontrolle als grüne und der Rezeptor als rote Kurve dargestellt wurde.

Die Splenozyten wurden anhand ihrer Größe und Granularität aufgetragen. Für die weitere Auswertung wurden die Anzahl der CD3-positiven Zellen bestimmt, indem sie gegen den FSC aufgetragen wurden. Die Abbildung 13 C enthält, dass in den Kontroll-Tieren nur 1 % der CD3-positiven T-Lymphozyten den TNF-Rezeptor exprimieren.



#### **Expression des TNF-Rezeptors I**

Abbildung 14 A-C: Analyse der Expression des Todesrezeptors TNF-R I auf den T-Zellen und deren Subpopulationen der Milz nach dem HS. Die Abbildung A stellt die Expression auf den CD3-positiven T-Zellen, B die Situation auf den T-Helferzellen und bei C die auf den zytotoxischen T-Zellen dar. Es wurden für dieses Experiment drei Mäuse für jede Gruppe bzw. Zeitpunkt verwendet.

Die Abbildung 14 zeigt in den HS-Mäusen bei den CD3-, CD4- und CD8-positiven T-Zellen zu den Zeitpunkten t = 0 h und 72 h eine Hochregulation des TNF-Rezeptors. Aber 24 h nach der Induktion des HS findet sowohl in der Gesamtpopulation der T-Lymphozyten als auch in den CD4- und CD8- doppelt positiven T-Lymphozyten eine Expression statt, die denen der Sham-Tiere entspricht. Letztere weisen eine nur gering erhöhte oder sogar eine vergleichbare Expression gegenüber der Kontrolle auf.

### Splenozyten



Abbildung 15: Analyse des TNF-Rezeptors I in T-Lymphozyten der Milz in Kontroll-Tieren. Dargestellt werden in A die CD120 $\alpha$ -positiven T-Helferzellen, während in B die CD120 $\alpha$ -positiven zytotoxischen T-Zellen gezeigt sind. Der grüne Kurvenverlauf zeigt die Isotypkontrolle und der rote den Rezeptor. Die Histogramme repräsentieren drei unabhängige Experimente.

Die Abbildung 15 beinhaltet die CD120α-positiven T-Helferzellen sowie die CD120αpositiven zytotoxischen T-Zellen der Kontroll-Tiere in Histogrammen. Bei der Auswertung der Daten wurde die Gating Strategie angewendet, die in der Abbildung 13 anhand der CD3positiven T-Zellen der Kontroll-Mäuse beschrieben wurde. Die Histogramme zeigen repräsentativ, dass 2 % der T-Helferzellen und 1 % der zytotoxischen T-Zellen den TNF-Rezeptor I exprimieren.





Expression des CD120a Rezeptors in der Milz

Abbildung 16: Expression des extrinsischen CD120 $\alpha$  Todesrezeptors in der Milz nach dem HS. Dargestellt ist die Anzahl der CD3- und CD120 $\alpha$ -positiven T-Zellen in HS- und Sham-Tieren in der Zeitkinetik 0 h, 24 h und 72 h. Der grüne Graph zeigt die Isotypkontrolle und der rote den Rezeptor. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch von dreien.





# Expression des CD120 $\alpha$ Rezeptors in der Milz

Abbildung 17: Expression des extrinsischen CD120 $\alpha$  Todesrezeptors in der Milz nach dem HS. Dargestellt ist die Anzahl der CD4- und CD120 $\alpha$ -positiven T-Zellen in HS- und Sham-Tieren in der Zeitkinetik 0 h, 24 h und 72 h. Der grüne Graph zeigt die Isotypkontrolle und der rote den Rezeptor. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch von dreien.



### Expression des CD120a Rezeptors in der Milz

Abbildung 18: Expression des extrinsischen CD120 $\alpha$  Todesrezeptors in der Milz nach dem HS. Dargestellt ist die Anzahl der CD8- und CD120 $\alpha$ -positiven T-Zellen in HS- und Sham-Tieren in der Zeitkinetik 0 h, 24 h und 72 h. Der grüne Graph zeigt die Isotypkontrolle und der rote den Rezeptor. Die Histogramme repräsentieren drei von einander unabhängige Experimente.

Die Abbildung 16 repräsentiert die Histogramm-Daten 0 h, 24 h und 72 h nach dem HS. Die HS-Tiere besitzen einen prozentualen Anteil an CD3- und CD120 $\alpha$ - positiven T-Zellen von 4 % und 9 % zu den Zeitpunkten t = 0 h und 72 h. Beim Zeitpunkt t = 24 h findet eine geringere Expression des Todesrezeptors als bei 0 h nach dem HS statt. Die Abbildung veranschaulicht, dass CD120 $\alpha$  auf CD3 T-Zellen der Milz in den Sham-Tieren geringfügig erhöht ist oder auf Kontrollniveau verbleibt.

Die Abbildung 17 beinhaltet die Anzahl der CD4- und CD120 doppelt positiven T-Zellen in den HS- und den Sham-Mäusen, wobei die Daten der Sham-Tiere den Werten der Kontroll-Tiere entsprechen. Die HS-Tiere besitzen 72 h nach der Operation eine verstärkte Expression des Rezeptors. Die Abbildung 18 zeigt die Expression des CD120α Proteins repräsentativ in den Sham- und HS-Tieren in der bereits genannten Zeitkinetik. Die Histogramme stellen den prozentualen Anteil der CD120-positiven zytotoxischen T-Zellen der Milz dar. Die hämorrhagischen Mäuse weisen im Gegensatz zu den Sham-Tieren zu den Zeitpunkten 0 h und 72 h Werte von 6,2 und 6,9 % auf, während erstere zu dem Zeitpunkt 24 h nur 2 % aufweisen. Es findet in den Sham-Tieren eine Expression des Rezeptorproteins von 1,4 bis 2 % in den zytotoxischen T-Zellen ähnlich wie in den CD3- und CD120α doppelt positiven T-Zellen statt.

## 3.5.2 Expression des Fas-Rezeptors auf T-Lymphozyten

Zusätzlich zu der Expression des TNF-Rezeptors I wurde noch die Expression des Fas-Rezeptors auf der Zelloberfläche der T-Lymphozyten analysiert. Diese Untersuchungen geben Aufschluss darüber, ob die extrinsische Apoptose der Lymphozyten über den Fas-Rezeptor vermittelt abläuft. Die Abbildungen 19 A bis C veranschaulichen die Expression des CD95 Proteins in den verschiedenen Populationen der T-Lymphozyten.



Abbildung 19: Expression des CD95 Proteins auf T-Lymphozyten nach dem HS in (A) CD3positiven, in (B) in T-Helferzellen (zusätzlich CD4-positiv) und (C) in zytotoxischen T-Lymphozyten (zusätzlich CD8-positiv) der Milz. Die Werte der HS-Mäuse (grüne Balken) werden denjenigen der Sham-Tiere (graue Säulen) und der Kontroll-Tiere (weiße Balken) gegenübergestellt. Es wurden pro Gruppe und Zeitpunkt drei Tiere verwendet.

Die Expression des Rezeptors in der Abbildung 19 A in den Lymphozyten der Milz unterscheidet sich in den HS-Tieren zu den Zeitpunkten 0 h und 72 h nicht von den Werten der Kontroll-Mäuse bzw. den Sham-Tieren. Lediglich 24 h nach dem HS findet eine gegenüber den Kontroll-Tieren geringere Expression des CD95 Proteins in der Gesamtpopulation der CD3-positiven T-Lymphozyten statt. Die Expression des CD95 Proteins der Sham-Tiere entspricht denen der Kontroll-Tiere.

Die Abbildungen 19 B und C zeigen die Ergebnisse in den T-Helferzellen bzw. in den zytotoxischen T-Lymphozyten in der Zeitkinetik 0 h, 24 h und 72 h nach der Beendigung des HS. Insgesamt verdeutlichen die Abbildungen sowohl bei den hämorrhagischen Mäusen als auch bei den Sham-Tieren einander sehr ähnliche Kurvenverläufe. Die Expression des Fas-Rezeptors wird in beiden Subpopulationen bei den HS-Tieren über den gesamten Untersuchungszeitraum gegenüber den Kontroll-Tieren hinunterreguliert, während die Werte der Sham-Tiere auf Kontrollniveau verbleiben. Zu den untersuchten Zeitpunkten weisen die Sham-Tiere Werte auf, die höher sind als diejenigen der vergleichbaren HS-Tiere.



### Expression des Fas-Rezeptors in den T-Zellen der Kontroll-Tiere in der Milz

Abbildung 20: Expression des extrinsischen Fas-Rezeptors in T-Zellen der Kontroll-Tiere im hämorrhagischen Schockmodell der Maus. Es sind repräsentativ die Histogramme abgebildet, die die Expression des Rezeptorproteins in CD3-positiven T-Zellen (A), in T-Helferzellen (B) bzw. in zytotoxischen T-Zellen (C) beinhalten. Der grüne Kurvenverlauf bezeichnet die Isotypkontrolle und die rote Kurve die CD95 Proteinexpression.

Es werden in den drei Histogrammen der Abbildung 20 die Splenozyten von Kontroll-Tieren gezeigt. Die Abbildung 20 A beinhaltet die Expression des Fas-Rezeptors in den CD3-T-Zellen in der Milz. Die Abbildung 20 B symbolisiert die Anzahl der CD4- und CD95positiven T-Zellen der Splenozyten in den Kontroll-Tieren im hämorrhagischen Schockmodell der Maus. Die Expression des CD95 Proteins liegt bei dieser Subpopulation der T-Lymphozyten bei 1 %. Es exprimieren 4 % der CD8-positiven Zellen das CD95 Protein (Abbildung 20 C).

## Expression des Fas-Rezeptors in der Milz

Die Tabelle 8 beinhaltet die Expression des Fas-Rezeptors in der Milz in den HS- und Sham-Tieren in der Zeitkinetik 0 h, 24 h und 72 h nach der Operation. In den HS-Tieren steigt die Expression des Fas-Rezeptors in den T-Helferzellen von 0 h bis nach 72 h an, während sich in den Sham-Tieren die Expressionsstärke nicht verändert. Anders sieht es in den CD3- und CD95-positiven Zellen aus. Die Anzahl dieser Zellen ist in den HS-Tieren von 0 h bis 72 h leicht gegenüber der Kontrolle erhöht, während die Expression des Rezeptors in den Sham-Tieren auf dem Niveau der Kontroll-Tiere verbleibt. In den zytotoxischen T-Zellen erfolgt in den HS-Tieren eine gegenüber der Kontrolle stark erhöhte Expression des Fas-Rezeptors, denn sie liegt zwischen 7 % und 10 %.

Tabelle 8: Expression des Fas-Rezeptors in T-Lymphozyten der Milz nach dem HS. Das Experiment ist repräsentativ für drei Experimente.

	HS-Tiere	Sham-Tiere	Zeitkinetik in h
Anzahl der CD3⁺ CD95⁺ Zellen	5	3	0 h
	4,5	3	24 h
in %	5,4	5	72 h
Anzahl der CD4⁺ CD95⁺ Zellen	5	3,6	0 h
	6	3,9	24 h
in %	7,8	3,7	72 h
Anzahl der CD8⁺ CD95⁺ Zellen	7	9,7	0 h
	9,8	3,7	24 h
in %	7,5	3,8	72 h

# 3.6 Analyse der HS-induzierten Apoptose parenchymatöser Organe

Die gewebespezifische Apoptose wurde nach dem HS zu den Zeitpunkten 0 h, 24 h und 72 h in den parenchymatösen Organen anhand der Kaspase-Aktivität bestimmt.

# 3.6.1 Aktivität der Kaspasen-3 und -7

In den Untersuchungen wurden die enzymatischen Aktivitäten der Effektorkaspasen-3 und -7 in den Proteinlysaten der Leber, Lunge, Milz und Niere nach Induktion des HS gemessen. Die Aktivitäten dieser Kaspasen in dem Kaspase-abhängigen Weg der Apoptose zeigen, in welchem Ausmaß die Apoptose in den Parenchymzellen der untersuchten Organe induziert wird.

8000

6000

4000

2000

0

В

RFU







Ko 0h 0h 24h 24h 72h 72h

Zeit in h

Kaspasen-3 und -7 in der Lunge

\*



Abbildung 21: Gewebespezifische Aktivität der Kaspasen-3 und -7 nach hämorrhagischen Schock. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Kaspase-Aktivität 0 h, 24 h und 72 h nach Beendigung der HS-Operation in den HS-Tieren (grün) im Unterschied zu den Sham-Tieren (grau) und Kontroll-Tieren (weiß). Es wird die Kaspase-Aktivität in der Leber A), in der Lunge B), in der Milz C) und in der Niere D) gezeigt. Die Kaspase-Aktivitäten von 5 Mäusen pro Gruppe und Zeitpunkt wurden ausgewertet (n = 5).

Die Abbildung 21 A zeigt die Aktivität der Kaspasen-3 und -7 in der Leber. Die Aktivität der beiden Effektorkaspasen in den HS-Tieren nimmt von 0 h nach 72 h ab, wobei die maximale relative Fluoreszenzeinheit bei 0 h bei einem Wert von 6500 liegt. Die entsprechende Kaspase-Aktivität in der Leber der Sham-Tiere ist zu jedem Zeitpunkt geringer als bei den HS-Tieren, jedoch nicht zu jedem Zeitpunkt gegenüber den Kontroll-Tieren erhöht. Die Abbildung 21 B stellt die Kaspase-Aktivität der Effektorkaspasen in der Lunge dar. Die Kaspase-Aktivitäten in den HS-Tieren beschreiben im Gegensatz zu den Sham-Tieren einen biphasischen Verlauf von 0 h über 24 h nach 72 h, wobei bei 0 h und 72 h die maximalen Aktivitäten zeigen eine relative Fluoreszenz von 3800. Die Sham-Tiere weisen dagegen Kaspase-Aktivitäten auf, die denen der Kontroll-Tiere entsprechen.

Die Abbildung 21 C beinhaltet die Aktivität der Kaspasen-3 und -7 in den Proteinlysaten der Milz, die in den HS-Tieren ähnlich wie in der Lunge einen biphasischen Kurvenverlauf mit maximalen Werten bei 0 h und 72 h beschreibt, während die minimale Aktivität bei 24 h liegt. Die enzymatische Aktivität in den Proteinen der Milzzellen der Sham-Tiere liegt unterhalb der Werte der Kontroll-Tiere. Die Abbildung 21 D enthält die Aktivität der untersuchten Effektorkaspasen in den Proteinen aus der Niere, wobei in den HS-Tieren zu dem Zeitpunkt t = 0 h eine maximale relative Fluoreszenz von 4000 zu erkennen ist. Die Kaspase-Aktivitäten der Sham-Tiere als auch der übrigen Zeitpunkte der HS-Tiere sind geringer als diejenigen der Kontrolltiere. Die Kontroll-Tiere zeigen eine relative Fluoreszenz von 2000.

## 3.6.2 Parenchymatöse Kaspase-8-Aktivitäten

Es wurde die enzymatische Aktivität der Initiatorkaspase-8 in Proteinlysaten der Leber, Lunge, Milz und Niere untersucht.





Abbildung 22: HS-induzierte Aktivität der Initiatorkaspase-8 in der Leber (A), in der Lunge (B), Milz (C) und Niere (D) zu den Zeitpunkten t = 0 h, 24 h, 72 h nach hämorrhagischen Schock. Die enzymatische Aktivität in den HS-Tieren (grün) ist im Vergleich zu den Kontroll-Tieren (weiß) und den Sham-Tieren (grau) dargestellt. Es wurden fünf Mäuse pro Zeitpunkt und Gruppe untersucht (n= 5).

Sham

HS

Die Abbildung 22 A beinhaltet die Aktivität der Initiatorkaspase-8 in murinen Hepatozyten. In den HS-Tieren verringern sich die enzymatischen Aktivitäten von t = 0 h bis 72 h. Die Sham-Tiere besitzen dabei jeweils geringere Werte als die entsprechenden der hämorrhagischen Mäuse. In den Hepatozyten zeigt die Aktivierung der Initiatorkaspase-8 einen vergleichbaren Kurvenverlauf über den untersuchten Zeitraum von 72 h wie die Aktivitäten der Effektorkaspasen-3 und -7. Die Abbildung 22 B beschreibt die Aktivierung der Initiatorkaspase in Proteinen der Lunge. Die Werte der HS-Tiere repräsentieren einen biphasischen Kurvenverlauf, wobei die maximale Aktivierung bei den Zeitpunkten 0 h und 72 h liegt. Zu dem Zeitpunkt t = 24 h nach der Beendigung der HS-Operation findet eine minimale Aktivierung statt. Die Werte der Sham-Tiere zeigen eine im Verlauf der betrachteten Zeitkinetik abnehmende Aktivität der Initiatorkaspase-8.

Die Abbildung 22 C beinhaltet die Aktivierung der Kaspase-8 in murinen Splenozyten. In den HS-Tieren bildet sie einen biphasischen Kurvenverlauf ab, bei dem die beiden maximalen Aktivitäten bei t = 0 h und t = 72 h nach der Reinfusion nach dem HS liegen. Die Kaspase-Aktivitäten der Sham-Tiere zeigen einen ähnlichen Verlauf mit jeweils niedrigeren Werten. Die Sham-Tiere besitzen zu dem Zeitpunkt t = 72 h eine wesentlich geringere Aktivität als die HS-Tiere. Die Abbildungen 21 C und 22 C stellen einen biphasischen Kurvenverlauf der Aktivitäten der Kaspasen-3, -7 und -8 in der Milz dar, wobei in der Abbildung 21 C beide maximalen Aktivitäten fast die gleichen Fluoreszenzwerte aufweisen.

Die Abbildung 22 D beschreibt die Aktivität der erwähnten Initiatorkaspase des Rezeptorvermittelten Signalweges der Apoptose in der Niere. Die Kaspase-8 zeigt bei den HS-Tieren eine hohe Aktivität zu dem Zeitpunkt t = 0 h, eine geringe bei 24 h und eine wieder ansteigende bei 72 h. Die Werte der Sham-Tiere sind stets geringer als die entsprechenden der hämorrhagischen Tiere.

# 3.6.3 Organspezifische Aktivität der Initiatorkaspase-9

Es wurde die Aktivierung der Kaspase-9 in der Leber, Lunge, Milz und Niere nach dem HS untersucht. Die Stärke der enzymatischen Aktivität in den verschiedenen Organen zeigt, ob und in welchem Ausmaß der mitochondrial-vermittelte Signalweg der Apoptose beteiligt ist. Die Experimente weisen nach, wie stark apoptotisch die betrachteten Gewebe aufgrund der immunologischen Antwort auf den HS sind.



Abbildung 23: Aktivierung der Kaspase-9 in der Leber (A), in der Lunge (B), Milz (C) und Niere (D) nach dem HS zu den Zeitpunkten t = 0 h, 24 h und 72 h. Die Aktivität dieser Initiatorkaspase in den HS-Tieren

wurde als grüne Säule dargestellt, während diejenige der Sham-Tiere grau und die der Kontroll-Tiere weiß abgebildet wurde. Es wurden n = 5 Tiere für diese Untersuchungen verwendet.

HS

Die Abbildung 23 A weist die Aktivierung der Initiatorkaspase-9 nach dem HS in den Hepatozyten nach. In den HS-Mäusen bleibt die Aktivität der Kaspase im gesamten Untersuchungszeitraum auf einem konstant hohen Wert. In den HS-Tieren ist die enzymatische Kaspase-Aktivität gegenüber den Kontroll-Tieren und auch den Sham-Tieren stark erhöht. Dieses trifft für jeden untersuchten Zeitpunkt zu. Sowohl die Enzym-Aktivierung der HS-Tiere als auch diejenigen der Sham-Tiere weisen jeweils untereinander ähnliche Werte auf.

Die Abbildung 23 B zeigt die Aktivierung der Kaspase-9 im Lungengewebe mit einem biphasischen Kurvenverlauf in den HS-Tieren mit hohen Werten bei 0 h und 72 h. Die Sham-Tiere dagegen besitzen von 0 h bis 72 h gleichmäßig abfallende Werte. Allerdings liegt die enzymatische Aktivität bei diesen Mäusen bei dem zuletzt untersuchten Zeitpunkt unterhalb des Wertes der Kontroll-Tiere.

Die Abbildungen 23 C und D beinhalten die Umsatzrate mit der die Kaspase-9 die Substrate in dem Test spaltet. Die Ergebnisse des lymphatischen Organs (Milz) und des parenchymatösen Organs (Niere) stellen die Abbildungen 23 C und D dar. In beiden erwähnten Abbildungen liegt in den HS-Mäusen ein biphasischer Verlauf mit den hohen Werten jeweils bei 0 h und 72 h vor. 24 h nach dem HS befindet sich sowohl bei der Niere als auch bei der Milz ein Minimum der Umsetzungsleistung. Die Kaspase-Aktivitäten der Niere weisen im Unterschied zu denen der Milz die zweifache Aktivität auf.

In der Milz, Niere und Lunge der HS-Tiere weisen die untersuchten Initiator- und Effektorkaspasen jeweils maximale Werte bei 0 h und 72 h auf, aber bei 24 h minimale Werte.

Bei den Untersuchungen in den Hepatozyten sieht es anders aus. Dort nimmt die HSinduzierte Aktivität der Kaspasen-3, -7 und -8 in dem betrachteten Untersuchungszeitraum von 0 h bis 72 h ab. Bei der Kaspase-9 in den hämorrhagischen Mäusen dagegen bleibt die Aktivität dieser Protease über den gesamten Zeitraum gleichbleibend hoch.

# 3.7 Analysen zur Genexpression mitochondrialer Gene

Es wurde die gewebe- und organspezifische Expression der mitochondrialen Gene *bax* und *bcl-2* in der Zeitkinetik 0 h, 24 h und 72 h nach dem HS untersucht, da die entsprechenden Proteine an der Regulierung des intrinsischen Signalweges der Apoptose beteiligt sind. Die Expression dieser Gene zeigt, ob die Apoptose nach dem HS über den intrinsischen Weg abläuft. Bei dieser PCR wird ein organspezifisches Expressionsmuster des Gens im Verhältnis zu dem des ubiquitären Haushaltsgens  $\beta$ -Aktin gesetzt.

# 3.7.1 Untersuchungen zur Genexpression des *bcl-2*



BCL2-Expression in der Milz





**BCL-2 Expression in der Lunge** 

BCL-2 Expression in der Niere



Abbildung 24 A-D: HS-induzierte organspezifische Expressionsmuster des mitochondrialen *bcl-2* in den verschiedenen Organen in der Zeitkinetik 0 h, 24 h, 72 h. Dargestellt ist die relative Expression von *bcl-2* in der A) Leber, B) Lunge, C) Milz und D) Niere. Die grünen Balken stellen die Ergebnisse der HS-Tiere, die grauen die der Sham-Tiere und die weißen Balken verdeutlichen die Werte der Kontroll-Tiere. Es wurden drei Mäuse pro Gruppe und Zeitpunkt für dieses Experiment verwendet.



Die Abbildungen 24 A-D stellen die gewebespezifische Expression des mitochondrialen Gens *bcl-2* dar. Die cDNAs der untersuchten experimentellen Tiergruppen zeigen nach der Amplifikation und Detektion in den Abbildungen eine abnehmende Expression des *bcl-2* von 0 h bis 72 h in der Leber, Lunge und Milz in den HS-Mäusen. Dieses Expressionsmuster wird in der Niere nicht so deutlich, da zum Zeitpunkt 72 h die Expression minimal gegenüber dem Zeitpunkt 24 h erhöht ist.

Die Abbildungen veranschaulichen, dass zum Zeitpunkt t = 0 h in den HS-Mäusen stets höhere Werte zu sehen sind als bei den vergleichbaren Sham-Tieren. Die Abbildung 24 A beinhaltet, dass nicht nur in den HS-Tieren die Expression in dem Untersuchungszeitrahmen gleichmäßig abnimmt, sondern auch in den Sham-Tieren. Die Abbildungen 24 B bis D repräsentieren in den Sham-Tieren zu dem Zeitpunkt 24 h eine höhere relative Expression als zu dem Zeitpunkt t = 0 h. Nach dem HS nimmt die Expression von *bcl-2* ausgehend von 0 h bis nach 72 h ab, wobei allerdings bei den Organen unterschiedlich hohe relative Expressionsraten des *bcl-2* zu finden sind. Die geringsten Werte beinhaltet die Abbildung 24 A, während die höchsten in der Milz dargestellt werden. In der Leber findet zu jedem untersuchten Zeitraum eine nur sehr geringe Synthese an *bcl-2* Transkripten statt, womit eine geringfügige Proteinsynthese des antiapoptotischen Proteins verbunden ist.

## 3.7.2 HS-induzierte Genexpression des mitochondrialen bax

Zusätzlich zu den beschriebenen Untersuchungen wurde die Konzentration der Transkripte des *bax* in der RTD-PCR in den Gewebeproben der Leber, Lunge, Milz und Niere der ersten drei Gruppen analysiert. Die Bestimmung der Genexpression ist wichtig, da nach der Translation das Protein Bax proapoptotisch wirkt und neben Bcl-2 eine bedeutende Funktion in der Induktion und Regulation der Apoptose besitzt. Die Abbildungen 25 A-D beschreiben die Ergebnisse.



Abbildungen 25 A-D: Expression des mitochondrialen Gens *bax* in den Organen A) Leber, B) Lunge, C) Milz und D) Niere zu den Zeitpunkten 0 h, 24 h, 72 h in den HS-Tieren (grüne Balken), Sham-Tieren (graue Säulen) und den Kontroll-Mäusen (weißer Balken). Für dieses Experiment wurden jeweils drei Mäuse verwendet (n = 3).

Die Abbildung 25 A enthält die Konzentration der Transkripte des *bax* in den Hepatozyten. In dieser und in der Abbildung 25 B, die die Expression in dem Lungengewebe zeigt, bestehen in den HS-Tieren keine wesentlichen Unterschiede sowohl in der Zeitkinetik untereinander als auch zu der Expression der Kontroll- oder Sham-Tiere. Nur zu dem Zeitpunkt t = 72 h in den Sham-Tieren beinhaltet die Abbildung 25 B eine höhere Transkriptionsleistung. Anders sieht es in der Abbildung 25 C aus, in der die Expression des *bax* in den Splenozyten aufgetragen ist.

In den HS-Tieren findet ein starker Anstieg der Genexpression von 0 h nach 24 h und eine Abnahme zu dem zuletzt untersuchten Zeitpunkt statt. In den Sham-Tieren beinhaltet die Abbildung die identische Tendenz, aber die relative Expression liegt bei den ersten beiden Zeitpunkten deutlich unter den Werten der entsprechenden HS-Tiere. Der letzte Zeitpunkt der Zeitkinetik symbolisiert eine leicht erhöhte Expression gegenüber den HS-Tieren. Die Kontroll-Tiere weisen eine nur geringe relative Transkription des mitochondrialen Gens *bax* auf. Die Abbildung 25 D verdeutlicht die Expression des *bax* in der Niere. In den HS-Tieren zeigt sich zu dem Zeitpunkt t = 72 h eine gegenüber der Kontrolle erhöhte Genexpression. Innerhalb der HS-Mäuse steigt die relative Expressionsrate von 0 h bis 72 h deutlich an, wobei bei dem Zeitpunkt t = 24 h allerdings eine leichte Abnahme zu sehen ist. In den Sham-Tieren zeigt sich bei dem ersten Untersuchungszeitpunkt im Vergleich zu dem zweiten eine geringere Genexpression. Die relative Expression nimmt bei dem Zeitpunkt t = 72 h wieder ab.

# 3.8 HS-induzierte Expression des Bcl-2 auf Proteinebene



Abbildung 26: Exemplarisches Beispiel der Western Blot-Analysen zur Expression des mitochondrialen Bcl-2 nach dem HS in Kontroll-Tieren, Sham- und HS-Tieren. Die Untersuchungen zeigen die Proteinexpression in A) der Milz und B) der Leber. Das Haushaltsgen  $\beta$ -Aktin wurde als interne Kontrolle verwendet. Die Ergebnisse repräsentieren drei Mäuse pro Gruppe.



В

Abbildung 27: Exemplarisches Beispiel der Western Blot-Analysen zur Expression des mitochondrialen Bcl-2 nach dem HS in Kontroll-Tieren, Sham- und HS-Tieren. Die Untersuchungen zeigen die Proteinexpression in A) der Niere und B) der Lunge. Das Haushaltsgen  $\beta$ -Aktin wurde als interne Kontrolle verwendet. Die Ergebnisse repräsentieren drei Mäuse pro Gruppe.
Im Abschnitt 3.7.1 wurde die Expression des mitochondrialen Gens *bcl-2* nach dem HS in den verschiedenen Organen näher untersucht. Zusätzlich zu den Daten, die auf der RTD-PCR basieren, werden in diesem Abschnitt Ergebnisse gezeigt, die die Quantität und funktionelle Struktur von Bcl-2 in der Leber, Lunge, Milz und Niere auf Proteinebene über Western Blot nachweisen.

Die Abbildungen 26 und 27 demonstrieren die Expressionsintensitäten des Bcl-2 Proteins in der Milz und Leber bzw. Niere und Lunge nach der Induktion des HS in den HS-Tieren, Sham-Mäusen und Kontroll-Tieren näher. Die HS-Mäuse zeigen in den vier untersuchten Organen über den gesamten Untersuchungszeitraum gleichmäßig abnehmende Expressionsmuster, wobei 0 h nach dem HS die stärksten und 72 h die geringsten Signale zu detektieren sind.

Während sich die Proteinexpression in der Milz der Abbildung 26 A nicht zwischen den Sham-Tieren und den Kontroll-Tieren unterscheidet, zeigen sich in den anderen untersuchten Organen jeweils unterschiedliche Expressionsmuster des mitochondrialen Proteins Bcl-2.

Die Abbildung 26 B zeigt in den Hepatozyten der Sham-Tiere bei den Zeitpunkten 0 h und 24 h geringere Signale als in den Kontroll-Tieren. Allerdings kann bei diesen beiden Zeitpunkten in den Sham-Mäusen auch weniger β-Aktin detektiert werden.

Die Expression des Bcl-2 in den Sham-Tieren in der Niere in der Abbildung 27 A ist deutlich stärker zu den Zeitpunkten t = 0 h und 72 h als bei 24 h. Aber auch diese Zeitpunkte weisen geringere Signale auf als die Kontroll-Tiere.

In der Lunge findet in den Sham-Tieren nur zu dem Untersuchungszeitpunkt 72 h eine gegenüber den Kontrol-Tieren verringerte Expression statt. Die Abbildung 27 B veranschaulicht dieses.

# 3.9 HS-induzierte Expression des Bax auf Proteinebene



В

Abbildung 28: Exemplarisches Beispiel der Western Blot-Analysen zur Expression des Bax nach dem HS in Kontroll-Tieren, Sham- und HS-Tieren. Die Untersuchungen zeigen die Proteinexpression in A) der Milz, B) der Leber. Das Haushaltsgen  $\beta$ -Aktin wurde als interne Kontrolle verwendet. Die Ergebnisse repräsentieren drei Mäuse pro Gruppe.



В

Abbildung 29: Exemplarisches Beispiel der Western Blot-Analysen zur Expression des Bax nach dem HS in Kontroll-Tieren, Sham- und HS-Tieren. Die Untersuchungen zeigen die Proteinexpression in A) der Niere und B) der Lunge. Das Haushaltsgen  $\beta$ -Aktin wurde als interne Kontrolle verwendet. Die Ergebnisse repräsentieren drei Mäuse pro Gruppe.

Die Abbildung 28 A enthält die Expression des mitochondrialen Bax in der Milz nach der Induktion des hämorrhagischen Schocks in der Western Blot-Analyse. Sie verdeutlicht, dass in den Sham-Tieren das Protein über den betrachteten Zeitraum nur gering exprimiert wird. Obwohl zu dem Zeitpunkt t = 72 h etwas höhere Signale als 0 h und 24 h nach dem HS detektiert werden, weisen auch diese Signale eine schwächere Expression des Bax Proteins nach als in den Kontroll-Tieren. Die HS-Tiere weisen eine über den gesamten Untersuchungszeitraum von 0 h bis 72 h nach dem HS gleichmäßig ansteigende Expression des Bax Proteins auf.

Die Abbildung 28 B repräsentiert die Western Blot-Analyse in der Leber.

In den Hepatozyten zeigt sich in den HS-Mäusen ein anderes Expressionsmuster des mitochondrialen Bax nach dem HS. Zu den Zeitpunkten 0 h und 72 h erscheinen starke Signale, die eine wesentlich höhere Expression darstellen als in den Kontroll-Tieren. Auch die Sham-Tiere besitzen gegenüber den Kontroll-Tieren erhöhte Intensitäten der Signale zu jedem untersuchten Zeitpunkt. Zu dem Untersuchungszeitpunkt t = 72 h findet eine starke Expression in den Sham-Tieren statt.

Die Abbildung 29 A stellt die Bax Proteinexpression in der Niere dar. Die HS-Tiere weisen in den untersuchten Zeitpunkten Signale auf, die 0 h nach dem HS eine identische Stärke bzw. 24 h und 72 h eine schwächere Intensität zeigen als die Werte in den Kontroll-Tieren. Die Sham-Tiere besitzen eine stärkere Expression des Proteins zu dem Zeitpunkt 24 h als die Kontroll-Tiere.

Die Abbildung 29 B veranschaulicht das Expressionsmuster des Bax Proteins in der Lunge. Sie verdeutlicht, dass sich die Signale über den Untersuchungszeitraum in den HS-Mäusen nicht von dem Wert der Kontroll-Tiere unterscheiden. In den Sham-Tieren werden zunächst gegenüber den Kontroll-Tieren gering erhöhte Expressionssignale detektiert, die sich zu den drei Zeitpunkten nicht in ihrer Intensität unterscheiden. Das Expressionsmuster des Bax Proteins in den Sham-Tieren unterscheidet sich aber nicht von den entsprechenden Signalen in den Kontroll-Tieren, da in ersteren die Signale des Haushaltgens  $\beta$ -Aktin entsprechend uneinheitlich sind.

In den HS-Tieren wird die Expression des Bax in den untersuchten Organen unterschiedlich reguliert, während das antiapoptotische Bcl-2 in der Leber, Lunge, Milz und Niere von 0 h bis 72 h hinunterreguliert wird.

## 3.10 Einfluss der Laparotomie auf die Apoptose

Bei der Laparotomie handelt es sich um eine klinisch relevante Second hit-Operation, die gewöhnlich keine Komplikationen hervorruft. Anders ist die Situation in einem traumatisierten Patienten, dessen Immunsystem eine proinflammatorische Immunantwort auf das Trauma bewirkt. In diesen Fällen kann eine Organdysfunktion oder sogar ein Multiorganversagen entstehen, an deren Entstehung die Apoptose beteiligt ist. Damit diese Pathogenese inhibiert werden kann, wurde der zusätzliche Einfluss der Laparotomie auf die Apoptose näher untersucht. Es wurde der extrinsische Signalweg der Apoptose, der über die Rezeptoren TNF-Rezeptor I und Fas-Rezeptor vermittelt wird, betrachtet.





Abbildung 30: Expression des CD120α Rezeptors in den T-Zellen (A) und deren Subpopulationen CD4<sup>+</sup>-T-Zellen (B) und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (C) in der Milz nach der Laparotomie. Grüne Balken= HS-Tiere; rote Balken= HS-Mäuse mit zusätzlicher Laparotomie; weiße Balken= Kontroll-Tiere. Es wurde drei Tiere für eine Gruppe verwendet.

Die Abbildung 30 A beinhaltet die Expression des TNF-Rezeptors I in der Milz in den CD3positiven Lymphozyten der Laparotomie-Tiere. Diese Tiere besitzen gegenüber den Kontroll-Tieren die dreifache Anzahl der T-Zellen, die das Protein exprimieren. Diese Ergebnisse charakterisieren die Laparotomie-Tiere zu jedem Zeitpunkt und die HS-Tiere 0 h und 24 h nach der Operation. In letzteren Tieren findet eine starke Expression des Rezeptorproteins 72 h nach dem Eingriff statt.

Die HS-Tiere der Abbildung 30 B, bei denen eine Laparotomie vorgenommen wurde, weisen eine in dem Zeitrahmen leicht ansteigende Anzahl an CD4-positiven T-Zellen auf, die das CD120 Protein exprimieren. Die Anzahl der doppelt positiven Zellen liegt zu dem letzten Untersuchungszeitpunkt bei 3 %. Die HS-Tiere zeigen zu den Zeitpunkten 0 h und 72 h nach dem HS höhere Maximalwerte auf.

Die Laparotomie-Tiere besitzen über den untersuchten Zeitraum die dreifache Anzahl an CD8-positiven Zellen gegenüber den Kontroll-Tieren, die den Todesrezeptor exprimieren. Die zytotoxischen T-Zellen der HS-Tiere zeigen 72 h nach dem HS eine stärkere und 24 h eine geringere Expression als die Laparotomie-Tiere. Diese Ergebnisse beinhaltet die Abbildung 30 C.





Die Abbildung 31 A enthält die Expression des Fas-Rezeptors in der Hauptpopulation der T-Zellen. Nur 24 h nach dem HS zeigen die HS-Tiere eine geringere Expression als in den Kontrollen, während bei den anderen beiden Zeitpunkten Werte zu messen sind, die sich nicht von den Ergebnissen der Kontroll-Tiere unterscheiden.

In den Laparotomie-Tieren findet 0 h und 24 h nur eine geringe Expression des Rezeptors statt, während 72 h nach der Laparotomie wieder die Werte der Kontroll-Tiere erreicht werden. Sowohl die HS- als auch die HS + Laparotomie-Tiere exprimieren in den T-Helferzellen das CD95 Protein, aber die Expression erfolgt in einem anderen zeitlichen Verlauf. In beiden Gruppen steigt die Expression von 0 h bis 72 h nach dem jeweiligen Eingriff deutlich an, wobei die Werte der Laparotomie stets niedriger sind als die Werte der

HS-Tiere. Die HS-Tiere in der Abbildung 31 B zeigen zu dem Zeitpunkt 72 h eine Expression des betrachteten Proteins, die sich nicht von den Kontroll-Tieren unterscheidet.

Die Abbildung 31 C veranschaulicht, dass in den CD8-positiven T-Zellen auch eine in dem Untersuchungszeitraum ansteigende Expression in den Laparotomie-Tieren nachgewiesen wird, die zum letzten Zeitpunkt Kontrollwerte erreicht. Die Ergebnisse der HS-Tiere unterscheiden sich nur 72 h nach dem HS geringfügig von den Daten der Kontroll-Tiere.

### 3.10.1 Aktivität der Kaspasen nach der Laparotomie

Der Signalweg über den die Apoptose abläuft, wurde jeweils in der Milz und Niere anhand der Aktivität der Kaspasen bestimmt. Die Kaspase-8 ist hauptsächlich an dem extrinsischen Signalweg der Apoptose beteiligt, kann aber auch über die Spaltung von dem Protein Bid den intrinsischen Weg einleiten und hat deshalb eine große Bedeutung.

Die Abbildung 32 A beinhaltet die Aktivität der Kaspase-8 in der Milz nach der Laparotomie, die 24 h nach dem HS erfolgte, während in der Abbildung 32 B diejenige aus den Proteinlysaten der Niere enthalten ist.





Abbildung 32: Einfluss der zusätzlichen Laparotomie auf die HS-induzierte Apoptose. Die Laparotomie wurde 24 h nach dem HS durchgeführt. Die Aktivierung der Kaspase-8 wurde in den Laparotomie-Tieren (HS + Laparotomie; rote Balken) gegenüber den HS-Tieren (grüne Säulen) und den Kontroll-Tieren (weiße Balken) untersucht. Es wurden jeweils fünf Tiere pro Gruppe verwendet.

In der Milz steigt die Aktivierung der Initiatorkaspase in den Laparotomie-Tieren von 0 h bis 72 h an, während die Kaspase-Aktivität in der Niere in dem betrachteten Zeitraum gleichmäßig abnimmt (Abbildungen 32 A und B). In beiden Organen weist die Aktivierung des Enzyms zu den Zeitpunkten 24 h und 72 h in den Laparotomie-Tieren (HS + Laparotomie) eine höhere Substratumsetzung auf als in den HS-Tieren.





Kaspase-9 in der Milz nach der LP



Kaspase-9 in der Niere nach der LP



Abbildung 33: Aktivität der Kaspasen-3 und -7 nach der Laparotomie in (A) der Milz, (B) der Niere und der Kaspase-9 in (C) der Milz, (D) der Niere. Die Aktivierung der Kaspasen wurde in den Laparotomie-Tieren (HS + Laparotomie; rote Balken) gegenüber den HS-Tieren (grüne Säulen) und den Kontroll-Tieren (weiße Balken) untersucht. Es wurden jeweils fünf Tiere für eine Gruppe verwendet.

HS + LP

Die Laparotomie zusätzlich zum HS bewirkt veränderte Aktivitäten der untersuchten Kaspasen in den Organen Milz und Niere im Vergleich zum HS ohne Laparotomie. Die Kaspase-Aktivitäten der Effektorkaspasen-3 und -7 in der Milz steigen von 0 h bis 72 h an. Aber es sind stets geringere Werte als bei den HS- oder Kontroll-Tieren zu sehen. Die Abbildung 33 B verdeutlicht in der Niere einen anderen zeitlichen Verlauf der Aktivierung. Die erwähnten Kaspasen weisen in den Laparotomie-Tieren eine im Zeitraum abnehmende Aktivität auf, wobei zu den beiden letzten Zeitpunkten höhere Aktivitäten zu messen sind als bei den HS-Tieren. Die Abbildungen 33 A und B enthalten in beiden Organen einen gegensätzlichen Kurvenverlauf.

Die Abbildungen 33 C und D beinhalten die Ergebnisse bezüglich der Aktivitäten der Initiatorkaspase-9 in der Milz und Niere nach der Laparotomie. Die erste Abbildung demonstriert in den Laparotomie-Tieren in der Milz einen Kurvenverlauf der Aktivität der Kaspase-9, der dem der Effektorkaspasen im diesem Organ entspricht, aber 72 h nach der Laparotomie verdeutlicht die Abbildung eine deutlich höhere Kaspase-Aktivität in Relation zur Kontrolle als bei den Kaspasen-3 und -7.

Die Abbildung 33 D zeigt die Ergebnisse des Aktivitätstest der Kaspase-9 in der Niere nach der Laparotomie zusätzlich zum HS. Die Aktivität in diesen Mäusen nimmt von 0 h bis 72 h ab. Die HS-Tiere zeigen 0 h eine ähnliche und 24 h und 72 h im Vergleich zu den Laparotomie-Tieren verringerte Aktivitäten der Kaspase.

Bei der Analyse der Daten der Laparotomie-Tiere muss berücksichtigt werden, dass die Laparotomie 24 h nach der HS-Operation ausgeführt wurde und die Zeitkinetik erst ab der Laparotomie gewertet wurde. Deshalb findet eine zeitliche Verschiebung von 24 h im Vergleich zu der Kinetik der HS-Tiere statt.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob der hämorrhagische Schock einen systemischen Effekt auf die Funktion des Immunsystems einschließlich der blutbildenden Systeme, auf die Apoptose der T-Lymphozyten und der Parenchymzellen in den Organen verursacht.

# 4.1 Analyse des HS anhand der Blutbildbestimmung

Die Untersuchungen im Tiermodell zum HS beinhalten als Grundlage entweder ein über den Blutdruck angepasstes hämorrhagisches Schockmodell, ein über das entnommene Blutvolumen reguliertes Modell oder ein Modell mit einer unkontrollierten Blutung (Lomas-Niera et al. 2005). In dieser Arbeit wurde das zuerst genannte HS-Modell durchgeführt. Die differentielle Blutbildbestimmung verdeutlicht den Schweregrad des induzierten HS. In den HS-Tieren erfolgt zum Zeitpunkt t = 0 h ein signifikanter Rückgang der Lymphozytenanzahl, der Hämoglobin- und Erythrozytenkonzentration sowie des Hämatokrits. In den hämorrhagischen Tieren normalisieren sich 72 h nach der Operation die Hämoglobin- und Erythrozytenkonzentration sowie des Arbeit belegt, dass sieben Tage nach einem hämorrhagischen Schock der immunologische Zustand der Maus wieder Normalwerte erreicht. Die Bestimmungen der Lymphozyten-, Erythrozytenkonzentration und die Hämatokritwerte im Plasma weisen dieses Ergebnis auch in den HS-Tieren nach. Das verwendete Modell induziert einen schweren HS.

# 4.2 Systemische Inflammation

Klinische Studien zeigten, dass die nach einem schweren Gewebetrauma einsetzende Hyperinflammation für die erhöhte Mortalitätsrate und für das posttraumatische Multiorganversagen verantwortlich ist (Roumen et al. 1993). Damit die Entstehung der Dysfunktion der Organe nach einem schweren stumpfen Trauma oder einer Hämorrhagie inhibiert und optimale Therapien entwickelt werden können, wurden verschiedene Untersuchungen zum Trauma im Tiermodell durchgeführt.

Dabei wurde besonders die IL-6 Konzentration bestimmt, da ein Zusammenhang zwischen der Schwere des Traumas oder des chirurgischen Eingriffs und der Freisetzung dieses Zytokins besteht. Die IL-6 Konzentration liefert einen Anhaltspunkt zum Schweregrad der inflammatorischen Reaktion und damit für den Verlauf der Genesung (Lenz et al. 2007, Hietbrink et al. 2006).

Eine anhaltende Sekretion des IL-6 fördert die Produktion antiinflammatorischer Zytokine wie IL-10. Dadurch wird eine umfangreiche Gewebebeschädigung verhindert (Menger et Vollmar 2004; Tschoeke et Ertel 2007).

Es ist auffällig, dass im Tiermodell in den HS-Tieren 24 h nach der Operation eine hohe Konzentration des proinflammatorischen Zytokins IL-6 nachweisbar ist. Der HS bewirkt jedoch nicht direkt eine erhöhte Produktion und Sekretion des IL-6, sondern führt zu einer Stimulation des Immunsystems. Die hohe Konzentration des IL-6 beschreibt, dass sich das Immunsystem der HS-Mäuse zunächst 24 h nach der Operation in einem proinflammatorischen Zustand befindet, der aufgrund der einsetzenden antiinflammatorischen Immunantwort 72 h nach dem HS in den hämorrhagischen Tieren kompensiert wird. Deshalb erfolgt in den HS-Tieren zum letzten Untersuchungszeitpunkt ein starker Rückgang der gemessenen IL-6 Konzentration.

Claridge et al. untersuchten in einem über den Blutdruck regulierten HS-Modell der Maus die IL-6 Konzentration im Serum 4 h und 5 Tage nach dem HS in den hämorrhagischen Mäusen. Es zeigte sich eine deutliche Erhöhung der Zytokinkonzentration im Vergleich zu der Kontrolle zu dem Zeitpunkt 4 h, bei dem der Wert ca. 1000 pg/ml betrug. Fünf Tage nach der HS-Operation wurde eine Konzentration von 413,8 pg/ml gemessen (Claridge et al. 2001).

Aufgrund der verschiedenen Zeitpunkte ist ein direkter Vergleich der Konzentration des IL-6 dieser Arbeit mit den publizierten Ergebnissen nicht möglich. Aber die gemessenen Werte

zum Zeitpunkt 24 h liegen im Bereich des zeitlichen Konzentrationsverlaufes der publizierten Ergebnisse. In einer anderen Studie wurde in traumatisch-hämorrhagischen Mäusen, bei denen vor der Hämorrhagie eine Laparotomie durchgeführt wurde, 2 h nach der Operation eine IL-6 Konzentration von ca. 850 pg/ml bis 1000 pg/ml im Plasma bestimmt (Kawasaki et al. 2006). Aber auch dieses Ergebnis kann man nicht mit den Daten dieser Arbeit vergleichen, da zusätzlich eine Laparotomie durchgeführt wurde und die Mäuse deshalb ein sehr schweres Trauma erlitten haben.

In einigen tierexperimentellen Studien mit Nagetieren, die sich mit Untersuchungen zur Dysfunktion der Parenchym- und Immunzellen nach dem Trauma und Hämorrhagie beschäftigen, wurde analysiert, ob die Apoptose an der Pathogenese beteiligt ist. Dabei wurde nachgewiesen, dass in den HS-Tieren aufgrund der Verwendung von Glutamin und Ringer-Laktat-Lösung zur Volumensubstitution eine deutliche Verminderung der Aktivierung der Kaspase-3 in der Leber im Vergleich zur alleinigen Reinfusion mit Ringer-Laktat-Lösung zu messen ist (Yang et al. 2007). Bei anderen Untersuchungen wurde gezeigt, dass 72 h nach einem HS mit und ohne zusätzlicher Laparotomie die Anzahl apoptotischer Peyer's Patch Zellen zunimmt (Xu et al. 1997a).

## 4.3 HS-induzierte Apoptose in der Milz

Für die Analyse der Apoptose ist die Inkubation der Splenozyten mit Annexin V wichtig, da die Untersuchung auf eine frühe Apoptose hinweist. Zum Zeitpunkt 0 h nach der Operation weisen die HS-Tiere im Vergleich zu den Sham-Tieren eine verstärkte Anzahl an Annexin V-positiven T-Lymphozyten auf. In den HS-Tieren erfolgt zu dem Zeitpunkt t = 24 h ein signifikanter Anstieg der Annexin V-positiven T-Lymphozyten gegenüber den Kontroll-Tieren, während die Sham-Tiere auf Kontroll-Niveau verbleiben.

In einem traumatisch-hämorrhagischen Schockmodell der Maus zeigen die dendritischen Zellen, die aus der Milz isoliert wurden, in den traumatisch-hämorrhagischen Tieren 2 h nach der Reinfusion in einer Färbung mit Annexin V und Propidiumiodid signifikante Unterschiede in der frühen und späten Apoptose im Vergleich zu den Sham-Mäusen (Kawasaki et al. 2006).

Zur Untersuchung des extrinsischen Signalweges wurde die Expression des TNF-Rezeptors I analysiert. Es konnte in der Milz eine nach dem HS zeitabhängige Expression des TNF-Rezeptors I in den HS-Mäusen gemessen werden. Die Daten repräsentieren einen biphasischen Verlauf der Expression des Todesrezeptors mit maximalen Werten zu den Zeitpunkten 0 h und 72 h, während 24 h nach dem HS geringere Werte zu erkennen sind. Diese Expression ist sowohl in der Gesamtpopulation der T-Lymphozyten als auch in den Subpopulationen CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> und CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> zu messen, d. h. in diesen T-Lymphozyten wird die Apoptose induziert. Die Untersuchungen zur Expression des Fas-Rezeptors weisen keinen Einfluß des HS auf die Induktion der Apoptose in den Lymphozyten nach. Diese Studie zeigt erste Anhaltspunkte, dass die Apoptose der Lymphozyten, die aus der Milz isoliert wurden, über den TNF-Rezeptor I des extrinsischen Signalweges vermittelt abläuft.

In diesem HS-Modell der Maus wurde eine durch den HS induzierte Apoptose der Splenozyten anhand der Aktivitäten der Kaspasen nachgewiesen.

Zu den Zeitpunkten 0 h und 72 h nach der HS-Operation erfolgen hohe Aktivitäten der Initiator- und Effektorkaspasen, während 24 h nach dem chirurgischen Eingriff eine Abnahme der Kaspase-Aktivitäten stattfindet. Die Ergebnisse zeigen, dass der HS direkt nach der OP die Induktion der Apoptose bewirkt. Die Apoptose wird besonders stark zu den Zeitpunkten 0 h und 72 h aufgrund der Minderdurchblutung der Organe oder der Gewebehypoxie infolge des HS, der durch die experimentell herbeigeführte Hämorrhagie induziert wird, eingeleitet. Dieses zeitliche Muster der Kaspase-Aktivitäten lässt sich in der Milz mit den Ergebnissen der DNA-Fragmentation der TUNEL-Färbungen korrelieren. Die TUNEL-Untersuchung weist

in den HS-Tieren im Vergleich zu den Kontroll-Mäusen viele DNA-Strangbrüche 0 h und 72 h nach dem HS auf. Bei den Kontroll-Tieren werden keine apoptotischen Zellen in der Milz nachgewiesen. Die gemessene DNA-Fragmentation der hämorrhagischen Mäuse beweist eine hohe Anzahl apoptotischer Zellen innerhalb der Milz. Die DNA-Fragmentation kann auch durch nekrotische Vorgänge entstehen. Die Nekrose kann aber, da die für die Apoptose charakteristische Chromatinkondensation in der DAPI-Färbung der Nuclei aufgetreten ist, ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt).

In anderen Studien wurde der Effekt des HS auf den Thymus untersucht, der wie die Milz ein lymphatisches Organ ist und wichtige Funktionen bei der Entwicklung und Reifung der T-Lymphozyten besitzt.

Eine in den HS-Tieren im Gegensatz zu den Sham-Tieren verstärkte Apoptose, die im TUNEL-Assay und anschließender Durchflusszytometrie analysiert wurde, weisen die Thymozyten 72 h nach der HS-Operation auf (Xu et al. 1997b). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Ergebnissen der TUNEL-Methode dieser Arbeit.

Auch im Thymus bewirkt der hämorrhagische Schock eine Dysfunktion, wodurch die Reifung der T-Lymphozyten gestört wird. Dadurch resultiert eine Immunsuppression infolge des HS.

Die Folgen des hämorrhagischen Schocks betreffen nicht nur die Splenozyten, sondern auch die Immunzellen, die in dem lymphatischen Organ angereichert sind.

In der Doktorarbeit wurde nicht nur der rezeptorvermittelte, extrinsische Signalweg der Apoptose anhand der Analysen in der Milz untersucht, deren Zellen auf die Expression der Todesrezeptoren Fas- und TNF-Rezeptor in der Durchflusszytometrie charakterisiert wurden, sondern auch ein weiterer Weg der Apoptose betrachtet. Bei dem zweiten untersuchten Signalweg handelt es sich um den Kaspase-abhängigen intrinsischen Weg der Apoptose, an dessen Regulation die mitochondrialen Proteine Bcl-2 und Bax beteiligt sind.

In der Milz zeigen die Ergebnisse der RTD-PCR, dass eine Regulation des mitochondrialen b*cl-2* erfolgt, das antiapoptotisch wirkt. Die Expression des *bcl-2* Gens wird in den HS-Tieren ausgehend von dem Zeitpunkt 0 h bis 72 h nach der HS-Operation verringert. Die Daten der Splenozyten zeigen eine Regulierung in der Expression des Bax, da im Vergleich zu den Werten der Kontroll-Tiere erhebliche Unterschiede messbar sind. Die relative Expression in den Splenozyten der hämorrhagischen Mäuse steigt von 0 h bis 24 h an und verringert sich 72 h nach der HS-Operation. In den Sham-Tieren erfolgt die Expression dem in den HS-Tieren beschriebenen zeitlichen Verlauf. Die gemessenen Werte der Sham-Tiere sind in den beiden ersten untersuchten Zeitpunkten geringer als in den HS-Tieren. Der HS bewirkt in lymphatischen Organen eine veränderte Expression des mitochondrialen Gens *bax*. Die Ergebnisse der Expression des *bcl-2*, die in der RTD-PCR gemessen wurden, korrelieren mit

den Expressionsmustern auf Proteinebene, die in der Western Blot-Analyse detektiert wurden. In den HS-Tieren findet eine von 0 h bis 72 h abnehmende Expression des Bcl-2 auf Proteinebene in der Milz statt. In der Milz erfolgt die Expression des mitochondrialen Bax Proteins in den HS-Tieren reguliert. Die Intensität der Expression steigt von 0 h bis 72 h an. Die Sham-Tiere zeigen keine unterschiedlichen Expressionsmuster innerhalb der Messreihe, aber im Vergleich zu der Expression der Kontroll-Tiere.

Diese Ergebnisse der Western Blot-Analyse bestätigen die Ergebnisse auch hinsichtlich der Expression des Bax Proteins, wobei zu dem Zeitpunkt 72 h geringfügige Unterschiede auftreten. Die verringerte Expression des *bcl-2* Gens in der PCR 72 h nach der HS-Operation in den HS-Mäusen könnte z. B auf eine durch die Aufreinigung verunreinigte cDNA zurückzuführen sein.

Da bislang keine Studien zur Expression der mitochondrialen Gene *bax* und *bcl-2* in Splenozyten in einem Modell der Maus veröffentlicht wurden, sind die vorliegenden Resultate nur eingeschränkt vergleichbar.

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass der HS einen Einfluss auf die Regulation der Apoptose ausübt. Die veränderte Expression des mitochondrialen Gens *bax* bzw. *bcl-2* in der Milz zeigt, dass der intrinsische Signalweg der Apoptose nach dem HS an der Induktion der Apoptose beteiligt ist. Die Induktion der Apoptose im Kaspase-abhängigen Weg ist ein sehr komplexer Prozess, der in diesem Tiermodell mit den verschiedenen Meßmethoden analysiert wurde. So besagt eine veränderte Expression der mitochondrialen Gene *bax* und *bcl-2* noch nicht aus, dass die Apoptose induziert oder ausschließlich über den intrinsischen Signalweg vermittelt abläuft. Die proapoptotische Funktion des Bax wird durch eine Heterodimerisierung mit Proteinen der Bcl-2 Familie, z. B. Bcl-2 inhibiert. Deshalb entscheidet nicht nur die Proteinkonzentration in zeitlicher Abhängigkeit zum induzierten HS, ob der Signalweg der Apoptose eingeleitet wird, sondern auch die Konzentrationen der einander sich in ihrer Funktion kompensierenden Proteine Bax und Bcl-2. Zusätzlich wirken noch zahlreiche Inhibitoren in dem Kaspase-abhängigen Signalweg der Apoptose, die die Kaspasen-9 und auch die Effektorkaspasen-3 und -7 inhibieren (Schimmer 2004).

## 4.4 HS-induzierte Apoptose im Nierenparenchym

Die Ergebnisse der Aktivierung der Kaspase-Aktivitäten im Nierenparenchym verdeutlichen, dass der programmierte Zelltod nach dem HS in diesem Organ über die identischen Signalwege wie in den Splenozyten reguliert wird. Die Aktivitäten der Initiator- und Effektorkaspasen erfolgen in dem beschriebenen biphasischen Verlauf mit Maximalwerten

bei 0 h und 72 h und mit einem niedrigen Wert 24 h nach der Operation. Aber die Kaspasen-3 und -7 werden zu dem Zeitpunkt t = 72 h nur gering aktiviert.

Die bisher veröffentlichten Studien zum hämorrhagischen Schock der Maus oder Ratte befassen sich hauptsächlich mit der Messung der renalen Apoptose nach der Verwendung unterschiedlicher Volumina für die Reinfusionen, aber die Aktivierung der Kaspasen zu verschiedenen Zeitpunkten wird im Hinblick auf die renale Apoptose nicht untersucht. In einem hämorrhagischen Modell der Ratte, das über das entnommene Blutvolumen mit nachfolgender akuten Blutung reguliert wird, wiesen Lu et al. nach, dass die Apoptose im Nierenparenchym in Abhängigkeit vom eingestellten Blutdruck nach der Blutung induziert wird. Dieses zeigte sich in der TUNEL-Analyse. Bei einem aufgrund der Volumensubstitution höher eingestellten Blutdruck ist eine größere Anzahl an Zellen direkt nach der Reinfusion apoptotisch als bei einem geringer eingestellten Blutdruck (Lu et al. 2007).

Die Expression des untersuchten Gens *bax* in der RTD-PCR in der Niere repräsentiert, dass in den HS-Tieren die relative Genexpression von 0 h nach 72 h ansteigt, aber 24 h nach der Operation geringfügig abnimmt. Aber unter Berücksichtigung des Standardfehlers bleibt die Genexpression der HS-Tiere in den ersten beiden Zeitpunkten auf dem gleichen Niveau. Das Gen *bcl-2* wird 24 h nach der Operation schwächer exprimiert mit einem leichten Anstieg in der Expression zu dem Zeitpunkt 72 h.

Die Western Blot Ergebnisse verdeutlichen, dass die Bcl-2 Expression in den HS-Tieren vom ersten bis zum letzten Zeitpunkt abnimmt. Die Bax Expression weist von 0 h bis 24 h eine abnehmende Expression und im Vergleich der Zeitpunkte 24 h und 72 h eine identische Intensität auf.

Es gibt auch bezüglich der Expression der untersuchten mitochondrialen Gene *bax* und *bcl-2* im Nierenparenchym in einem vergleichbaren tierexperimentellen Modell keine Studien. Die aktuellen Studien zur Untersuchung der Apoptose wurden in einem Ischämie/Reperfusionsmodell der Ratte durchgeführt, das einen renalen bilateralen Arterienverschluss mit nachfolgender Reinfusion beinhaltet (Gobé et al. 1999).

Andere Studien beziehen sich auf die Inhibition der Apoptose durch die Verabreichung von LPA (engl. "Iysophosphatidic acid") in unterschiedlichen Dosierungen kurz vor der Reinfusion in einem renalen Ischämie/Reperfusionsmodell. Nach der Injektion von LPA fand eine dosisabhängige Verminderung der Apoptose im Nierenparenchym und eine verringerte Aktivität der aktiven Kaspase-7 in den tubulären Endothelzellen statt (De Vries et al. 2003).

## 4.5 HS-induzierte Apoptose in der Lunge

In der Lunge findet eine aufgrund des HS induzierte Apoptose statt, die sich anhand der Aktivitäten der Initiator- und Effektorkaspasen beschreiben lässt. Die Aktivierung der Kaspasen in den HS-Tieren erfolgt in einem zeitabhängigen und biphasischen Kurvenverlauf mit hohen Aktivitätswerten 0 h und 72 h nach der Operation. Zu dem Zeitpunkt 24 h nach der HS-Operation nimmt die Aktivierung der Kaspasen im Lungenparenchym ab.

In einem hämorrhagischen Schockmodell mit nachfolgender Induktion einer Sepsis wurde im Vergleich zu den Kontroll-Tieren eine verstärkte Konzentration der aktiven Kaspase-3 in dem Lungenparenchym zum Zeitpunkt 12 h in den hämorrhagischen und septischen Mäusen immunhistochemisch nachgewiesen. Die Anzahl der Zellen, in denen die aktive Kaspase-3 nachgewiesen wurde, ging zu dem Untersuchungszeitpunkt 24 h bis auf Kontrollniveau zurück (Perl et al. 2007). Der starke Rückgang der Aktivität der Kaspase-3 24 h nach dem hämorrhagischen Schock in dem Lungenparenchym in den HS-Tieren wird aufgrund der beschriebenen Studie bestätigt, obwohl der Einfluss der Sepsis auf die Apoptose nicht unerwähnt bleiben kann.

Obwohl diese Ergebnisse übereinstimmen, weist der bisherige Stand der Forschung noch keine Erklärungen für die geringe Kaspase-Aktivität 24 h nach dem chirurgischen Eingriff in den Organen der HS-Tiere auf. Es könnte einen Schutzmechanismus geben, der die Initiator- und Effektorkaspasen in den Parenchymzellen zu diesem Zeitpunkt inhibiert und somit die Zellen vor der Apoptose schützt.

In dem Lungenparenchym erfolgt eine in den HS-Tieren über den betrachteten Zeitraum abfallende Bcl-2 Expression, die durch Ergebnisse in der RTD-PCR und Western Blot nachgewiesen wurden. Die Expression des Bax wird infolge des HS nicht reguliert. Die Expression in den HS-Mäusen zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kontroll-, Sham- und HS-Tieren. Die Expression des Bax stimmt mit den Daten aus der Literatur überein, da dort nach der Reinfusion mit frischem Plasma in den hämorrhagischen Ratten eine sogar geringere Anzahl an Zellen das Bax Protein exprimieren als die Sham-Tiere (Deb et al. 2000).

Bei der Beurteilung der Ergebnisse muss berücksichtigt werden, dass es sich um ein Schockmodell handelt, bei dem ein definiertes Volumen Blut abgenommen wurde, um den Schock zu induzieren, der 75 min andauerte. In weiteren TUNEL-Färbungen wurde beschrieben, dass sich die apoptotischen Zellen, die durch den HS induziert wurden, im Bronchialepithel, den Alveolen und im Interstitium befinden (Deb et al. 2000).

## 4.6 HS-induzierte Apoptose in der Leber

Die hepatische Kaspase-Aktivität in den HS-Tieren unterscheidet sich in ihrer Intensität und dem zeitlichen Verlauf von den übrigen Organen. In der Leber werden bei den Aktivitäten der Initiatorkaspasen-8 und -9 im Vergleich zu der Lunge, Milz und Niere höhere Werte gemessen. Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass die Leber besonders anfällig gegenüber den Auswirkungen des HS ist. Die Effektorkaspasen-3 und -7 zeigen eine von 6500 auf 3800 abnehmende Aktivität von 0 h nach 72 h. Aber 24 h nach der Operation erkennt man keinen Minimalwert der Kaspase-Aktivitäten wie in den anderen Organen. Die Aktivität der Initiatorkaspase-8 in der Leber beschreibt einen in der Tendenz ähnlichen zeitlichen Verlauf über den Untersuchungszeitraum. Die Aktivierung der Kaspase-9 nimmt von 0 h bis 72 h ab, berücksichtigt man aber den Standardfehler, ergibt sich ein fast linearer Verlauf. Auch in der Literatur wurde die starke Aktivierung der Kaspasen in den Hepatozyten nach dem HS festgestellt.

In den Hepatozyten der hämorrhagischen Ratten wurde eine dreifache Aktivität der Kaspase-3 im Vergleich zu den Sham-Tieren nachgewiesen. Die Aktivierung der Kaspase erreichte bei den hämorrhagischen Ratten, die zuvor den Inhibitor der Kaspase injiziert bekommen hatten, wieder Werte der Kontroll-Tiere (Mauriz et al. 2003).

In den letzten Jahren beschäftigten sich die Untersuchungen zur Apoptose oft mit der Detektion apoptotischer Zellen nach der Verwendung verschiedener Reinfusionslösungen. Eine TUNEL-Färbung lokalisierte die maximale Anzahl apoptotischer Hepatozyten in Ratten in der perizentralen Region des Leberacinus nach einer Dauer des hämorrhagischen Schocks von 60 min mit einer nachfolgenden zweistündigen Reinfusionsphase (Paxian et al. 2003). In den Hepatozyten findet eine Abnahme der Bcl-2 Expression von 0 h bis nach 72 h in den HS-Tieren statt. Dieses Ergebnis bestätigen sowohl die Daten der RTD-PCR als auch die Western Blot Analysen. Zu dem Zeitpunkt 2 h nach der HS-Operation repräsentieren Daten der Western Blot Ergebnisse in hämorrhagischen Ratten eine gegenüber den Sham-Tieren verminderte Expression des Bcl-2 Proteins in den Hepatozyten nach der Gabe von racemischer Ringer-Laktat-Lösung (Jaskille et al. 2006).

Die Expression des zweiten untersuchten Gens in der PCR zeigt, dass in den HS-Tieren keine wesentlichen Unterschiede im Vergleich zu den Sham-Tieren des jeweiligen Zeitpunktes zu erkennen sind. Aber es tritt ein geringfügiger Unterschied zu dem Zeitpunkt t = 24 h innerhalb der HS-Tiere auf, wo eine leichte Abnahme der Expression zu erkennen ist. Diese Abnahme der Expression des Bax repräsentieren auch die Western Blot Ergebnisse. Auch diese Daten beschreiben in den HS-Tieren zu dem Zeitpunkt t = 24 h im

Vergleich zu den beiden anderen Untersuchungszeitpunkten einen Rückgang der Expression, der aber einen größeren Unterschied zu den anderen Werten darstellt als in den Ergebnissen der RTD-PCR. Die HS-Tiere weisen in den Hepatozyten im Vergleich zu den Sham-Tieren zu dem Zeitpunkt 24 h eine geringere Expression des Bax in der Western Blot Analyse auf. Dieses Ergebnis bestätigt die Studie, in der die Expression des *bax* in den HS-Mäusen 24 h nach der HS-Operation um das 2,7fache im Vergleich zu den Sham-Tieren hinunterreguliert wird (Sundar et al. 2005). Aber in dem beschriebenen Modell werden die hämorrhagischen Mäuse nach der Induktion des Schockzustandes nicht reinfundiert. Es handelt sich daher um ein Schockmodell, das einen sehr starken hämorrhagischen Schock, bei dem die Tiere 37 % des Blutvolumens verlieren, beinhaltet. Die nachgewiesene sehr starke Hinunterregulation des mitochondrialen Gens beruht auf dem schweren HS-Modell.

### 4.7 Einfluss des Second Hits auf die Apoptose

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Einfluss einer weiteren Operation ("second hit") 24 h nach der ersten HS-Operation auf die Induktion der Apoptose in Immun- und Parenchymzellen untersucht. Nach der "Second hit"-Theorie bewirkt eine ansonsten kleinere Operation, wie die Laparotomie, in Patienten, deren Immunsystem sich aufgrund der ersten Operation im systemischen inflammatorischen Zustand befindet, besonders schwere Organdysfunktionen. Die Operationsmethode wurde als zweite chirurgische Maßnahme durchgeführt, da sie als eine klinisch relevante Methode bei Polytrauma-Patienten trotz modernster Diagnoseverfahren angewendet wird. Deshalb eignet sich die Laparotomie in einem Mausmodell, um die klinische Situation in den Patienten zu simulieren und auf diese Weise die Pathogenese des Multiorganversagens zu untersuchen.

Es konnte in Mausmodellen gezeigt werden, dass die Laparotomie abhängig von der Inzisionslänge die Produktion von Zytokinen induziert und deshalb einen inflammatorischen Zustand bewirkt. So wurde 3 h nach der Beendigung der Laparotomie bei einer Inzisionslänge von 3 cm eine Konzentration des IL-6 im Serum von 1680 pg/ml im Gegensatz zu einer Inzisionslänge von 1 cm festgestellt, bei der Werte von 797 pg/ml gemessen wurden (Ishibashi et al. 2006). Deshalb wurde in dieser Doktorarbeit auf die Bestimmung der Konzentration des IL-6 im Serum nach der Laparotomie verzichtet, da eine Messung der Zytokinkonzentration den Einfluss der Laparotomie zwar auf die Induktion einer Inflammation belegen würde, aber nicht den additiven Effekt als "second hit" auf die Apoptose nach dem HS erklären könnte. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass der durchgeführte "second hit" keinen generellen zusätzlichen Einfluss auf die Expression der

untersuchten Rezeptoren des extrinsischen Signalweges der Apoptose besitzt. In den Splenozyten finden keine im Vergleich zu den HS-Tieren grundsätzlich verstärkten Expressionen des Fas- bzw. des TNF α-Rezeptors in den T-Lymphozyten statt. Das bezieht sich sowohl auf die Gesamtpopulation der T-Lymphozyten als auch auf die zytotoxischen Zellen und T-Helferzellen in den Splenozyten. Im ersten Teil wurden die Folgen des HS auf den immunologischen Zustand und die Pathogenese der Multiorgandysfunktion anhand der Induktion des programmierten Zelltodes in einem Mausmodell über einen Zeitraum von 0 h bis 72 h untersucht. Die Genesung der Polytrauma-Patienten erstreckt sich oft über einen längeren Zeitraum, in dem oft mehrere Operationen notwendig sind. Daher ist es wichtig, dass im Tiermodell über einen längeren Untersuchungszeitraum Experimente durchgeführt werden, damit auf diese Weise der geeignete Zeitpunkt nach dem Trauma für eine weitere Operation ermittelt wird.

## 4.8 Ausblick

In dieser Arbeit wurden die Kaspase-abhängigen Signalwege der Apoptose in Immun- und Parenchymzellen nach dem HS näher analysiert. Für weiterführende Experimente können die Immunzellen nach dem HS, die in der Zellkultur mit Kaspaseinhibitoren inkubiert wurden, auf morphologische Merkmale der Apoptose untersucht werden. Ein bekannter Inhibitor ist das XIAP Protein, das die Kaspasen-3, -7 und -9 der Mammalia blockiert.

Ebenso kann das verwendete HS-Modell verändert werden, indem z. B. die Dauer des hämorrhagischen Schocks oder die betrachteten Zeitpunkte geändert werden.

Die Transfektion dendritischer Zellen, die nach dem HS kultiviert werden, stellt einen therapeutisch wirksamen Ansatz dar. Zur Transfektion sind Vektoren geeignet, die antiapoptotische Proteine exprimieren.

# 5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde der Einfluss eines hämorrhagischen Schocks (HS) auf die Aktivierung der Apoptose in Immunzellen und viszeralen Organen und die dadurch resultierende Immunsuppression in einem Mausmodell untersucht. Dabei wurden die Kaspase-abhängigen Signalwege, die zur Einleitung der Apoptose führen, in einem Untersuchungszeitrahmen von 0 h bis 72 h post Operation näher analysiert. In den Splenozyten erfolgt in den hämorrhagischen Tieren die Aktivierung der Initiatorkaspasen-8 bzw. -9 und der Effektorkaspasen-3 und -7 in einem biphasischen Kurvenverlauf über den analysierten Zeitraum mit maximalen Aktivitäten bei 0 h und 72 h und einem geringen Wert 24 h nach der Operation. Der hämorrhagische Schock bewirkt in den T-Lymphozyten, die aus der Milz isoliert wurden, eine zeitabhängige Expression des TNF-Rezeptors, wodurch der extrinsische Signalweg der Apoptose induziert wird, mit einem ähnlichen Verlauf. Die Western Blot-Analysen zur Expression der mitochondrialen Proteine Bax und Bcl-2 belegen, dass in den HS-Tieren eine gegenläufige Expression stattfindet. Der HS verursacht eine Hochregulierung des Bax und eine Herunterregulierung des Bcl-2 von 0 h bis 72 h. In dem Nierenparenchym der hämorrhagischen Tiere entsteht eine im zeitlichen Verlauf ähnliche Aktivierung der untersuchten Kaspasen. Die Expression des Bcl-2 Proteins nimmt in dem Zeitraum ab, während das Bax Protein von 24 h zu 72 h in gleichbleibender Intensität exprimiert wird. Auch im Lungenparenchym zeigen die HS-Tiere einen biphasischen, zeitabhängigen Verlauf der Aktivitäten der Kaspasen mit den in den Splenozyten beschriebenen Charakteristika. Das mitochondriale Bcl-2 wird von 0 h bis 72 h nach der Operation herunterreguliert, aber die Expression des Bax unterscheidet sich nicht von der der Kontroll-Tiere. Gewebespezifische Unterschiede erscheinen bei der Messung der Kaspase-Aktivitäten in der Leber, da die Aktivierungen der Kaspasen in einer anderen Intensität und einem anders regulierten zeitlichen Verlauf folgen. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals anhand eines Blutdruck angepaßten HS-Modells der Maus mit/ohne Laparotomie ein signifikanter, direkter Einfluss des HS auf die Aktivierung der Apoptose von Immun- und Parenchymzellen nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich eine starke individuelle Regulation der apoptotischen Signalwege innerhalb der untersuchten Organe.

# 6. Summary

In this study the influence of hemorrhagic shock (HS) on activation of apoptosis in cells of immune system and visceral organs and resulting immunosuppression was thereby in a murine model examined. The caspase dependent pathways that inducing apoptosis were analysed more closely in a time frame of 0 hrs to 72 hrs post operation. In hemorrhagic animals activation of initiator caspase-8 rather -9 and effector caspases-3 and -7 in splenocytes occur in a biphasic course with maximal activity at 0 hrs and 72 hrs in time frame and lower data at 24 hrs post operation. Hemorrhagic shock causes in splenic T lymphocytes a time-dependent expression of TNF-receptor with similar course whereby extrinsic apoptotic pathway is induced. Western Blot analyses of expression of mitochondrial proteins Bax and Bcl-2 allocate, that an opposing trend of expression in HS animals proceeds. HS causes a Bax upregulation and downregulation of Bcl-2 at 0 hrs to 72 hrs. In hemorrhagic animals arise a similar in time dependent course activation of examined caspases in renal parenchym. Bcl-2 protein expression decrease while Bax protein is expressed 24 hrs to 72 hrs in similar intensity. Also in lung parenchymal cells the HS animals display a biphasic, time-dependent course of caspase-activity with characteristics like in splenocytes. The mitochondrial Bcl-2 is downregulated at 0 hrs to 72 hrs post operation, but Bax expression is not different of expression of control animals. In liver tissue specific differences appear on measurement of caspase activity, because caspase activities proceed in another intensity and different time-dependent course. In this study it could be first time in a pressure regulated murine HS model with and without laparotomy a significant direct influence on apoptosis activation of immune competent and parenchymal cells demonstrated. A highly individual regulation appear in apoptotic signalling pathways in examined organs.

- ADAMS, H.-A., FLEMMING, A.; FRIEDRICH, L. & RUSCHULTE, H. (2007). Taschenatlas Notfallmedizin. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- ADAMS, J. M. (2003). Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. Genes Dev 17, 2481-95.
- AMERICAN COLLEGE OF CHEST PHYSICIANS/SOCIETY OF CRITICAL CARE MEDICINE CONSENSUS CONFERENCE (1992): definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. — Crit Care Med 20, 864-74.
- BERCHTOLD, R., HAMELMANN, H. & PEIPER, H.-J. (2006). Chirurgie. Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag, München, Jena.
- BOATRIGHT, K. M. & SALVESEN, G. S. (2003). Mechanisms of caspase activation. Curr Opin Cell Biol 15, 725-31.
- BROD, V. I., KRAUSZ, M. M., HIRSH, M., ADIR, Y. & BITTERMAN, H. (2006). Hemodynamic effects of combined treatment with oxygen and hypertonic saline in hemorrhagic shock. — Crit Care Med 34, 2784-91.
- BUDIHARDJO, I., OLIVER, H., LUTTER, M., LUO, X. & WANG, X. (1999). Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. Annu Rev Cell Dev Biol 15, 269-90.
- CHANG, H. Y. & YANG, X. (2000). Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. Microbiol Mol Biol Rev 64, 821-46.
- CHAUDRY, I. H. & AYALA, A. (1993). Mechanism of increased susceptibility to infection following hemorrhage. Am J Surg 165, 59S-67S.
- CHO, S.-G. & CHOI, E.-J. (2002). Apoptotic signaling pathways: caspases and stressactivated protein kinases. — J Biochem Mol Biol 35, 24-7.
- CLARIDGE, J. A., WEED, A. C., ENELOW, R. & YOUNG, J. S. (2001). Laparotomy potentiates cytokine release and impairs pulmonary function after hemorrhage and resuscitation in mice. J Trauma 50, 244-52.

- COBB, J. P., BUCHMAN, T. G., KARL, I. E. & HOTCHKISS, R. S. (2000). Molecular biology of multiple organ dysfunction syndrome: injury, adaptation, and apoptosis. — Surg Infect 1, 207-13; discussion 214-5.
- CORY, S., HUANG, D. C. & ADAMS, J. M. (2003). The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. Oncogene 22, 8590-607.
- DANIAL, N. N. & KORSMEYER, S. J. (2004). Cell death: critical control points. Cell 116, 205-19.
- DAVIDSON, M. T., DEITCH, E. A., LU, Q., HASKO, G., ABUNGU, B., NEMETH, Z. H., ZAETS, S. B., GASPERS, L. D., THOMAS, A. P. & XU, D. Z. (2004). Traumahemorrhagic shock mesenteric lymph induces endothelial apoptosis that involves both caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. — Ann Surg 240, 123-31.
- DE VRIES, B., MATTHIJSEN, R. A., VAN BIJNEN, A. A., WOLFS, T. G. & BUURMAN, W. A. (2003). Lysophosphatidic acid prevents renal ischemia-reperfusion injury by inhibition of apoptosis and complement activation. — Am J Pathol 163, 47-56.
- DEB, S., MARTIN, B., SUN, L., RUFF, P., BURRIS, D., RICH, N., DEBREUX, S., AUSTIN,
  B. & RHEE, P. (1999). Resuscitation with lactated Ringer's solution in rats with hemorrhagic shock induces immediate apoptosis. J Trauma 46, 582-8; discussion 588-9.
- DEB, S., SUN, L., MARTIN, B., TALENS, E., BURRIS, D., KAUFMANN, C., RICH, N. & RHEE, P. (2000). Lactated ringer's solution and hetastarch but not plasma resuscitation after rat hemorrhagic shock is associated with immediate lung apoptosis by the up-regulation of the Bax protein. — J Trauma 49, 47-53; discussion 53-5.
- DEITCH, E. A., SHI, H. P., FEKETEOVA, E., HAUSER, C. J. & XU, D. Z. (2003). Hypertonic saline resuscitation limits neutrophil activation after trauma-hemorrhagic shock. Shock 19, 328-33.
- DUNHAM C. M., DAMIANO, A. M., WILES C. E. & CRUSHING, B. M. (1995). Posttraumatic multiple organ dysfunction syndrome-infection is an uncommon antecedent risk factor. Injury 26, 373-8.

- ELTZSCHIG, H. K. & COLLARD, C. D. (2004). Vascular ischaemia and reperfusion injury. Br Med Bull 70, 71-86.
- GOBE, G., WILLGOSS, D., HOGG, N., SCHOCH, E. & ENDRE, Z. (1999). Cell survival or death in renal tubular epithelium after ischemia-reperfusion injury. Kidney Int 56, 1299-304.
- GUAN, J., JIN, D.-D., JIN, L.-J. & LU, Q. (2002). Apoptosis in organs of rats in early stage after polytrauma combined with shock. J Trauma 52, 104-11.
- HARRIS, S. G., PADILLA, J., KOUMAS, L., RAY, D. & PHIPPS, R. P. (2002). Prostaglandins as modulators of immunity. Trends Immunol 23, 144-50.
- HATOUM, O. A., BASHENKO, Y., HIRSH, M. & KRAUSZ, M. M. (2002). Continuous fluid resuscitation for treatment of uncontrolled hemorrhagic shock following massive splenic injury in rats. Shock 18, 574-9.
- HENGARTNER, M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis. Nature 407, 770-6.
- HIETBRINK, F., KOENDERMAN, L., RIJKERS, G. T. & LEENEN, L. P. H. (2006). Trauma: the role of the innate immune system. World J Emerg Surg 1, 15.
- HOTCHKISS, R. S., OSMON, S. B., CHANG, K. C., WAGNER, T. H., COOPERSMITH, C.
  M. & KARL, I. E. (2005). Accelerated lymphocyte death in sepsis occurs by both the death receptor and mitochondrial pathways. J Immunol 174, 5110-8.
- ISHIBASHI, S., TAKEUCHI, H., FUJII, K., SHIRAISHI, N., ADACHI, Y. & KITANO, S. (2006). Length of laparotomy incision and surgical stress assessed by serum IL-6 level. — Injury 37, 247-51.
- JASKILLE, A., KOUSTOVA, E., RHEE, P., BRITTEN-WEBB, J., CHEN, H., VALERI, C. R., KIRKPATRICK, J. R. & ALAM, H. B. (2006). Hepatic apoptosis after hemorrhagic shock in rats can be reduced through modifications of conventional Ringer's solution.
   J Am Coll Surg 202, 25-35.
- KAUFMANN, S. H. & HENGARTNER, M. O. (2001). Programmed cell death: alive and well in the new millennium. — Trends Cell Biol 11, 526-34.

- KAWASAKI, T., HUBBARD, W. J., CHOUDHRY, M. A., SCHWACHA, M. G., BLAND, K. I. & CHAUDRY, I. H. (2006). Trauma-hemorrhage induces depressed splenic dendritic cell functions in mice. — J Immunol 177, 4514-20.
- KEEL, M. & TRENTZ, O. (2005). Pathophysiology of polytrauma. Injury 36, 691-709.
- KERR, J. F., WYLLIE, A. H. & CURRIE, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. — Br J Cancer 26, 239-57.
- KRAUSZ, M. M., BASHENKO, Y. & HIRSH, M. (2001). Crystalloid and colloid resuscitation of uncontrolled hemorrhagic shock following massive splenic injury. — Shock 16, 383-8.
- KRAUSZ, M. M. & HIRSH, M. (2003). Bolus versus continuous fluid resuscitation and splenectomy for treatment of uncontrolled hemorrhagic shock after massive splenic injury. — J Trauma 55, 62-8.
- KRAUSZ, M. M., SEMENIKHINA, L. & HIRSH, M. (2006). Lactated Ringer's solution and hypertonic saline improve survival in uncontrolled hemorrhagic shock in female rats in metestrus. — J Surg Res 132, 23-31.
- LENZ, A., FRANKLIN, G. A. & CHEADLE, W. G. (2007). Systemic inflammation after trauma. — Injury 38, 1336-45.
- LI, H., ZHU, H., XU, C.-J. & YUAN, J. (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. Cell 94, 491-501.
- LI, P., NIJHAWAN, D., BUDIHARDJO, I., SRINIVASULA, S. M., AHMAD, M., ALNEMRI, E.
   S. & WANG, X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. — Cell 91, 479-89.
- LOMAS-NIERA, J. L., PERL, M., CHUNG, C.-S. & AYALA, A. (2005). Shock and hemorrhage: an overview of animal models. Shock 24 Suppl 1, 33-9.
- LU, Q., XU, D.-Z., DAVIDSON, M. T., HASKO, G. & DEITCH, E. A. (2004). Hemorrhagic shock induces endothelial cell apoptosis, which is mediated by factors contained in mesenteric lymph. Crit Care Med 32, 2464-70.

- LU, Y.-Q., CAI, X.-J., GU, L.-H., FAN, Y.-J., WANG, Q. & BAO, D.-G. (2005). Effects of three fluid resuscitation methods on apoptosis of visceral organs in rats with hemorrhagic shock. — J Zhejiang Univ Sci B 6, 907-12.
- LU, Y.-Q., CAI, X.-J., GU, L.-H., WANG, Q., HUANG, W.-D. & BAO, D.-G. (2007). Experimental study of controlled fluid resuscitation in the treatment of severe and uncontrolled hemorrhagic shock. — J Trauma 63, 798-804.
- MARTINS, P. S., KALLAS, E. G., NETO, M. C., DALBONI, M. A., BLECHER, S. & SALOMAO, R. (2003). Upregulation of reactive oxygen species generation and phagocytosis, and increased apoptosis in human neutrophils during severe sepsis and septic shock. Shock 20, 208-12.
- MAURIZ, J. L., GONZALEZ, P., JORQUERA, F., OLCOZ, J. L. & GONZALEZ-GALLEGO, J. (2003). Caspase inhibition does not protect against liver damage in hemorrhagic shock. — Shock 19, 33-7.
- MENGER, M. D. & VOLLMAR, B. (2004). Surgical trauma: hyperinflammation versus immunosuppression? Langenbecks Arch Surg 389, 475-84.
- MODROW, S. & FALKE, D. (1998). Molekulare Virologie. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Berlin, Heidelberg.
- MOORE, F. A. & MOORE, E. E. (1995). Evolving concepts in the pathogenesis of postinjury multiple organ failure. Surg Clin North Am 75, 257-77.
- MURAO, Y., HATA, M., OHNISHI, K., OKUCHI, K., NAKAJIMA, Y., HIASA, Y., JUNGER, W.
  G., HOYT, D. B. & OHNISHI, T. (2003). Hypertonic saline resuscitation reduces apoptosis and tissue damage of the small intestine in a mouse model of hemorrhagic shock. Shock 20, 23-8.
- NAN, X., XI-CHUN, W., YOU-FANG, D., REN, L. & KUN-LUN, T. (2004). Effect of initial fluid resuscitation on subsequent treatment in uncontrolled hemorrhagic shock in rats. Shock 21, 276-280.
- OLTVAI, Z. N., MILLIMAN, C. L. & KORSMEYER, S. J. (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. — Cell 74, 609-19.

- OSUCHOWSKI, M. F., WELCH, K., SIDDIQUI, J. & REMICK, D. G. (2006). Circulating cytokine/inhibitor profiles reshape the understanding of the SIRS/CARS continuum in sepsis and predict mortality. J Immunol 177, 1967-74.
- PAXIAN, M., BAUER, I., RENSING, H., JAESCHKE, H., MAUTES, A. E. M., KOLB, S. A., WOLF, B., STOCKHAUSEN, A., JEBLICK, S. & BAUER, M. (2003). Recovery of hepatocellular ATP and "pericentral apoptosis" after hemorrhage and resuscitation. — Faseb J 17, 993-1002.
- PERL, M., CHUNG, C.-S. & AYALA, A. (2005). Apoptosis. Crit Care Med 33, S526-9.
- PERL, M., CHUNG, C.-S., PERL, U., LOMAS-NEIRA, J., DE PAEPE, M., CIOFFI, W. G. & AYALA, A. (2007). Fas-induced pulmonary apoptosis and inflammation during indirect acute lung injury. Am J Respir Crit Care Med 176, 591-601.
- POWERS, K. A., WOO, J., KHADAROO, R. G., PAPIA, G., KAPUS, A. & ROTSTEIN, O. D. (2003). Hypertonic resuscitation of hemorrhagic shock upregulates the antiinflammatory response by alveolar macrophages. — Surgery 134, 312-8.
- RAGALLER, M., THEILEN, H. & KOCH, T. (2007). [Therapeutic options to improve the microcirculation in sepsis and septic shock]. Hamostaseologie 27, 59-63.
- RANGER, A. M., MALYNN, B. A. & KORSMEYER, S. J. (2001). Mouse models of cell death. — Nat Genet 28, 113-8.
- ROBERTSON, J. D., ORRENIUS, S. & ZHIVOTOVSKY, B. (2000). Review: nuclear events in apoptosis. J Struct Biol 129, 346-58.
- ROTSTEIN, O. D. (2003). Modeling the two-hit hypothesis for evaluating strategies to prevent organ injury after shock/resuscitation. J Trauma 54, S203-6.
- ROUMEN, R. M., HENDRIKS, T., VAN DER VEN-JONGEKRIJG, J., NIEUWENHUIJZEN, G. A., SAUERWEIN, R. W., VAN DER MEER, J. W. & GORIS, R. J. (1993). Cytokine patterns in patients after major vascular surgery, hemorrhagic shock, and severe blunt trauma. Relation with subsequent adult respiratory distress syndrome and multiple organ failure. — Ann Surg 218, 769-76.
- SAKAHIRA, H., ENARI, M. & NAGATA, S. (1998). Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. Nature 391, 96-9.

- SCHIMMER, A. D. (2004). Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice. Cancer Res 64, 7183-90.
- SHI, Y. (2004). Caspase activation, inhibition, and reactivation: a mechanistic view. Protein Sci 13, 1979-87.
- SHIOZAKI, E. N. & SHI, Y. (2004). Caspases, IAPs and Smac/DIABLO: mechanisms from structural biology. Trends Biochem Sci 39, 486-94.
- SIEWERT, J. R. (2007). Basiswissen Chirurgie. Springer Medizin Verlag, Heidelberg
- ST. CLAIR, E. G., ANDERSON, S. J. & OLTVAI, Z. N. (1997). Bcl-2 counters apoptosis by Bax heterodimerization-dependent and -independent mechanisms in the T-cell lineage. — J Biol Chem 272, 29347-55.
- STENNICKE, H. R. & SALVESEN, G. S. (2000). Caspases controlling intracellular signals by protease zymogen activation. — Biochim Biophys Acta 1477, 299-306.
- SUNDAR, S. V., LI, Y.-Y., ROLLWAGEN, F. M. & MAHESHWARI, R. K. (2005). Hemorrhagic shock induces differential gene expression and apoptosis in mouse liver. — Biochem Biophys Res Commun 332, 688-96.
- TSCHOEKE, S. K. & ERTEL, W. (2007). Immunoparalysis after multiple trauma. Injury 38, 1346-57.
- UPPERMAN, J. S., DEITCH, E. A., GUO, W., LU, Q. & XU, D. (1998). Post-hemorrhagic shock mesenteric lymph is cytotoxic to endothelial cells and activates neutrophils. Shock 10, 407-14.
- WANG, Z.-B., LIU, Y.-Q. & CUI, Y.-F. (2005). Pathways to caspase activation. Cell Biol Int 29, 489-96.
- XU, Y. X., AYALA, A., MONFILS, B., CIOFFI, W. G. & CHAUDRY, I. H. (1997a). Mechanism of intestinal mucosal immune dysfunction following trauma-hemorrhage: increased apoptosis associated with elevated Fas expression in Peyer's patches. — J Surg Res 70, 55-60.
- XU, Y. X., WICHMANN, M. W., AYALA, A., CIOFFI, W. G. & CHAUDRY, I. H. (1997b).
   Trauma-hemorrhage induces increased thymic apoptosis while decreasing IL-3 release and increasing GM-CSF. J Surg Res 68, 24-30.

#### 7. Literaturverzeichnis/ 8. Erfolgte Publikationen

- YANG, R., MARTIN-HAWVER, L., WOODALL, C., THOMAS, A., QURESHI, N., MORRISON, D. & VAN WAY 3<sup>RD</sup>, C. (2007). Administration of glutamine after hemorrhagic shock restores cellular energy, reduces cell apoptosis and damage, and increases survival. — JPEN J Parenter Enteral Nutr 31, 94-100.
- ZHA, J., WEILER, S., OH, K. J., WEI, M. C. & KORSMEYER, S. J. (2000). Posttranslational N-myristoylation of BID as a molecular switch for targeting mitochondria and apoptosis. — Science 290, 1761-5.
- ZIEGENFUß, T. (2007). Notfallmedizin. Springer-Verlag GmbH, Berlin, Heidelberg.
- ZIMMERMANN, K. C. & GREEN, D. R. (2001). How cells die: apoptosis pathways. J Allergy Clin Immunol 108, S99-103.
- ZINKEL, S. S., HUROV, K. E., ONG, C., ABTAHI, F. M., GROSS, A. & KORSMEYER, S. J. (2005). A role for proapoptotic BID in the DNA-damage response. Cell 122, 579-91.
- ZUZARTE-LUIS, V. & HURLE, J. M. (2005). Programmed cell death in the embryonic vertebrate limb. Semin Cell Dev Biol 16, 261-9.

# 8. Erfolgte Publikationen

- HOSTMANN, A., JASSE, K., SCHULZE-TANZIL, G., ROBINSON, Y., OBERHOLZER, A., ERTEL, W. & TSCHOEKE, S. K. (2008). Biphasic onset of splenic apoptosis following hemorrhagic shock: critical implications for Bax, Bcl-2, and Mcl-1 proteins. — Crit Care 12, R8.
- HOSTMANN, A., JASSE, K., TSCHÖKE, S. K., ERTEL, W. & OBERHOLZER, A. (2007). Die posthämorrhagische Immunsuppression ist durch die zeitlich unterschiedliche Aktivierung von lymphozytären Apoptosewegen gekennzeichnet. Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie. 71. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie, Berlin.

9. Lebenslauf

In der elektronischen Version wurde diese Seite aus Datenschutzgründen entfernt.

# 10.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Veränderte Funktionen der Immunzellen nach einem hämorrhagischen Schock (verändert nach Chaudry et Ayala 1993).	_ 2
Abbildung 2: Pathophysiologie nach einem Trauma (verändert nach Moore et Moore 1995).	_ 4
Abbildung 3: Entstehung der Organdysfunktion nach der "Two-Hit"-Theorie (verändert nach Cobb et al. 2000).	_ 5
Abbildung 4: Übersicht der Stoffwechselwege, die zum Ischämie-Reperfusion-Schaden nach einem Trauma führen (verändert nach Keel et Trentz 2005).	_ 7
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Signalwege der Apoptose.	14
Abbildung 6: Differentielle Blutbild-Analyse der Lymphozytenanzahl (A) und Hämoglobinkonzentration (B) nach dem HS in Kontroll-Tieren (weiß), Sham-Tieren (grau) und HS-Mäusen (grün).	35
Abbildung 7: Blutbild-Analyse der Parameter Erythrozytenkonzentration (A) und Hämatokri (B) im hämorrhagischen Schockmodell der Maus in Kontroll-Tieren (weiß), Sham-Tieren (grau) und HS-Mäusen (grün).	it _36
Abbildung 8: (A) Lymphozyten- und (B) Hämoglobinkonzentration nach dem HS in Kontroll-Tieren (weiß), Sham-Tieren (grau) und HS-Mäusen (grün).	37
Abbildung 9: Differentielle Blutbildanalyse mit den Parametern A) Hämatokrit- und B) Erythrozytenkonzentration im HS-Modell der Maus	38
Abbildung 10: IL-6 Konzentration im Plasma in den HS-, Sham- und Kontroll-Tieren nach dem HS.	39
Abbildung 11: Analyse der frühen Apoptose in T-Lymphozyten der Milz nach dem HS durch Inkubation mit Annexin V	40
Abbildung 12: Nachweis der <i>in situ</i> DNA-Fragmentation 0 h, 24 h und 72 h nach dem HS mit der TUNEL-Methode.	41
Abbildung 13: Gating Strategie zur Auswertung der FACS-Analysen.	43
Abbildung 14 A-C: Analyse der Expression des Todesrezeptors TNF-R I auf den T-Zellen und deren Subpopulationen der Milz nach dem HS.	44
Abbildung 15: Analyse des TNF-Rezeptors I in T-Lymphozyten der Milz in Kontroll- Tieren.	45

Abbildung 16: Expression des extrinsischen CD120 $\alpha$ Todesrezeptors in der Milz nach dem HS. Dargestellt ist die Anzahl der CD3- und CD120 $\alpha$ -positiven T-Zellen in HS- und Sham-Tieren in der Zeitkinetik 0 h, 24 h und 72 h.	46
Abbildung 17: Expression des extrinsischen CD120α Todesrezeptors in der Milz nach dem HS. Dargestellt ist die Anzahl der CD4- und CD120α-positiven T-Zellen in HS- und Sham-Tieren in der Zeitkinetik 0 h, 24 h und 72 h.	47
Abbildung 18: Expression des extrinsischen CD120 $\alpha$ Todesrezeptors in der Milz nach dem HS. Dargestellt ist die Anzahl der CD8- und CD120 $\alpha$ -positiven T-Zellen in HS- und Sham-Tieren in der Zeitkinetik 0 h, 24 h und 72 h.	48
Abbildung 19: Expression des CD95 Proteins auf T-Lymphozyten nach dem HS in (A) CD3-positiven, in (B) in T-Helferzellen (zusätzlich CD4-positiv) und (C) in zyto-toxischen T-Lymphozyten (zusätzlich CD8-positiv) der Milz.	50
Abbildung 20: Expression des extrinsischen Fas-Rezeptors in T-Zellen der Kontroll-Tiere im hämorrhagischen Schockmodell der Maus. Es sind repräsentativ die Histogramme abgebildet, die die Expression des Rezeptorproteins in CD3-positiven T-Zellen (A), in T- Helferzellen (B) bzw. in zytotoxischen T-Zellen (C) beinhalten.	52
Abbildung 21: Gewebespezifische Aktivität der Kaspasen-3 und -7 nach hämorrhagischen Schock. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Kaspase-Aktivität 0 h, 24 h und 72 h nach Beendigung der HS-Operation in den HS-Tieren (grün) im Unterschied zu den Sham-Tieren (grau) und Kontroll-Tieren (weiß). Es wird die Kaspase-Aktivität in der Leber A), in der Lunge B), in der Milz C) und in der Niere D) gezeigt.	_ 54
Abbildung 22: HS-induzierte Aktivität der Initiatorkaspase-8 in der Leber (A), in der Lunge (B), Milz (C) und Niere (D) zu den Zeitpunkten t = 0 h, 24 h, 72 h nach hämorrhagischen Schock. Die enzymatische Aktivität in den HS-Tieren (grün) ist im Vergleich zu den Kontroll-Tieren (weiß) und den Sham-Tieren (grau) dargestellt.	56
Abbildung 23: Aktivierung der Kaspase-9 in der Leber (A), in der Lunge (B), Milz (C) und Niere (D) nach dem HS zu den Zeitpunkten t = 0 h, 24 h und 72 h.	58
Abbildung 24 A-D: HS-induzierte organspezifische Expressionsmuster des mitochon- drialen <i>bcl-2</i> in den verschiedenen Organen in der Zeitkinetik 0 h, 24 h, 72 h. Dargestellt ist die relative Expression von <i>bcl-2</i> in der A) Leber, B) Lunge, C) Milz und D) Niere.	60
Abbildungen 25 A-D: Expression des mitochondrialen Gens <i>bax</i> in den Organen A) Leber, B) Lunge, C) Milz und D) Niere zu den Zeitpunkten 0 h, 24 h, 72 h in den HS-Tieren (grüne Balken), Sham-Tieren (graue Säulen) und den Kontroll-Mäusen (weißer Balken)	62
Abbildung 26: Exemplarisches Beispiel der Western Blot-Analysen zur Expression des mitochondrialen Bcl-2 nach dem HS in Kontroll-Tieren, Sham- und HS-Tieren. Die Untersuchungen zeigen die Proteinexpression in A) der Milz und B) der Leber.	64
Abbildung 27: Exemplarisches Beispiel der Western Blot-Analysen zur Expression des mitochondrialen Bcl-2 nach dem HS in Kontroll-Tieren, Sham- und HS-Tieren. Die Untersuchungen zeigen die Proteinexpression in A) der Niere und B) der Lunge.	65

Abbildung 28: Exemplarisches Beispiel der Western Blot-Analysen zur Expression des Bax nach dem HS in Kontroll-Tieren, Sham- und HS-Tieren. Die Untersuchungen zeigen die Proteinexpression in A) der Milz, B) der Leber.	_ 67
Abbildung 29: Exemplarisches Beispiel der Western Blot-Analysen zur Expression des Bax nach dem HS in Kontroll-Tieren, Sham- und HS-Tieren. Die Untersuchungen zeigen die Proteinexpression in A) der Niere und B) der Lunge.	_ 68
Abbildung 30: Expression des CD120α Rezeptors in den T-Zellen (A) und deren Subpopulationen CD4 <sup>+</sup> -T-Zellen (B) und CD8 <sup>+</sup> -T-Zellen (C) in der Milz nach der Laparo- tomie. Grüne Balken= HS-Tiere; rote Balken= HS-Mäuse mit zusätzlicher Laparotomie; weiße Balken= Kontroll-Tiere.	70
Abbildung 31: Expression des Fas-Rezeptors in T-Lymphozyten der Milz nach der Laparotomie in Kontroll-, HS- und Laparotomie-Tieren.	72
Abbildung 32: Einfluss der zusätzlichen Laparotomie auf die HS-induzierte Apoptose. Die Laparotomie wurde 24 h nach dem HS durchgeführt. Die Aktivierung der Kaspase-8 wurde in den Laparotomie-Tieren (HS + Laparotomie; rote Balken) gegenüber den HS-Tieren (grüne Säulen) und den Kontroll-Tieren (weiße Balken) untersucht.	73
Abbildung 33: Aktivität der Kaspasen-3 und -7 nach der Laparotomie in (A) der Milz, (B) der Niere und der Kaspase-9 in (C) der Milz, (D) der Niere. Die Aktivierung der Kaspasen wurde in den Laparotomie-Tieren (HS + Laparotomie; rote Balken) gegenüber den HS-Tieren (grüne Säulen) und den Kontroll-Tieren (weiße Balken) untersucht.	74

# 10.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Primäre Immunglobuline gegen Maus und die entsprechenden	
Isotypkontrollen	24
Tabelle 2: Sekundäre Immunglobuline der Durchflusszytometrie	24
Tabelle 3: Primäre Immunglobuline, die gegen Epitope der Maus gerichtet sind	24
Tabelle 4: Sekundäre Immunglobuline (IgG)	25
Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Primer	25
Tabelle 6: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele	26
Tabelle 7: Inkubationsprotokoll der RTD-PCR	34
Tabelle 8: Expression des Fas-Rezeptors in T-Lymphozyten der Milz nach dem HS	53

# Erklärung

Ich erkläre hiermit, die vorliegende Arbeit selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln und Hilfen verfasst zu haben.

Kerstin Jasse