

Aus dem  
CharitéCentrum 7 für Anästhesiologie und Intensivmedizin  
Klinik für Anästhesiologie mit Schwerpunkt operative Intensivmedizin  
Direktorin: Univ.-Prof. Dr. med. Claudia D. Spies

## **Habilitationsschrift**

### **Sauerstofftransport im Blut und in der Atmungskette: Untersuchungen endogener Schutzmechanismen gegen Hämoglobintoxizität und oxidativen Stress**

Zur Erlangung der Lehrbefähigung für das Fach  
Anästhesiologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

**Dr. med. Jan Adriaan Graw**

Eingereicht: Mai 2017

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Axel R. Pries

1. Gutachter/in: Univ.-Prof. Dr. med. Rolf Rossaint

2. Gutachter/in: Univ.-Prof. Dr. med. univ. Michael Hiesmayr

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Sauerstoff	1
1.2	Zellatmung und Atmungskette	2
1.3	Die Atmungskette als Quelle reaktiver Sauerstoffverbindungen	3
1.4	Endogene Protektion gegen reaktive Sauerstoffverbindungen	3
1.5	Uncoupling Proteine	4
1.6	Sauerstoffversorgung der Zellen	4
1.7	Pathophysiologie des freien Hämoglobins und Häms	5
1.8	Endogene Protektion gegen die Hämolyseprodukte Hämoglobin und Häm	6
1.9	Die Bedeutung der Hämolyse bei intensivmedizinischen Erkrankungen	6
1.10	Zielsetzung	7
<b>2</b>	<b>Zusammenfassung der Ergebnisse eigener Arbeiten</b>	<b>8</b>
2.1	Haptoglobin oder Hemopexin als therapeutische Option bei Transfusion von prolongiert gelagerten Erythrozytenkonzentraten	8
2.2	Pulmonalarterieller Hypertonus nach Transfusion prolongiert gelagerter Erythrozytenkonzentrate und mögliche Therapieoptionen durch eine Behandlung der Blutkonserven mit Stickstoffmonoxid	26
2.3	Haptoglobin als therapeutische Option gegen Hämoglobin-induzierte Hypertension bei gesundem Endothel, jedoch nicht bei endothelialer Dysfunktion	40
2.4	Eisenüberladung stört die mitochondriale Homöostase, verstärkt die mitochondriale Produktion freier Radikale und steigert die Inflammationsantwort auf Lipopolysaccharide.	50
2.5	Uncoupling Proteine als therapeutische Option gegen oxidativen Zellstress im Gehirn	67

2.6	Uncoupling Proteine als therapeutische Option gegen oxidativen Zellstress in Leber und Lunge	75
<b>3</b>	<b>Diskussion</b>	<b>81</b>
	Die Problematik der Transfusion von prolongiert gelagerten Erythrozytenkonzentraten	81
	Tiermodelle zur Simulation der Transfusion prolongiert gelagerter Erythrozytenkonzentrate	82
	Haptoglobin zur Therapie der mit zellfreiem Hämoglobin assoziierten hämodynamischen Nebenwirkungen	83
	Haptoglobin zur Prophylaxe der mit zellfreiem Hämoglobin assoziierten renalen Nebenwirkungen	84
	Die Bedeutung einer erhöhten Zufuhr von freiem Eisen für die Stimulation des oxidativen Stresses	86
	Die Bedeutung der Uncoupling Proteine im Kontext vermehrten oxidativen Stresses und als mögliche Kandidaten eines intrazellulären Schutzes vor übermäßiger Synthese von freien Radikalen	86
	Perspektive für die Translation der grundlagenwissenschaftlichen Ergebnisse in die klinische Anwendung	88
<b>4</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>90</b>
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>92</b>
<b>6</b>	<b>Danksagung</b>	<b>99</b>
<b>7</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>100</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
ARDS	„Acute Respiratory Distress Syndrome“
ATP	Adenosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
HBOC	„Hemoglobin-based oxygen carriers“ - künstliche Sauerstoffträger auf Hämoglobinbasis
LDL	Low Density Lipoprotein
LRP1	LDL receptor-related Protein 1
NO	Stickstoffmonoxid
ROS	„Reactive oxygen species“ – reaktive Sauerstoffverbindungen
UCP	Uncoupling Protein

# 1 Einleitung

Der Abbau von Glukose unter Verbrauch von Sauerstoff und die damit erfolgende chemische Energieumwandlung ist der wichtigste Stoffwechselprozess im menschlichen Körper und Grundlage unseres Lebens. Dieser als „aerobe Glykolyse“ bezeichnete Prozess des Energiestoffwechsels ist notwendig für die Erhaltung und Funktion fast jeder Zelle des menschlichen Organismus. Sauerstoff wird aus der Luft über die Lungen in den menschlichen Körper aufgenommen und dort in das Blut auf spezielle Transportzellen übertragen. Mit Hilfe des Blutkreislaufes können alle Zellen des Organismus unter physiologischen Bedingungen ausreichend mit Sauerstoff versorgt werden. In der Zelle selbst setzt sich der Sauerstofftransport über mehrere Enzymsysteme fort, so dass schließlich in der Reaktion mit Glukose der chemische Energieträger Adenosintriphosphat (ATP) generiert wird. Sauerstoff selbst sowie die den Sauerstoff im Blut und in den Zellen transportierenden funktionellen Einheiten der Proteine sind sehr reaktionsfreudig. Daher können während des intravaskulären und intrazellulären Sauerstofftransportes unerwünschte physikochemische Reaktionen ablaufen und für den Organismus schädliche Reaktionsprodukte entstehen. In dieser Synopsis sind eigene wissenschaftliche Untersuchungen zusammengestellt, die sich mit den physiologischen Grundlagen einiger der Komplikationen des intravaskulären und intrazellulären Sauerstofftransportes sowie dem körpereigenen Schutzprogramm gegenüber diesen Komplikationen mit Hilfe spezieller endogener Proteine auseinandersetzen.

## 1.1 Sauerstoff

Sauerstoff ist nach Eisen das häufigste Element auf der Erde (Allegre et al., 2001). Die Hälfte der Erdhüllenmasse besteht aus diesem Element und zusammen mit Wasserstoff bildet Sauerstoff Wasser, das als wichtigste Komponente des menschlichen Organismus ca. 70% seiner Masse ausmacht (Allegre et al., 2001; Watson et al., 1980). Sauerstoff ist neben Wasserstoff, Kohlenstoff und Stickstoff Teil der vier Elemente, die als Hauptbestandteil der organischen Verbindungen die Grundlage für die meisten Lebensvorgänge bilden (Frieden, 1972). In elementarer Form findet man Sauerstoff zumeist als Homodimer vor, einer Verbindung zweier Sauerstoff-Atome (Gaworzewski et al., 1981). Man geht davon aus, dass vor 2,3 bis 3 Milliarden Jahren in den Ozeanen lebende Cyanobakterien mit der Photosynthese

zur chemischen Energiegewinnung begannen und als „Abfallprodukt“ Sauerstoff produzierten (Flannery et al., 2012). Der Sauerstoff reagierte zunächst mit den ihn umgebenden Elementen, insbesondere Eisen und Schwefel (Crowe et al., 2013). Nachdem diese Verbindungen gesättigt waren, reicherte sich der weiterhin von den Cyanobakterien produzierte Sauerstoff in den Ozeanen und danach auf den Landflächen an, um nach deren Aufsättigung schließlich in die Atmosphäre „auszugasen“ (Crowe et al., 2013; Holland, 2006). Die großen Mengen an elementarem Sauerstoff ermöglichten nun mit Hilfe der aeroben Zellatmung einen viel effektiveren und ertragreicheren Stoffwechselweg zur chemischen Energiegewinnung als die Stoffwechselwege, die unter anaeroben Bedingungen möglich waren (Rich, 2003). In der Folge begannen die Lebewesen in Größe und Komplexität zuzunehmen. Es entwickelten sich die Eukaryoten, in denen die Zelle in verschiedenen, mit Spezialaufgaben betrauten Kompartimenten organisiert wurde. Schließlich begannen sich vor 1,5 Milliarden Jahren die ersten Mehrzeller zu entwickeln, aus denen vor weniger als einer Millionen Jahren die direkten Vorfahren des modernen Menschen hervorgingen (Sperling et al., 2013).

## **1.2 Zellatmung und Atmungskette**

„Zellatmung“ bzw. das Synonym „innere Atmung“ beschreibt intrazelluläre Stoffwechselprozesse, bei denen mittels Oxydation aus energiereichen Verbindungen wie der Glukose der universelle chemische Energieträger ATP generiert wird. Mit Hilfe von Sauerstoff können bei der Zellatmung aus einem Molekül Glukose bis zu 38 Moleküle ATP generiert werden (Rich, 2003). Dies ist ein Vielfaches mehr als die zwei ATP-Moleküle, die bei der anaeroben Glykolyse aus einem Glukosemolekül entstehen (Rich, 2003). Die Zellatmung setzt sich dabei aus vier Teilprozessen zusammen:

1. Glykolyse
2. oxidativer Decarboxylierung
3. Citratzyklus
4. Endoxidation in der Atmungskette

Mit Ausnahme der Glykolyse, die im Zytoplasma abläuft, sind alle Reaktionsprozesse im Mitochondrium lokalisiert. Hier wird von der ATP-Synthase, während des

Prozesses der Endoxidation in der Atmungskette, auch die größte ATP-Ausbeute innerhalb des Gesamtprozesses der Zellatmung synthetisiert.

Mitochondrien sind Zellorganellen, die von einer Doppelmembran umschlossen sind und als primäre Aufgabe die Synthese von ATP leisten. Die ATP-Synthese findet dabei mit Hilfe der in der inneren Mitochondrienmembran lokalisierten Enzymsysteme der Atmungskette statt (Rich, 2003). Die Atmungskette besteht aus vier Enzymkomplexen sowie Coenzym Q und Cytochrom c, die über jeweils einzelne Redoxprozesse einen Transport von Elektronen innerhalb der inneren Mitochondrienmembran bewirken (Rich, 2003). Diese Prozesse sind zusätzlich mit der Aufnahme und Abgabe von Protonen vergesellschaftet, so dass es im Verlauf der Zellatmung zu einer Anreicherung von Protonen im Intermembranraum und der konsekutiven Ausbildung eines Protonengradienten über der inneren Mitochondrienmembran kommt (Rich, 2003). Die ebenfalls in der inneren Mitochondrienmembran gelegene ATP-Synthase nutzt dann das Protonengefälle, um aus Adenosindiphosphat (ADP) und Phosphat die Synthese von ATP zu katalysieren (Saraste, 1999).

### **1.3 Die Atmungskette als Quelle reaktiver Sauerstoffverbindungen**

In der Atmungskette sind multiple Enzymsysteme daran beteiligt, im Rahmen von Redoxreaktionen Elektronen auf Sauerstoffatome zu übertragen. Insbesondere an den Komplexen I und IV können in diesem Zusammenhang reaktive Sauerstoffverbindungen (reactive oxygen species - ROS) wie Wasserstoffperoxid oder Hydroxyl- und Superoxid-Radikale entstehen (Boveris et al., 1973; Kirkinezos et al., 2001). Eine Akkumulation dieser ROS führt zu gesteigerter Proteinoxidation, Lipidperoxidation und Schädigungen der DNA (Sies, 1986). Eine Stoffwechsellage mit unphysiologisch hohen Mengen an ROS wird als „oxidativer Stress“ bezeichnet (Sies, 1986). Oxidativer Stress und Akkumulation reaktiver Sauerstoffverbindungen wird mit einer Vielzahl systemischer Erkrankungen und pathophysiologischer Prozesse in Verbindung gebracht, wie Inflammation, Arteriosklerose, neurodegenerativen Erkrankungen oder Diabetes mellitus (Sugamura et al., 2011).

### **1.4 Endogene Protektion gegen reaktive Sauerstoffverbindungen**

Der Organismus schützt sich gegen eine übermäßige Produktion von ROS mit organischen Verbindungen, Proteinen und Enzymsystemen, die allgemein als

Antioxidantien bezeichnet werden (Sies, 1993). Endogen wichtige Antioxidantien sind z.B. das Peptid Glutathion, die Proteine Albumin, Transferrin, Hemopexin und Haptoglobin und Enzyme wie Katalasen, Peroxidasen und die Superoxidismutase sowie Stickstoffmonoxid (NO) (Sies, 1993). Zu den bekannten exogenen Antioxidantien gehören z.B. die Vitamine Ascorbinsäure, Tocopherol und Betacarotin (Boaz et al., 2000; Kris-Etherton et al., 2004). Zu Beginn dieses Jahrhunderts kristallisierte sich eine weitere Gruppe von Transmembranproteinen der inneren Mitochondrienmembran als protektiv gegen eine übermäßige Produktion von ROS hervor, die Uncoupling Proteine (UCPs).

### **1.5 Uncoupling Proteine**

UCPs sind mitochondriale Proteine, die in der Lage sind, die Atmungskette zu entkoppeln, also den Protonengradienten über der inneren Mitochondrienmembran ohne begleitende ATP-Synthese zu schwächen bzw. abzubauen. Es existieren fünf Isoformen der UCPs, von denen UCP-1 unter dem Namen Thermogenin am längsten bekannt ist und ausschließlich in braunem Fettgewebe exprimiert wird (Ricquier et al., 2000). Während UCP-2 ubiquitär und in besonders großen Mengen in Darm, Lunge und Milz nachweisbar ist, findet sich UCP-3 selektiv in Skelettmuskel und braunem Fettgewebe (Ricquier et al., 2000). UCP-4 und UCP-5 sind bisher ausschließlich im Gehirn detektiert worden (Hoang et al., 2012). UCP-1 entkoppelt in den Mitochondrien des braunen Fettgewebes die Zellatmung, so dass die über die Redoxvorgänge umgewandelte Energie nicht zu ATP sondern in Wärme umgesetzt wird (Ricquier, 2017). Die Funktion der übrigen UCPs ist bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Sicher scheint bisher, dass allen UCPs eine regulatorische Funktion bei der Produktion von ROS in der Atmungskette zukommt, da eine vergrößerte „Protonenleckage“ in der inneren Mitochondrienmembran mit einer reduzierten Genese an ROS einhergeht (Ricquier et al., 2000). Die Rolle der UCPs bei Zell-Zell-Interaktionen, Inflammation und systemischen Erkrankungen, wie Diabetes mellitus, Herzinsuffizienz oder neurodegenerativen Erkrankungen sind weiter Gegenstand der aktuellen Forschung (Busiello et al., 2015).

### **1.6 Sauerstoffversorgung der Zellen**

Ein Grundmerkmal vielzelliger Organismen ist die zunehmende Differenzierung und Spezialisierung der einzelnen Zellen. Diese organisieren sich dann auf der

makroskopischen Ebene wiederum in Organen und Organsystemen. Aufgrund der Größe der Vielzeller der höheren Entwicklungsstufen kann der Sauerstoff aus der Atmosphäre nicht mehr zu jeder einzelnen Zelle per Diffusion vordringen. Beim Menschen bildet sich daher schon in der dritten Woche der Embryonalentwicklung das Blutgefäßsystem, ein Transportsystem, das den Sauerstoff von spezialisierten Zellen/Organen der „äußeren Atmung“ zu allen anderen Zellen des Organismus für deren jeweilige „innere Atmung“ transportiert (Cumano et al., 2007). Angetrieben vom Pumpensystem des Herzens zirkuliert im Blutgefäßsystem das Blut, eine Körperflüssigkeit, die je etwa zur Hälfte aus spezialisierten Zellen und dem proteinreichen Plasma besteht. Neben dem Transport von Sauerstoff erfüllt Blut weitere überlebenswichtige Transport- und Kommunikationsfunktionen. Mit den Erythrozyten stehen für den Sauerstofftransport in jedem Mikroliter Blut 4,5 bis 5,5 Millionen spezielle kern- und mitochondrienlose Zellen zur Verfügung. Ca. 90% der Trockenmasse des Erythrozyten besteht aus Hämoglobin, einem tetrameren Proteinkomplex mit je zwei  $\alpha$ - und zwei  $\beta$ -Globin-Untereinheiten, von denen jede ein Häm-Molekül bindet (Perutz et al., 1960). Durch die spezielle Formation der Globin-Untereinheiten ist das Eisenatom innerhalb des Häm-Moleküls in der Lage, reversibel Sauerstoff zu binden (Hoppe-Seyler, 1866). Jedes Hämoglobinmolekül kann somit insgesamt vier Homodimere an Sauerstoffatomen binden und transportieren.

### **1.7 Pathophysiologie des freien Hämoglobins und Häms**

Im Erythrozyten sind die Hämoglobinmoleküle von der Erythrozytenmembran umschlossen, was ihre direkte Interaktion mit Plasma und endothelialen Strukturen limitiert (Nakai et al., 1998). Wird die Erythrozytenmembran im Rahmen der Hämolyse beschädigt, kommt es zur Freisetzung von Hämoglobin in das Blutplasma. Der Hämoglobin-Tetramer zerfällt in zwei Dimere aus je einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit. Im Gefäßsystem und perivaskulär wirkt zellfreies Hämoglobin als toxische Substanz. Durch seine hohe Affinität zu NO verursacht es eine Depletion von endothelial generiertem NO und eine damit assoziierte Vasokonstriktion (Yu et al., 2008). Weiterhin verursacht zellfreies Hämoglobin bzw. das von ihm freigesetzte hochreaktive freie Häm oxidativen Stress, Inflammation, fördert die Thrombozytenaggregation und führt zur Schädigung von Zellmembranen,

Plasmaproteinen, Lipiden und ganzen Geweben (Balla et al., 1991; Donadee et al., 2011; Villagra et al., 2007).

### **1.8 Endogene Protektion gegen die Hämolyseprodukte Hämoglobin und Häm**

Säugetiere besitzen zwei hepatisch synthetisierte Glykoproteine, die die Aufgabe haben, zellfreies Hämoglobin und freies Häm zu binden und aus dem Gefäßsystem zu entfernen, Haptoglobin und Hemopexin (Schaer et al., 2013).

Hämoglobin-Dimere werden von Haptoglobin gebunden, einem Proteindimer, das im Menschen in drei verschiedenen Isoformen vorkommt, Hp 1-1, Hp 1-2 und Hp 2-2 (Nielsen et al., 2009). Die Hämoglobin-Haptoglobinbindung ist eine der stärksten bekannten Protein-Proteinbindungen im menschlichen Organismus (Hwang et al., 1980). Weiterhin kann Haptoglobin bei fast allen Säugeretieren nachgewiesen werden, was als weiterer Hinweis auf die entwicklungsgeschichtliche Relevanz dieses Proteins bzw. der Problematik der Hämolyse allgemein zu werten ist (Wicher et al., 2006). Durch die Bindung an Haptoglobin ist der Hämoglobin-Dimer nicht mehr in der Lage, die Endothelbarriere zu passieren oder das Häm-Molekül zu liberalisieren (Bunn et al., 1968; Schaer et al., 2013). Der Komplex aus Haptoglobin und Hämoglobin wird, vermittelt über den spezifischen CD163-Rezeptor, von Makrophagen in Leber und Milz aufgenommen und aus dem Blutplasma eliminiert (Thomsen et al., 2013).

Das hochreaktive freie Häm kann von verschiedenen Plasmaproteinen, insbesondere dem Albumin gebunden werden. Allerdings existiert mit Hemopexin ein spezifischer Häm-Binder mit extrem hoher Bindungsaffinität (Sato et al., 1994). Durch die Bindung an Hemopexin werden die pro-oxidativen und pro-inflammatorischen Effekte des freien Häms blockiert, und der Komplex wird, vermittelt über das LDL Receptor-related Protein 1 (LRP1), durch die Leber aus dem Blutplasma eliminiert (Hvidberg et al., 2005; Schaer et al., 2013).

### **1.9 Die Bedeutung der Hämolyse bei intensivmedizinischen Erkrankungen**

Neben den genetisch bedingten hämolytischen Erkrankungen wie der Sichelzellerkrankung und den Thalassämien bzw. neben Infektionserkrankungen wie der Malaria ist die intravasale Hämolyse eine relevante Komplikation vielfältiger intensivmedizinisch relevanter Krankheitsbilder und kann auch Folge von

Therapiemaßnahmen sein (Schaer et al., 2013). Die Transfusion von länger gelagerten Erythrozytenkonzentraten, extrakorporale Therapieverfahren, wie z.B. der kardiopulmonale Bypass (Herz-Lungen-Maschine), aber auch die Sepsis oder das schwere akute Lungenversagen (ARDS), sind mit erhöhten Hämolyseparametern assoziiert (Hod et al., 2011; Schaer et al., 2013). Hohe Plasmakonzentrationen zellfreien Hämoglobins und Häms sind dabei mit vermehrten Komplikationen bzw. schwereren Erkrankungsverläufen vergesellschaftet. Besonders vulnerabel scheinen hier Organe wie die Nieren oder Lungen, das Gefäß- und das Immunsystem (Berra et al., 2014; Gladwin et al., 2004; Koch et al., 2008; Vermeulen-Windsant et al., 2014). Gegenwärtig haben noch keine spezifischen Therapieverfahren zur Prävention bzw. Behandlung der durch vermehrte Hämolyse verursachten Komplikationen Eingang in die klinische Routine gefunden.

### **1.10 Zielsetzung**

In der vorliegenden Synopsis sind grundlagenwissenschaftliche Arbeiten zusammengefasst, die sich mit Komplikationen des intravasalen und intrazellulären Sauerstofftransports beschäftigen. Weiterhin werden in den Arbeiten evolutionsgeschichtlich wichtige körpereigene Proteine untersucht, die mit dem Sauerstofftransport assoziierte Komplikationen (oxidativer Stress) verhindern können bzw. regulatorisch in den Pathomechanismus eingreifen. Zusätzlich wird in den Arbeiten auch die therapeutische Anwendung endgener Schutzproteine (Haptoglobin und Hemopexin) analysiert.

## **2 Zusammenfassung der Ergebnisse eigener Arbeiten**

### **2.1 Haptoglobin oder Hemopexin als therapeutische Option bei Transfusion von prolongiert gelagerten Erythrozytenkonzentraten**

**Hintergrund:** Während der Lagerung von Erythrozytenkonzentraten kommt es zu biochemischen und morphologischen Veränderungen der Erythrozyten, die mit einer Beschädigung der Integrität der Erythrozytenmembran einhergehen. Aufgrund von vermehrter Hämolyse steigen die Plasmakonzentrationen von zellfreiem Hämoglobin und extrazellulärem Häm nach Empfang einer Transfusion von prolongiert gelagerten Erythrozytenkonzentraten. Nach hämorrhagischem Schock sind daher perfusionsempfindliche Organe wie z.B. die Nieren nicht nur aufgrund der Hypoperfusion während des Schocks, sondern auch durch die hohen Plasmakonzentrationen an zellfreiem Hämoglobin und Häm gefährdet. Im menschlichen Organismus sind die Hämoglobin- und Häm-Bindeproteine Haptoglobin und Hemopexin in der Lage, zellfreies Hämoglobin und Häm zu binden und aus dem Plasma zu entfernen.

**Zielsetzung:** In einem murinen Transfusionsmodell, das die maximal erlaubte 42-tägige Lagerungsdauer humaner Erythrozytenkonzentrate imitiert, wurden Überlebensraten, systemische Inflammation und Nierenfunktion nach einem hämorrhagischen Schock mit einer zweistündigen kontrollierten Hypotension und nachfolgender Transfusion von entweder frischen oder prolongiert gelagerten murinen Erythrozytenkonzentraten verglichen. In weiteren Versuchsgruppen wurde untersucht, ob eine Co-Infusion mit Haptoglobin oder Hemopexin protektive Auswirkungen auf das Überleben, die Inflammation und die Nierenfunktion nach zweistündigem hämorrhagischem Schock und anschließender Transfusion muriner Erythrozytenkonzentrate hatte.

**Ergebnisse und Schlussfolgerung:** Mäuse, die nach hämorrhagischem Schock eine Transfusion mit prolongiert gelagerten Erythrozytenkonzentraten erhielten, zeigten eine höhere Mortalität, eine vermehrte Inflammation sowie eine Hämoglobinurie und schwerere Nierenschädigung als Mäuse, die frische Erythrozytenkonzentrate erhielten. Co-Infusion mit Haptoglobin oder Hemopexin war mit einem deutlichen Überlebensvorteil nach Transfusion prolongiert gelagerter

Erythrozytenkonzentrate vergesellschaftet. Weiterhin konnte durch Co-Infusion von Haptoglobin die durch die Transfusion von prolongiert gelagerten Erythrozytenkonzentraten induzierte Hämoglobinurie sowie der gesteigerte Nierenschaden verhindert werden.

Das therapeutische Potential der beiden natürlich vorkommenden Plasmaproteine Haptoglobin und Hemopexin könnte somit möglicherweise bei Erkrankungen und Therapieverfahren, die mit einer schwerer Hämolyse nach prolongierter Hypotension vergesellschaftet sind, nutzbar sein.

**Platzhalter:**

**Graw JA, Mayeur C, Rosales I, Liu Y, Sabbisetti VS, Riley FE, Rechester O, Malhotra R, Warren HS, Colvin RB, Bonventre JV, Bloch DB, Zapol WM.** Haptoglobin or Hemopexin Therapy Prevents Acute Adverse Effects of Resuscitation After Prolonged Storage of Red Cells. *Circulation*. 2016;134(13):945-60.

PMID: 27515135

<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.115.019955>

## **2.2 Pulmonalarterieller Hypertonus nach Transfusion prolongiert gelagerter Erythrozytenkonzentrate und mögliche Therapieoptionen durch eine Behandlung der Blutkonserven mit Stickstoffmonoxid**

**Hintergrund:** Zellfreies Hämoglobin, das durch Hämolyse im Zuge der Transfusion prolongiert gelagerter Erythrozytenkonzentrate ins Plasma freigesetzt wird, bindet endothelial synthetisiertes NO mit hoher Affinität und erzeugt so eine Vasokonstriktion. Gerade das Niederdrucksystem der Pulmonalstrombahn zeigt sich sensibel für Änderungen in der NO-Homöostase. Es ist bekannt, dass eine Therapie des Transfusionsempfängers mit inhalativem NO den mit der Transfusion prolongiert gelagerter Erythrozytenkonzentrate einhergehenden pulmonalarteriellen Blutdruckanstieg vermindern kann.

**Zielsetzung:** Im Rahmen dieser Studie wurde der Frage nachgegangen, ob auch eine *ex vivo* Behandlung der Erythrozytenkonzentrate mit NO den pulmonalarteriellen Blutdruckanstieg verhindern kann. Unter kontinuierlichem invasivem Monitoring der pulmonalen und systemischen Hämodynamik erhielten wache Polypay Schafe eine Transfusion autologer, prolongiert gelagerter Erythrozytenkonzentrate, die unmittelbar vor der Transfusion entweder mit gasförmigem NO oder mit NO-freisetzenden Molekülen behandelt wurden. Eine weitere Versuchsgruppe erhielt Erythrozytenkonzentrate, die vor der Transfusion gewaschen wurden. Mit Hilfe chemisch markierter Erythrozyten wurde die *in vivo* Überlebensdauer der Erythrozyten gemessen.

**Ergebnisse und Schlussfolgerung:** Beide Methoden der NO-Behandlung, nicht aber das Waschen der Erythrozytenkonzentrate, konnten den durch zellfreies Hämoglobin induzierten pulmonalarteriellen Blutdruckanstieg verhindern. Die *ex vivo* NO Therapie führte dabei zu einer Oxidation des freien Hämoglobins zu Methämoglobin, welches nicht mehr in der Lage ist, NO zu binden. NO Behandlung führte zudem zu einer verbesserten *in vivo* Überlebensdauer der Erythrozyten innerhalb der ersten 24 Stunden nach Transfusion. Während dieser Zeitspanne nach Transfusion gingen 25% der aus prolongiert gelagerten Erythrozytenkonzentraten transfundierten Erythrozyten aus der Zirkulation verloren.

Der durch die Transfusion prolongiert gelagerter Erythrozytenkonzentrate ausgelöste pulmonale Hypertonus lässt sich somit auch mit einer *ex vivo* Behandlung mit NO bzw. NO-freisetzenden Molekülen verhindern.

**Platzhalter:**

**Muenster S, Beloiartsev A, Yu B, Du E, Abidi S, Dao M, Fabry G, Graw JA, Wepler M, Malhotra R, Fernandez BO, Feelisch M, Bloch KD, Bloch DB, Zapol WM.**

Exposure of Stored Packed Erythrocytes to Nitric Oxide Prevents Transfusion-associated Pulmonary Hypertension. *Anesthesiology*. 2016 Nov;125(5):952-963.

PMID: 27517645

<https://doi.org/10.1097/ALN.0000000000001294>

### **2.3 Haptoglobin als therapeutische Option gegen Hämoglobin-induzierte Hypertension bei gesundem Endothel, jedoch nicht bei endothelialer Dysfunktion**

**Hintergrund:** Wie in Kapitel 2.2 beschrieben, weist zellfreies Hämoglobin eine sehr hohe Affinität zu NO auf. Im Rahmen der NO-Deoxygenierungsreaktion entstehen aus dem zweiwertigen Eisenion des Hämoglobinmoleküls und NO dreiwertiges Eisen und Nitrat. Die intravasale Verstoffwechslung und Depletion des von den Endothelzellen synthetisierten NO führt in der Folge zu einer Vasokonstriktion. Wie in Kapitel 2.1 dargelegt, existieren im menschlichen Organismus mit dem Hämoglobin-Bindeprotein Haptoglobin und dem Häm-Binder Hemopexin zwei Proteine, die mit hoher Affinität zellfreies Hämoglobin bzw. freies Häm binden und aus dem Plasma eliminieren. So bestand die Hypothese, dass mit Hilfe dieser Proteine alternativ zum Einsatz einer patientenseitigen Therapie mit inhalativ appliziertem NO bzw. einer Oxidation des zellfreien Hämoglobins zu Methämoglobin die Hämoglobin-induzierte Vasokonstriktion verhindert werden könne.

**Zielsetzung:** In einem Mausmodell wurden an wachen und gesunden C57Bl6-Mäusen die akuten hämodynamischen Auswirkungen einer intravenösen Infusion von zellfreiem, murinem Hämoglobin mittels nicht-invasiven Blutdruckmonitorings untersucht. Zusätzlich wurden die hämodynamischen Reaktionen einer intravenösen Infusion von zellfreiem Hämoglobin zusammen mit einer Co-Infusion von Haptoglobin bzw. von Hämoglobin zusammen mit einer Co-Infusion von Hemopexin analysiert. Neben den Studien an gesunden und wachen C57Bl6-Mäusen wurden die Auswirkungen der Co-Infusion von Haptoglobin auf die Hämoglobin-induzierte Vasokonstriktion an adipösen Mäusen (hochkalorischer Diät) bzw. an Mäusen mit einem genetisch induzierten Diabetes mellitus untersucht. Sowohl Adipositas als auch Diabetes mellitus sind Erkrankungen, die mit einem kompromittierten endothelialen NO-Stoffwechsel, der sogenannten endothelialen Dysfunktion, einhergehen.

**Ergebnisse und Schlussfolgerung:** Die Co-Infusion von zellfreiem, murinem Hämoglobin zusammen mit exogenem Haptoglobin, jedoch nicht zusammen mit exogenem Hemopexin, verhinderte die Hämoglobin-induzierte systemische

Hypertension bei gesunden und wachen C57Bl6 Mäusen. Dabei wurde zellfreies Hämoglobin nach Bindung an Haptoglobin im Plasma retiniert und eine Ausscheidung des Hämoglobins über die Nieren verhindert. Bei adipösen sowie bei diabetischen Mäusen konnte die Co-Infusion mit exogenem Haptoglobin die Hämoglobin-induzierte Hypertension jedoch nicht unterbinden. Auch hier wurde zellfreies Hämoglobin nach Bindung an Haptoglobin im Plasma retiniert und die renale Ausscheidung unterdrückt.

Haptoglobin scheint bei gesunden Mäusen die Interaktion mit dem endothelial synthetisierten NO durch Sequestration des zellfreien Hämoglobins im Plasma zu verhindern und so der Hämoglobin-induzierten systemischen Hypertension vorzubeugen. Bei Erkrankungen, die mit endothelialer Dysfunktion assoziiert sind, scheint anders als bei gesundem Endothel eine Co-Infusion mit Haptoglobin nicht ausreichend, um die Hämoglobin-induzierte Vasokonstriktion zu verhindern.

**Platzhalter:**

**Graw JA, Yu B, Rezoagli E, Warren HS, Buys ES, Bloch DB, Zapol WM.**

Endothelial dysfunction inhibits the ability of haptoglobin to prevent hemoglobin-induced hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2017;312(6):H1120-H1127.

PMID: 28314763

<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00851.2016>

## **2.4 Eisenüberladung stört die mitochondriale Homöostase, verstärkt die mitochondriale Produktion freier Radikale und steigert die Inflamationsantwort auf Lipopolysaccharide.**

**Hintergrund:** Eisen ist ein weiteres Erythrozytenzerfallsprodukt, das bei Hämolyse in das Plasma freigesetzt wird. Nach Transfusion prolongiert gelagerter Erythrozytenkonzentrate kann es zu einer akuten Eisenüberladung des Organismus kommen. Wenn freies Eisen mit Sauerstoff reagiert, werden im Rahmen der „Fenton-Reaktion“ freie Radikale generiert. Die mitochondriale Produktion freier Radikale ist zugleich ein zentraler Mechanismus von akuten Inflamationsreaktionen.

**Zielsetzung:** In humanen Makrophagen wurde die akute Inflamationsreaktion nach Stimulation mit Lipopolysaccharid in Zusammenhang mit einer akuten Eisenüberladung untersucht. Weiterhin wurde die Inflamationsantwort auf Lipopolysaccharid nach parenteraler Gabe von Eisen bei gesunden C57Bl/6 Mäusen analysiert. Neben Inflamationsmarkern wurde die mitochondriale ROS-Produktion quantifiziert. Informationen über den Mitochondrien-Umsatz wurden mit Hilfe einer Analyse der mit mitochondrialer Biogenese assoziierten Geneexpression gewonnen und der Funktionsgrad der Mitochondrien in humanen Makrophagen nach Eisenüberladung und Stimulation mit Lipopolysaccharid mit Hilfe differenzierter Färbemethoden analysiert.

**Ergebnisse und Schlussfolgerung:** Eine akute Eisenüberladung potenzierte die Inflamationsantwort auf einen Stimulus mit Lipopolysaccharid und führte zu einer erhöhten mitochondrialen Produktion von ROS. Auch wenn eine akute Eisenüberladung die mitochondriale Biogenese stimulierte, kam es im Zusammenhang mit einem Inflamationsstimulus zu einer Akkumulation dysfunktionaler Mitochondrien. Eine akute Eisenüberladung scheint daher im Kontext eines Inflamationsstimulus über eine signifikante Störung der mitochondrialen Homöostase und über eine deutlich ausgeweitete Produktion von ROS die Inflamationsantwort erheblich zu steigern.

Es bleibt Gegenstand weiterer Forschung, ob perioperativ durchgeführte parenterale Gaben von Eisen im Rahmen einer Anämiebehandlung oder die indirekte Eisenzufuhr in Form von Bluttransfusionen bei kritisch kranken Patienten als

relevanter Cofaktor Auswirkungen im Sinne einer gesteigerten Inflammationsantwort oder erhöhten Morbidität im menschlichen Organismus haben.

**Platzhalter:**

**Hoefft K, Bloch DB, Graw JA, Malhotra R, Ichinose F, Bagchi A.**

Iron Loading Exaggerates the Inflammatory Response to the Toll-like Receptor 4 Ligand Lipopolysaccharide by Altering Mitochondrial Homeostasis. *Anesthesiology*. 2017;127(1):121-135.

PMID: 28430694

<https://doi.org/10.1097/ALN.0000000000001653>

## **2.5 Uncoupling Proteine als therapeutische Option gegen oxidativen Zellstress im Gehirn**

**Hintergrund:** Der Elektronentransfer innerhalb der Atmungskette in der inneren Mitochondrienmembran ist eine der Hauptquellen für die Produktion freier Radikale bzw. reaktiver Sauerstoffverbindungen innerhalb einer Zelle. Eine unphysiologisch hohe Produktion von ROS mündet in der Stoffwechsellage des oxidativen Zellstress. Die Zelle schützt sich gegen ROS mit enzymatischen und nicht-enzymatischen Radikalfängern sowie Antioxidantien. Eine Gruppe von Transmembranproteinen der inneren Mitochondrienmembran ist in der Lage, den Protonengradienten der Atmungskette zu schwächen. Als Nebeneffekt dieser Entkopplung der Atmungskette durch die sogenannten „Uncoupling Proteine“ kommt es zu einer reduzierten Produktion von mitochondrial generierten ROS.

**Zielsetzung:** In einem Nagetiermodell wurden die Auswirkungen einer 12-wöchigen Diät mit einem 5%igen Ethanolanteil auf das Gehirn untersucht. Es wurden Apoptosemarker und die Neurodegeneration mit Hilfe mitochondrialer Cytochrom c Freisetzung und direkter Fluoro-Jade B Färbung histologisch aufbereiteter Hirngewebe in Tieren verglichen, die oben genannte Diät oder eine normale Diät ohne Alkoholanteil erhielten. Weiterhin wurde in beiden Gruppen die zerebrale Gen- und Proteinexpression der Uncoupling Proteine UCP-2 und UCP-4 quantifiziert.

**Ergebnisse und Schlussfolgerung:** Chronischer Alkoholkonsum führte zu einer vermehrten Neurodegeneration. Eine vermehrte mitochondriale Cytochrom c Freisetzung war Hinweis für einen fortschreitenden Zelluntergang. Weiterhin kam es bei den Tieren, die die 12-wöchige Alkoholdiät erhalten hatten, zu einer vermehrten Gen- und Proteinexpression von zerebral exprimiertem UCP-2 und UCP-4.

Gehirnzellen scheinen demnach bei durch chronischen Alkoholkonsum ausgelöstem oxidativem Stress mit einer verstärkten Produktion der zerebralen Uncoupling Proteine UCP-2 und UCP-4 zu reagieren. Eine exogene Aktivierung oder Stimulation der Produktion von UCP-2 oder UCP-4 könnte somit therapeutische Optionen in Situationen vermehrter intrazellulärer Produktion von ROS im Gehirn bieten.

**Platzhalter:**

**Graw JA, von Haefen C, Poyraz D, Möbius N, Sifringer M, Spies CD.**

Chronic alcohol consumption increases the expression of uncoupling protein-2 and -4 in the brain. *Alcohol Clin Exp Res.* 2013;37(10):1650-6.

PMID: 23800309

<https://doi.org/10.1111/acer.12144>

## **2.6 Uncoupling Proteine als therapeutische Option gegen oxidativen Zellstress in Leber und Lunge**

**Hintergrund:** Eine „milde Entkopplung“ der Atmungskette in der inneren Mitochondrienmembran mit konsekutiver Reduktion des Protonengradienten vermindert die Produktion von ROS und den oxidativen Zellstress. Chronischer Alkoholkonsum ist ein potenter Trigger für die Produktion von ROS. In Gehirnzellen kommt es unter chronischem Alkoholkonsum zu vermehrtem oxidativem Stress, verstärkter Neurodegeneration und kompensatorisch erhöhter Produktion der mitochondrialen Entkopplungsproteine UCP-2 und UCP-4. Die höchste endogene Proteinexpression des ubiquitär exprimierten UCP-2 ist unter physiologischen Bedingungen in den Lungen und der Milz zu verzeichnen.

**Zielsetzung:** Nachdem in der Vorarbeit gezeigt werden konnte, dass vermehrter oxidativer Stress durch chronischen Alkoholkonsum im Nagetiermodell mit einer erhöhten Gen- und Proteinexpression von zerebralem UCP-2 und UCP-4 assoziiert war, wurde im gleichen Modell die Regulation von UCP-2 in Lungen und Milz, den Organen mit der höchsten endogenen UCP-2-Expression untersucht. Um das Ausmaß des Alkohol-induzierten Zellstress nachzuweisen, wurde weiterhin die Cytochrom c Freisetzung aus den Mitochondrien in das Zytoplasma beider Organe untersucht.

**Ergebnisse und Schlussfolgerung:** Es zeigte sich, dass der chronische Alkoholkonsum in beiden Organen zwar zu erhöhter Cytochrom c Freisetzung aus den Mitochondrien führte, aber keinen Einfluss auf die Regulation der Gen- oder Proteinexpression von UCP-2 hatte. Vermehrter oxidativer Stress, ausgelöst durch chronischen Alkoholkonsum, führt demnach zu einer organspezifischen Regulation der UCP-2 Expression.

Möglicherweise würde eine weitere Induktion der UCP-2 Proteinproduktion in Organen mit hohem ATP-Bedarf und gleichzeitig hoher physiologischer UCP-2 Expression, wie den Lungen und der Milz, zu einer eher nachteiligen Entkopplung der Atmungskette mit konsekutiver, unvorteilhaft hoher Reduktion der ATP-Produktion führen.

**Platzhalter:**

**Graw JA, von Haefen C, Poyraz D, Möbius N, Sifringer M, Spies CD.**

Chronic Alcohol Consumption Leads to a Tissue Specific Expression of Uncoupling Protein-2. *Int J Med Sci.* 2015;12(12):995-9.

PMID: 26664262

<https://doi.org/10.7150/ijms.13193>

### 3 Diskussion

Die in Kapitel 2 vorgestellten Arbeiten untersuchten Komplikationen und erste experimentelle Therapieoptionen, die im Zusammenhang mit dem sauerstoffabhängigen Stoffwechsel vieler mehrzelliger Lebewesen relevant sind. Dabei wurden einer Systematik folgend von der systemischen Ebene bis hin zur intrazellulären Ebene die folgenden Teilaspekte im Rahmen von tierexperimentellen Studien untersucht:

- Die Auswirkungen der Transfusion von intravasalen Sauerstofftransportern in Form von prolongiert gelagerten Erythrozytenkonzentraten und die Folgen der assoziierten intravasalen Hämolyse auf Mortalität, Nierenschäden und Inflammation (Kapitel 2.1).
- Die Grundlagen der hämodynamischen Nebenwirkungen intravasaler Hämolyse und mögliche Therapieoptionen (Kapitel 2.2 und 2.3)
- Die Wirksamkeit einer Therapie mit dem endogenen Hämoglobin-Binder Haptoglobin bzw. dem endogenen Häm-Binder Hemopexin um die Hämolyse-assoziierten Komplikationen auf Mortalität, Nierenschäden, Inflammation und Hämodynamik zu verhindern (Kapitel 2.1 und 2.3)
- Die Auswirkungen des bei der Hämolyse in großen Mengen freigesetzten Eisens auf Inflammation und den intrazellulären sauerstoffabhängigen mitochondrialen Stoffwechsel (Kapitel 2.4)
- Das protektive und regulatorische Potential endogener mitochondrialer Proteine, um die intrazelluläre Produktion reaktiver Sauerstoffverbindungen als Antwort auf einen externen Stressor zu kontrollieren (Kapitel 2.5 und 2.6)

#### **Die Problematik der Transfusion von prolongiert gelagerten Erythrozytenkonzentraten**

Die Transfusion von Erythrozytenkonzentraten ist gerade im perioperativen Bereich eine der häufigsten ärztlichen Tätigkeiten und oftmals lebensrettend (Klein et al., 2007). Sie dient primär der Wiederherstellung bzw. Optimierung der Sauerstofftransportkapazität des Blutes und sichert so die Perfusion und Sauerstoffversorgung der Organe. Erythrozytenkonzentrate können den aktuellen Standards der Herstellung entsprechend für maximal 42 Tage gelagert werden (Glynn et al., 2016). Allerdings kommt es schon viel früher während der

Lagerungszeit zu biochemischen und morphologischen Veränderungen der Erythrozyten (Bennett-Guerrero et al., 2007). Dabei entstehen im weiteren Verlauf Schäden in der Integrität der Erythrozytenmembran. Bei der folgenden Hämolyse wird dann der Erythrozyteninhalt unter anderem bestehend aus Hämoglobin, Häm, Eisen, Mikropartikeln, Kalium und Laktat freigesetzt (Bennett-Guerrero et al., 2007). Ob die Transfusion prolongiert gelagerter Erythrozytenkonzentrate beim Menschen mit einer erhöhten Mortalität und Morbidität vergesellschaftet ist, wird zur Zeit sehr kontrovers diskutiert. Drei aktuell viel beachtete klinisch-prospektive Studien konnten einen nachteiligen Effekt der Transfusion prolongiert gelagerter Erythrozytenkonzentrate nicht nachweisen (Heddle et al., 2016; Lacroix et al., 2015; Steiner et al., 2015). Im Gegensatz dazu fanden frühere Beobachtungsstudien eine Assoziation zwischen prolongierter Lagerungsdauer von Erythrozytenkonzentraten, verlängerter Intensivverweildauer und erhöhter Mortalität und Morbidität (Koch et al., 2008; Wang et al., 2012; Zallen et al., 1999). Keine der drei aktuellen großen negativen Studien war allerdings konzipiert worden, um eine valide Aussage bezüglich der Auswirkungen der Transfusion von Erythrozytenkonzentraten aus dem letzten Drittel des Erythrozytenkonzentrat-Lagerungszeitraumes treffen zu können. Gerade dieser Abschnitt der Lagerungsdauer ist jedoch nachweislich mit den beschriebenen Erythrozytenveränderungen und gesteigerter Hämolyse assoziiert (Bennett-Guerrero et al., 2007; Donadee et al., 2011; Rapido et al., 2017).

### **Tiermodelle zur Simulation der Transfusion prolongiert gelagerter Erythrozytenkonzentrate**

Mit den beiden in Kapitel 2.1 und 2.2 beschriebenen Tiermodellen war es möglich, unter kontrollierten Bedingungen die Transfusion von ausschließlich frischen mit der Transfusion von ausschließlich prolongiert gelagerten Erythrozytenkonzentraten zu simulieren, die Pathophysiologie der unerwünschten Nebenwirkungen aufzuklären und mögliche Therapieoptionen unter experimentellen Bedingungen zu testen (Graw et al., 2016; Muenster et al., 2016). Zugleich konnten hier die Ergebnisse aus zahlreichen verwandten Klein- und Großtiermodellen reproduziert werden (Baek et al., 2012; Baron et al., 2012; Hod et al., 2010). Einige dieser spezifischen, mit der Transfusion prolongiert gelagerter Erythrozytenkonzentrate assoziierten Nebenwirkungen, wie der pulmonalarterielle Blutdruckanstieg oder die parenterale Eisenüberladung mit einer gesteigerten

Empfindlichkeit gegenüber infektiösen Stimuli, konnten in kleineren prospektiven klinischen Studien nachgewiesen werden (Berra et al., 2014; Hod et al., 2011).

Sowohl der Mensch als auch Säugetiere (z.B. Schafe) reagieren auf die Transfusion prolongiert gelagerter Erythrozytenkonzentrate mit einem Anstieg des pulmonalarteriellen Druckes (Baron et al., 2012; Berra et al., 2014). Dieser transfusionsassoziierte pulmonalarterielle Druckanstieg konnte durch Inhalationstherapie mit dem selektiven pulmonalen Vasodilatator NO verhindert werden (Baron et al., 2012; Berra et al., 2014). In Kapitel 2.2 wurde zudem beschrieben, dass eine *ex vivo* Behandlung der prolongiert gelagerten Erythrozytenkonzentrate entweder mit gasförmigem NO oder mit NO-freisetzenden Molekülen, nicht aber das Waschen der Konserven vor der Transfusion, ebenfalls den transfusionsassoziierten pulmonalarteriellen Druckanstieg verhindern konnte. Dies und die in Kapitel 2.1 dargestellten Daten verdeutlichten einmal mehr, dass der Großteil der Hämolyse von prolongiert gelagerten Erythrozyten erst *nach* der Transfusion *in vivo* stattfindet. Die Behandlung des Transfusionsempfängers mit inhalativem NO hat zum Ziel, das durch zellfreies Hämoglobin über die NO-Deoxygenierungsreaktion depletierte endotheliale NO zu ersetzen (Baron et al., 2012; Berra et al., 2014).

### **Haptoglobin zur Therapie der mit zellfreiem Hämoglobin assoziierten hämodynamischen Nebenwirkungen**

Ein alternativer Ansatz, die hämodynamischen Nebenwirkungen einer akuten Hämolyse zu therapieren bzw. ihnen vorzubeugen, wurde in Kapitel 2.3 beschrieben. Durch Bindung der zellfreien Hämoglobin-Dimere an das hepatische Glykoprotein Haptoglobin konnte die Hämoglobin-induzierte Vasokonstriktion verhindert werden. Haptoglobin verändert durch seine Bindung an Hämoglobin dabei nicht die Affinität von Hämoglobin zu NO, sondern verhindert durch die Bildung eines Hämoglobin-Haptoglobin Komplexes mit hohem Molekulargewicht die Interaktion von Hämoglobin mit endothelialen und subendothelialen Strukturen und damit die Reaktion mit und Depletion von endotheliale NO (Baek et al., 2012; Schaer et al., 2016). Hemopexin, das von Hämoglobin freigesetztes Häm bindet, spielt für die Prophylaxe der hämodynamischen Nebenwirkungen bei der akuten Hämolyse hingegen nur eine untergeordnete Rolle. Es scheint aber bei mit chronischer Hämolyse assoziierten Erkrankungen, wie der Sichelzellerkrankung oder der  $\beta$ -Thalassämie, die endotheliale

NO-Synthaseaktivität zu stabilisieren und die Bildung von ROS in Endothelnähe zu reduzieren (Belcher et al., 2014). Auf diese Weise verhindert Hemopexin die Hämoglobin-abhängigen Vasookklusionen und kann dem chronisch erhöhten Blutdruck zumindest im experimentellen Ansatz vorbeugen (Belcher et al., 2014; Vinchi et al., 2013).

Auf den ersten Blick erscheint es attraktiver, den akuten Hämoglobin-induzierten Hypertonus mit einer Infusion des körpereigenen Proteins Haptoglobin zu therapieren, statt eine technisch aufwändigere Applikation einer inhalativen NO-Therapie durchzuführen. Allerdings beschreibt Kapitel 2.3 auch, dass im Zusammenhang mit einer endothelialen Dysfunktion die Therapie mit Haptoglobin nicht suffizient Hämolyse-assoziierte hämodynamische Nebenwirkungen verhindern kann. Eine endotheliale Dysfunktion ist mit einer reduzierten NO-Synthaseaktivität assoziiert und ein häufiges Begleitphänomen bei Diabetes mellitus und Hyperlipidämie (Pannirselvam et al., 2005; Roberts et al., 2005). Schon bei den Versuchen mit künstlichen Sauerstoffträgern auf Hämoglobinbasis (HBOCs) zeigte sich, dass Gefäße mit dysfunktionalem Endothel eine verstärkte Vasokonstriktion als Antwort auf die Stimulation mit zellfreiem Hämoglobin aufwiesen (Yu et al., 2010). Auch HBOCs mit hohem Molekulargewicht, die in Mäusen mit gesundem Endothel den Hämoglobin-induzierten Hypertonus suffizient verhinderten, verursachten eine Hypertension in diabetischen oder adipösen Mäusen (Yu et al., 2010). Die Parallelen zur hämodynamischen Wirkung des hochmolekulargewichtigen Hämoglobin-Haptoglobin Komplexes sind offensichtlich. Ob geringe Mengen niedermolekularen zellfreien Hämoglobins oder eine direkte luminale, endotheliale oder subendotheliale Wirkung der hochmolekulargewichtigen Komplexe für die hämodynamischen Wirkungen im Kontext der endothelialen Dysfunktion verantwortlich sind, ist weiter Gegenstand aktueller Forschung (Schaer et al., 2016).

### **Haptoglobin zur Prophylaxe der mit zellfreiem Hämoglobin assoziierten renalen Nebenwirkungen**

Zusätzlich zu den Erkenntnissen hinsichtlich der pathophysiologischen Grundlagen und Nebenwirkungen der Transfusion prolongiert gelagerter Erythrozytenkonzentrate beschreibt die in Kapitel 2.1 angeführte Studie weitere Einsatzgebiete einer Therapie mit den Hämoglobin- und Häm-Bindeproteinen Haptoglobin und Hemopexin, die für weitere Hämolyse-assoziierte Krankheitsbilder

relevant sein könnten. Erhöhte Plasmakonzentrationen zellfreien Hämoglobins führen zu einer erhöhten glomerulären Filtration von Hämoglobin in der Niere und einer damit assoziierten Hämoglobinurie (Deuel et al., 2016; van Swelm et al., 2016). Erhöhte Plasmahämoglobinkonzentrationen und Hämoglobinurie sind wiederum mit einer verstärkten Schädigung der Nierentubuli vergesellschaftet (Vermeulen et al., 2010, Deuel et al., 2016). Dies gilt insbesondere in Situationen, in denen zellfreies Hämoglobin als sekundär schädigende Substanz nach einer Primärschädigung der Niere wirkt, zum Beispiel durch eine Dehydratation oder nach Extrakorporalverfahren (Lalich, 1947; Vermeulen et al., 2014).

In der in Kapitel 2.1 angeführten Studie konnte belegt werden, dass in Mäusen nach hämorrhagischem Schock der Anteil der Nierenschädigung, der durch die vermehrte Hämolyse nach Transfusion prolongiert gelagerter Erythrozytenkonzentrate ausgelöst wurde, durch eine Therapie mit Haptoglobin und der dadurch verhinderten renalen Hämoglobinfiltration verhindert werden konnte. Einige Fallberichte und -serien von Patienten, die in Japan nach prologiertem kardiopulmonalem Bypass eine Haptoglobininfusion erhielten, legen nahe, dass eine Verhinderung der Hämoglobinurie und eine damit assoziierte Nephroprotektion in diesem Zusammenhang auch in der klinischen Anwendung Potential haben könnten (Hashimoto et al., 1997; Tanaka et al., 1991). Zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist leider weder exogenes Haptoglobin noch Hemopexin in einer ausreichenden Menge und Qualität auf dem Markt verfügbar, um eine entsprechende klinische Anwendung zu erproben.

Im Rahmen weiterer präklinischer Tierversuche konnte jedoch der nephroprotektive Effekt einer Therapie mit Haptoglobin im Zusammenhang mit einer Hämolyse-assoziierten Nierenschädigung weiter gesichert werden (Baek et al., 2012; Lipiski et al., 2013; Minneci et al., 2005). Auch in weiteren Modellen klassischer, mit Hämolyse assoziierter Erkrankungen, wie der Sichelzellerkrankung und den Thalassämien oder der Sepsis und Inflammation, zeigte die Gabe von exogenem Haptoglobin oder Hemopexin im Tiermodell, im Einklang mit den Ergebnissen der in Kapitel 2.1 vorgestellten Arbeit, therapeutisches Potential im Hinblick auf eine verringerte Mortalität und Morbidität (Belcher et al., 2014; Larsen et al., 2010; Vinchi et al., 2013).

## **Die Bedeutung einer erhöhten Zufuhr von freiem Eisen für die Stimulation des oxidativen Stresses**

Neben den Erythrozytenzerfallsprodukten Hämoglobin und Häm wird bei der Hämolyse eine große Menge an Eisen freigesetzt. Eisen spielt im menschlichen Organismus eine bedeutende Rolle beim intravaskulären und intrazellulären Sauerstofftransport. Allerdings ist sein hohes Potential, Reaktionen mit Sauerstoff einzugehen, gleichzeitig die Grundlage für seine potentielle Toxizität (Hod et al., 2011). Bei der Reaktion mit Sauerstoff entsteht dreiwertiges Eisen und das hochreaktive Hydroxyl-Radikal als reaktive Sauerstoffverbindung (Koskenkorva-Frank et al., 2013). Einige der pro-inflammatorischen Nebenwirkungen der Transfusion von prolongiert gelagerten Erythrozytenkonzentraten werden daher auch der Zufuhr größerer Mengen freien Eisens zugeschrieben (Cortes-Puch et al., 2014; Hod et al., 2010; Hod et al., 2011; Prestia et al., 2014).

Andere Studien sehen in einer Eisenüberladung und der einhergehenden vermehrten Produktion des Eisen-regulierenden Hormons Heparin vornehmlich anti-inflammatorische Effekte (De Domenico et al., 2010; Pagani et al., 2011).

In der in Kapitel 2.4 aufgeführten Originalarbeit konnte mit Hilfe von Zellkulturexperimenten und Mausmodellen beschrieben werden, dass eine akute Eisenüberladung die mitochondriale Produktion von ROS stimulierte und die Inflammationsantwort auf einen Stimulus mit Lipopolysaccharid potenzierte. Weiterhin führte die Eisenüberladung zu einer Veränderung der mitochondrialen Homöostase, indem freies Eisen in Verbindung mit Lipopolysaccharid-Stimulation die Biogenese von Mitochondrien aktivierte und gleichzeitig die Zahl an dysfunktionalen Mitochondrien, insbesondere in Makrophagen, steigerte. Zusammenfassend kann also festgehalten werden, dass das für die Sauerstoffbindung im Hämoglobinmolekül und damit für den intravasalen Sauerstofftransport essentielle Eisen bei Hämolyse oder sonstiger überschüssiger intrazellulärer Aufnahme über eine Stimulation der mitochondrialen Genese von ROS eine nachhaltig toxische Wirkung entfaltet.

## **Die Bedeutung der Uncoupling Proteine im Kontext vermehrten oxidativen Stresses und als mögliche Kandidaten eines intrazellulären Schutzes vor übermäßiger Synthese von freien Radikalen**

Im vorangegangenen Abschnitt wurde beschrieben, dass eine akute, vermehrte intrazelluläre Aufnahme von Eisen nach Eisenüberladung unter anderem

die vermehrte mitochondriale Synthese von ROS stimuliert. Eine Therapie mit Chelator-Komplexen, die spezifisch überschüssiges Eisen im Plasma binden, könnte die zelluläre Eisenüberladung signifikant reduzieren bzw. verhindern. Allerdings leiden viele kritisch kranke Patienten unter einer Hypoferriämie (Munoz et al., 2005). Eine Therapie mit Eisen-Chelator-Komplexen würde so die Hypoferriämie weiter verstärken. Zusätzlich könnte das Risiko für bakterielle Infektionen durch Organismen, die Eisen aus den Chelator-Komplexen extrahieren können, steigen (Lesic et al., 2002).

Die in Kapitel 2.5 und 2.6 aufgeführten Originalarbeiten gingen daher der Frage nach, ob auch intrazellulär mögliche Kandidatenproteine existieren, die regulatorisch in den Prozess der Produktion von ROS eingreifen können und bei Situationen mit gesteigertem oxidativem Stress die massiv gesteigerte Synthese freier Radikale inhibieren können. In Kapitel 2.5 wurde dargelegt, dass die Zellen des Gehirns unter chronischer Exposition des Organismus gegenüber Alkohol mit einer verstärkten Neurodegeneration und einer gesteigerten Apoptoserate reagieren. Die beiden im Gehirn moderat exprimierten Uncoupling Proteine UCP-2 und UCP-4 werden auf den Alkoholstimulus hin jedoch vermehrt synthetisiert. Da beide Proteine die mitochondriale Atmungskette entkoppeln können und so die Produktion von ROS reduzieren, liegt es nahe zu vermuten, dass die einzelnen Zellen, mit vermehrter Synthese dieser Proteine, ausufernden oxidativen Stress, der zum Untergang der Zelle führen könnte, verhindern möchten. Dass im Gehirn gleich zwei Isoformen der Uncoupling Proteine reguliert und synthetisiert werden, könnte in der regional differenzierten Expression von UCP-2 und UCP-4 in den verschiedenen Hirnregionen begründet sein (Smorodchenko et al., 2009).

In der Gesamtschau ist die Verhinderung einer übermäßigen ROS-Produktion mit Hilfe der Uncoupling Proteine für die Zelle nur auf den ersten Blick attraktiv. Die gesteigerte Entkopplung der Atmungskette bedingt, dass ein nun deutlich größerer Anteil der in der aeroben Glykolyse umgesetzten Energie nicht mehr zur Synthese von ATP verwendet wird, sondern als Wärme verloren geht. In einer Situation, in der zur Abwehr der den oxidativen Stress verursachenden Stressoren oft zusätzliche Energieressourcen benötigt werden, ist zu vermuten, dass die Uncoupling Proteine möglicherweise eine nur temporär begrenzte Pufferfunktion einnehmen. Diese Hypothese wird durch die Daten der Originalarbeit des Kapitels 2.6 unterstützt. Zellen in Organen mit einer schon unter physiologischen Bedingungen sehr hohen

Expression von Uncoupling Proteinen, wie zum Beispiel die makrophagenreichen Organe Milz und Lungen für UCP-2, zeigen keine gesteigerte Expression von UCP-2 nach Induktion von oxidativem Stress durch chronische Alkoholexposition. Zusätzlich kann man anhand dieser Daten vermuten, dass neben der basalen auch die stimulationsabhängige Expression der Uncoupling Proteine differenziert und gewebespezifisch erfolgt.

### **Perspektive für die Translation der grundlagenwissenschaftlichen Ergebnisse in die klinische Anwendung**

Tierexperimentelle Untersuchungen dienen der Aufklärung physiologischer und pathologischer Stoffwechsel- und Signalwege sowie der Erprobung innovativer medizinischer Therapiemöglichkeiten. In dieser Synopsis wurden Studien zusammengefasst, die in der klinischen Patientenbehandlung häufig vorkommende Therapiemaßnahmen und Erkrankungen wie die Transfusion gelagerter Erythrozytenkonzentrate, die intravasale Hämolyse oder den chronischen Alkoholkonsum im Tiermodell simuliert haben.

Mit Hilfe der Transfusions- und Hämolysemodelle konnten zwei körpereigene Proteine identifiziert werden, die sich protektiv wirksam gegenüber Hämolyse-assoziierten Nebenwirkungen wie gesteigerter Mortalität, Nierenschaden, Inflammation und Vasokonstriktion zeigten. Die Ergebnisse stimmten mit ähnlichen Ergebnissen, die in vergleichbaren Tiermodellen in anderen Spezies wie Ratten, Meerschweinchen oder Hunden gewonnen wurden, überein (Baek et al., 2012; Baek et al., 2017; Lipiski et al., 2013; Minneci et al., 2005; Schaer et al., 2016). Zugleich weisen die bisher existierenden kleinen Fallserien aus Japan darauf hin, dass der physiologische Wirkmechanismus zumindest in Bezug auf das Haptoglobin auch beim Menschen zu existieren scheint (Hashimoto et al., 1997; Tanaka et al., 1991). Zusätzlich zeigte sich trotz einer in den Studien häufig durchgeführten Hochdosistherapie in keinem der verschiedenen Tierversuche eine toxische Nebenwirkung der Therapie mit den beiden endogenen Proteinen Haptoglobin und Hemopexin. Gleiches gilt bezüglich des Haptoglobins für die Patienten der klinischen Fallserien. Es ist somit zu erwarten, dass erste klinische Pilotstudien begonnen werden, sobald diese beiden Produkte in adäquater Qualität und Menge verfügbar sind. Von größtem Interesse sind dabei vermutlich Patientengruppen mit gesicherten Episoden massiver intravasaler Hämolyse und damit assoziierten Komplikationen

wie zum Beispiel Patienten mit den genetisch determinierten hämolytischen Erkrankungen wie der Sichelzellerkrankung oder der Thalassämien bzw. Patienten nach prologiertem kardiopulmonalem Bypass.

In Bezug auf den komplex regulierten Eisenstoffwechsel und eine potentielle systemische Eisenchelatortherapie bei Hämolyse oder systemischer Eisenüberladung wurde die uneinheitliche, mittlerweile auch mit scheinbar widersprüchlichen Daten unterstützte aktuelle kontroverse Diskussion im vorangegangenen Abschnitt dieser Diskussion abgehandelt.

Bezüglich des therapeutischen Potentials einer Aktivierung der Uncoupling Proteine zeigte sich die Problematik einer Ambivalenz zwischen reduzierter Produktion von ROS bei gleichzeitig damit einhergehender deutlich reduzierter ATP-Synthese. Da die konkrete Funktion der Uncoupling Proteine weiter nicht vollständig aufgeklärt ist, sie in vielen komplexen Stoffwechsel- und Signalwegen involviert sind und gleichzeitig bis dato kein selektiver und potenter Aktivator der UCP-Funktion bekannt ist, müssen zunächst weitere grundlagenwissenschaftliche Studien erfolgen, bis sowohl eine pathologische Entität sowie eine mögliche therapeutische Option für diese Zielgruppe an Patienten identifiziert sind.

## 4 Zusammenfassung

Der Abbau von Glukose unter Verbrauch von Sauerstoff und die damit erfolgende chemische Energieumwandlung ist der wichtigste Stoffwechselprozess im menschlichen Körper und Grundlage unseres Lebens. Die ertragreichsten Schritte dieses Prozesses laufen in spezialisierten Kompartimenten fast jeder Zelle ab, den Mitochondrien. Hier befindet sich die sogenannte Atmungskette für die „innere Atmung“. Zu den einzelnen Zellen gelangt Sauerstoff mit Hilfe des Blutkreislaufs. Der Transport im Blut erfolgt dabei durch Erythrozyten. Dies sind Zellen, die über das in ihnen enthaltene Hämoglobin reversibel Sauerstoff binden können und auf diese Weise den Sauerstoff in den Lungen, dem Organ der „äußeren Atmung“, aufnehmen und in das Kapillarsystem jedes Gewebes transportieren.

In der vorliegenden Synopsis sind grundlagenwissenschaftliche Arbeiten zusammengefasst, die sich mit Komplikationen des intravasalen und intrazellulären Sauerstofftransports beschäftigen. Weiterhin wurde die Funktion einiger körpereigener Proteine untersucht, die regulatorisch in diese Pathomechanismen eingreifen können. Möglicherweise besitzen sie therapeutisches Potential, um spezifische, mit dem Sauerstofftransport assoziierte Komplikationen im menschlichen Organismus zu verhindern.

Die Untersuchungen mit Hilfe verschiedener Tiermodelle konnten zeigen, dass eine Transfusion mit prolongiert gelagerten Erythrozytenkonzentraten im Vergleich zur Transfusion frischer Erythrozytenkonzentrate aufgrund einer ausgeprägten intravasalen Hämolyse mit einer höheren Mortalität, vermehrter Inflammation, ausgeprägter Nierenschädigung und einem pulmonalarteriellen Blutdruckanstieg assoziiert war. Gleichzeitig konnte mit dem Hämoglobin-Binder Haptoglobin ein endogenes Protein identifiziert werden, das bei Mäusen mit gesundem Endothel therapeutisch genutzt werden konnte, um den Hämoglobin-assoziierten Hypertonus zu verhindern. Weiterhin konnte die Therapie mit Haptoglobin den durch zellfreies Hämoglobin verursachten Nierenschaden verhindern. Haptoglobin und das Häm-Bindeprotein Hemopexin zeigten protektive Effekte auf das Überleben und die Inflammationsreaktion bei Mäusen, die nach zweistündigem, hypotensivem hämorrhagischem Schock eine Massivtransfusion von prolongiert gelagerten Erythrozytenkonzentraten erhielten. In weiteren Untersuchungen konnte demonstriert werden, dass freies Eisen als weiteres Erythrozytenzerfallsprodukt über eine verstärkte Produktion von reaktiven Sauerstoffmetaboliten in den Mitochondrien die

Inflammationsantwort von Immunzellen nach Stimulation mit Lipopolysaccharid massiv steigerte.

Die Atmungskette in den Mitochondrien ist die Hauptquelle für die Produktion von reaktiven Sauerstoffradikalen bei oxidativem Stress. Mit den Uncoupling Proteinen existieren induzierbare Membrankanäle, die über eine Entkopplung der inneren Atmung die Produktion der reaktiven Sauerstoffradikale reduzieren können. Die weiteren Untersuchungen in Tiermodellen, in denen chronische Alkoholaufnahme oxidativen Stress induzierte, zeigten, dass im Gehirn die Produktion der Uncoupling Proteine UCP-2 und UCP-4 signifikant gesteigert wurde. In Organen, die eine hohe Expression von UCP-2 unter physiologischen Bedingungen aufwiesen, geschah dies hingegen nicht.

Im Rahmen der hier zusammengefassten Arbeiten konnte das Verständnis über körpereigene Proteine, die protektiv gegenüber der Bildung von reaktiven Sauerstoffverbindungen in den Mitochondrien wirken sowie über zwei weitere endogene Proteine, die Nebenwirkungen der Erythrozytenzerfallsprodukte Hämoglobin und Häm verhindern, erweitert werden. Auch wenn die organspezifische Wirkung und selektive Aktivierung der Uncoupling Proteine weitere grundlagenwissenschaftliche Aufklärung erfordert, so konnten andererseits mit Haptoglobin und Hemopexin zwei vielversprechende Kandidaten identifiziert werden, die möglicherweise auch beim Menschen ein hohes therapeutisches Potential aufweisen, um mit Hämolyse vergesellschaftete Komplikationen zu therapieren oder zu verhindern. Dies kann nicht nur relevant sein für Patienten mit genetisch determinierten hämolytischen Erkrankungen, wie der Sichelzellerkrankheit oder den Thalassämien, sondern neben der Malaria auch in vielen relevanten intensivmedizinischen Situationen wie der Transfusion prolongiert gelagerter Erythrozytenkonzentrate, nach prolongiertem kardiopulmonalem Bypass, in der Sepsis oder bei einem schweren ARDS.

## 5 Literaturverzeichnis

**Allegre C, Manhes G und Lewin E.** Chemical composition of the Earth and the volatility control on planetary genetics. *Earth and Planetary Science Letters* 185: 49-69, 2001

**Baek JH, D'Agnillo F, Vallelian F, Pereira CP, Williams MC, Jia Y, Schaer DJ und Buehler PW.** Hemoglobin-driven pathophysiology is an in vivo consequence of the red blood cell storage lesion that can be attenuated in guinea pigs by haptoglobin therapy. *The Journal of clinical investigation* 122: 1444-1458, 2012.

**Baek JH, Yalamanoglu A, Gao Y, Guenster R, Spahn DR, Schaer DJ und Buehler PW.** Iron accelerates hemoglobin oxidation increasing mortality in vascular diseased guinea pigs following transfusion of stored blood. *JCI Insight* 2: doi: 10.1172, 2017

**Balla G, Jacob HS, Eaton JW, Belcher JD und Vercellotti GM.** Hemin: a possible physiological mediator of low density lipoprotein oxidation and endothelial injury. *Arteriosclerosis and thrombosis : a journal of vascular biology* 11: 1700-1711, 1991.

**Baron DM, Yu B, Lei C, Bagchi A, Beloiartsev A, Stowell CP, Steinbicker AU, Malhotra R, Bloch KD und Zapol WM.** Pulmonary hypertension in lambs transfused with stored blood is prevented by breathing nitric oxide. *Anesthesiology* 116: 637-647, 2012.

**Belcher JD, Chen C, Nguyen J, Milbauer L, Abdulla F, Alayash AI, Smith A, Nath KA, Hebbel RP und Vercellotti GM.** Heme triggers TLR4 signaling leading to endothelial cell activation and vaso-occlusion in murine sickle cell disease. *Blood* 123: 377-390, 2014.

**Bennett-Guerrero E, Veldman TH, Doctor A, Telen MJ, Ortel TL, Reid TS, Mulherin MA, Zhu H, Buck RD, Califf RM und McMahan TJ.** Evolution of adverse changes in stored RBCs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 17063-17068, 2007.

**Berra L, Pinciroli R, Stowell CP, Wang L, Yu B, Fernandez BO, Feelisch M, Mietto C, Hod EA, Chipman D, Scherrer-Crosbie M, Bloch KD und Zapol WM.** Autologous transfusion of stored red blood cells increases pulmonary artery pressure. *American journal of respiratory and critical care medicine* 190: 800-807, 2014.

**Boaz M, Smetana S, Weinstein T, Matas Z, Gafter U, Iaina A, Knecht A, Weissgarten Y, Brunner D, Fainaru M und Green MS.** Secondary prevention with antioxidants of cardiovascular disease in endstage renal disease (SPACE): randomised placebo-controlled trial. *The Lancet* 356: 1213-1218, 2000

**Boveris A und Chance B.** The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* 134: 707-716, 1973.

**Bunn HF und Jandl JH.** Exchange of heme among hemoglobins and between hemoglobin and albumin. *The Journal of biological chemistry* 243: 465-475, 1968.

**Busiello RA, Savarese S und Lombardi A.** Mitochondrial uncoupling proteins and energy metabolism. *Front Physiol* 6: doi: 10.3389/fphys.2015.00036, 2015.

**Cortes-Puch I, Wang D, Sun J, Solomon SB, Remy KE, Fernandez M, Feng J, Kanias T, Bellavia L, Sinchar D, Perlegas A, Solomon MA, Kelley WE, Popovsky MA, Gladwin MT, Kim-Shapiro DB, Klein HG und Natanson C.** Washing older blood units before transfusion reduces plasma iron and improves outcomes in experimental canine pneumonia. *Blood* 123: 1403-1411, 2014.

**Crowe SA, Dossing LN, Beukes NJ, Bau M, Kruger SJ, Frei R und Canfield DE.** Atmospheric oxygenation three billion years ago. *Nature* 501: 535–538, 2013

**Cumano A und Godin I.** Ontogeny of the hematopoietic system. *Annu Rev Immunol* 25: 745-785, 2007.

**Deuel JW, Schaer CA, Boretti FS, Opitz L, Garcia-Rubio I, Baek JH, Spahn DR, Buehler PW und Schaer DJ.** Hemoglobinuria-related acute kidney injury is driven by intrarenal oxidative reactions triggering a heme toxicity response. *Cell death & disease* 7: e2064, 2016.

**De Domenico I, Zhang TY, Koenig CL, Branch RW, London N, Lo E, Daynes RA, Kushner JP, Li D, Ward DM und Kaplan J.** Hepcidin mediates transcriptional changes that modulate acute cytokine-induced inflammatory responses in mice. *The Journal of clinical investigation* 120: 2395-2405, 2010.

**Donadee C, Raat NJ, Kanias T, Tejero J, Lee JS, Kelley EE, Zhao X, Liu C, Reynolds H, Azarov I, Frizzell S, Meyer EM, Donnenberg AD, Qu L, Triulzi D, Kim-Shapiro DB und Gladwin MT.** Nitric oxide scavenging by red blood cell microparticles and cell-free hemoglobin as a mechanism for the red cell storage lesion. *Circulation* 124: 465-476, 2011.

**Flannery DT und Walter RM.** Archean tufted microbial mats and the Great Oxidation Event: new insights into an ancient problem. *Australian Journal of Earth Sciences* 59: 1–11, 2012.

**Fieden E.** The chemical elements of life. *Sci Amer* 226: 52, 1972.

**Gaworzewski P und Ritter G.** On the out-diffusion of oxygen from silicon. *Phys Stat Sol* 67, 511-516, 1981.

**Gladwin MT, Sachdev V, Jison ML, Shizukuda Y, Plehn JF, Minter K, Brown B, Coles WA, Nichols JS, Ernst I, Hunter LA, Blackwelder WC, Schechter AN, Rodgers GP, Castro O und Ognibene FP.** Pulmonary hypertension as a risk factor for death in patients with sickle cell disease. *The New England journal of medicine* 350: 886-895, 2004.

**Glynn SA, Klein HG und Ness PM.** The red cell storage lesion: the end of the beginning. *Transfusion* 56: 1462-1468, 2016.

**Graw JA, von Haefen C, Poyraz D, Mobius N, Sifringer M und Spies CD.** Chronic alcohol consumption increases the expression of uncoupling protein-2 and -4 in the brain. *Alcoholism, clinical and experimental research* 37: 1650-1656, 2013.

**Graw JA, von Haefen C, Poyraz D, Mobius N, Sifringer M und Spies CD.** Chronic Alcohol Consumption Leads to a Tissue Specific Expression of Uncoupling Protein-2. *International journal of medical sciences* 12: 995-999, 2015.

**Graw JA, Mayeur C, Rosales I, Liu Y, Sabbisetti VS, Riley FE, Rechester O, Malhotra R, Warren HS, Colvin RB, Bonventre JV, Bloch DB und Zapol WM.** Haptoglobin or Hemopexin Therapy Prevents Acute Adverse Effects of Resuscitation After Prolonged Storage of Red Cells. *Circulation* 134: 945-969, 2016.

**Graw JA, Yu B, Rezoagli E, Warren HS, Buys ES, Bloch DB und Zapol WM.** Endothelial dysfunction inhibits the ability of haptoglobin to prevent hemoglobin-induced hypertension. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 312: 1120-1127, 2017.

**Hashimoto K, Nomura K, Nakano M, Sasaki T und Kurosawa H.** Pharmacological intervention for renal protection during cardiopulmonary bypass. *Heart and vessels* 8: 203-210, 1993

**Heddle NM, Cook RJ, Arnold DM, Liu Y, Barty R, Crowther MA, Devereaux PJ, Hirsh J, Warkentin TE, Webert KE, Roxby D, Sobieraj-Teague M, Kurz A, Sessler DI, Figueroa P, Ellis M und Eikelboom JW.** Effect of Short-Term vs. Long-Term Blood Storage on Mortality after Transfusion. *The New England journal of medicine* 375: 1937-1945, 2016.

**Hoang T, Smith MD und Jelokhandi-Niaraki M.** Toward understanding the mechanism of ion transport activitz of neuronal uncoupling proteins UCP2, UCP4 and UCP5. *Biochemistry* 51: 4004-4014, 2012.

**Hod EA, Zhang N, Sokol SA, Wojczyk BS, Francis RO, Ansaldi D, Francis KP, Della-Latta P, Whittier S, Sheth S, Hendrickson JE, Zimring JC, Brittenham GM und Spitalnik SL.** Transfusion of red blood cells after prolonged storage produces harmful effects that are mediated by iron and inflammation. *Blood* 115: 4284-4292, 2010

**Hod EA, Brittenham GM, Billote GB, Francis RO, Ginzburg YZ, Hendrickson JE, Jhang J, Schwartz J, Sharma S, Sheth S, Sireci AN, Stephens HL, Stotler BA, Wojczyk BS, Zimring JC und Spitalnik SL.** Transfusion of human volunteers with older, stored red blood cells produces extravascular hemolysis and circulating non-transferrin-bound iron. *Blood* 118: 6675-6682, 2011.

**Hod EA und Spitalnik SL.** Harmful effects of transfusion of older stored red blood cells: iron and inflammation. *Transfusion* 51: 881-885, 2011.

**Hoelt K, Bloch DB, Graw JA, Malhotra R, Ichinose F und Bagchi A.** Iron Loading Exaggerates the Inflammatory Response to the Toll-like Receptor 4 Ligand Lipopolysaccharide by Altering Mitochondrial Homeostasis. *Anesthesiology* 127: 121-135, 2017.

**Holland HD.** The oxygenation oft he atmosphere and oceans. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, DOI: 10.1098/rstb.2006.1838, 2006

**Hoppe-Seyler F.** Über die oxydation in lebendem blute. *Med-chem Untersuch Lab* 1: 133–140, 1866.

**Hvidberg V, Maniecki MB, Jacobsen C, Hojrup P, Moller HJ und Moestrup SK.** Identification of the receptor scavenging hemopexin-heme complexes. *Blood* 106: 2572-2579, 2005.

**Hwang PK und Greer J.** Interaction between hemoglobin subunits in the hemoglobin. haptoglobin complex. *The Journal of biological chemistry* 255: 3038-3041, 1980.

- Kirkinezos IG und Moraes CT.** Reactive oxygen species and mitochondrial diseases. *Semin Cell Dev Biol* 12: 449-457, 2001.
- Klein HG, Spahn DR, and Carson JL.** Red blood cell transfusion in clinical practice. *Lancet* 370: 415-426, 2007.
- Koch CG, Li L, Sessler DI, Figueroa P, Hoeltge GA, Mihaljevic T und Blackstone EH.** Duration of red-cell storage and complications after cardiac surgery. *The New England journal of medicine* 358: 1229-1239, 2008.
- Koskenkorva-Frank TS, Weiss G, Koppenol WH und Burckhardt S.** The complex interplay of iron metabolism, reactive oxygen species, and reactive nitrogen species: insights into the potential of various iron therapies to induce oxidative and nitrosative stress. *Free radical biology & medicine* 65: 1174-1194, 2013.
- Kris-Etherton PM, Lichtenstein AH, Howard BV, Steinberg D und Witztum JL.** Antioxidant vitamin supplements and cardiovascular disease. *Circulation* 110: 637-641, 2004.
- Lacroix J, Hebert PC, Fergusson DA, Tinmouth A, Cook DJ, Marshall JC, Clayton L, McIntyre L, Callum J, Turgeon AF, Blajchman MA, Walsh TS, Stanworth SJ, Campbell H, Capellier G, Tiberghien P, Bardiaux L, van de Wating L, van der Meer NJ, Sabri E, Vo D, Investigators A und the Canadian Critical Care Trials G.** Age of transfused blood in critically ill adults. *The New England journal of medicine* 372: 1410-1418, 2015.
- Lalich JJ.** The Influence of Injections of Homologous Hemoglobin on the Kidneys of Normal and Dehydrated Animals. *The Journal of experimental medicine* 86: 153-158, 1947.
- Larsen R, Gozzelino R, Jeney V, Tokaji L, Bozza FA, Japiassu AM, Bonaparte D, Cavalcante MM, Chora A, Ferreira A, Marguti I, Cardoso S, Sepulveda N, Smith A und Soares MP.** A central role for free heme in the pathogenesis of severe sepsis. *Science translational medicine* 2: 51ra71, 2010.
- Lesic B, Foulon J und Carniel E.** Comparison of the effects of deferiprone versus deferoxamine on growth and virulence of *Yersinia enterocolitica*. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 1741-1745, 2002
- Lipiski M, Deuel JW, Baek JH, Engelsberger WR, Buehler PW und Schaer DJ.** Human Hp1-1 and Hp2-2 phenotype-specific haptoglobin therapeutics are both effective in vitro and in guinea pigs to attenuate hemoglobin toxicity. *Antioxidants & redox signaling* 19: 1619-1633, 2013.
- Nakai K, Sakuma I, Ohta T, Ando J, Kitabatake A, Nakazato Y und Takahashi TA.** Permeability characteristics of hemoglobin derivatives across cultured endothelial cell monolayers. *The Journal of laboratory and clinical medicine* 132: 313-319, 1998.
- Nielsen MJ und Moestrup SK.** Receptor targeting of hemoglobin mediated by the haptoglobins: roles beyond heme scavenging. *Blood* 114: 764-771, 2009.
- Minneci PC, Deans KJ, Zhi H, Yuen PS, Star RA, Banks SM, Schechter AN, Natanson C, Gladwin MT und Solomon SB.** Hemolysis-associated endothelial dysfunction mediated by accelerated NO inactivation by decompartmentalized oxyhemoglobin. *The Journal of clinical investigation* 115: 3409-3417, 2005.

**Muenster S, Beloiartsev A, Yu B, Du E, Abidi S, Dao M, Fabry G, Graw JA, Wepler M, Malhotra R, Fernandez BO, Feelisch M, Bloch KD, Bloch DB und Zapol WM.** Exposure of Stored Packed Erythrocytes to Nitric Oxide Prevents Transfusion-associated Pulmonary Hypertension. *Anesthesiology* 125: 952-963, 2016.

**Munoz M, Romero A, Morales M, Campos A, Garcia-Erce JA und Ramirez G.** Iron metabolism, inflammation and anemia in critically ill patients. A cross-sectional study. *Nutr Hosp* 20: 115-120, 2005

**Pagani A, Nai A, Corna G, Bosurgi L, Rovere-Querini P, Camaschella C und Silvestri L.** Low hepcidin accounts for the proinflammatory status associated with iron deficiency. *Blood* 118: 736-746, 2011.

**Pannirselvam M, Wiehler WB, Anderson T und Triggle CR.** Enhanced vascular reactivity of small mesenteric arteries from diabetic mice is associated with enhanced oxidative stress and cyclooxygenase products. *Br J Pharmacol* 144: 953-960, 2005.

**Perutz MF, Rossmann MG, Cullis AF, Muirhead H, Will G und North ACT.** Structure of haemoglobin: a three-dimensional Fourier synthesis at 5.5-Å resolution, obtained by X-ray analysis. *Nature* 185: 416-422, 1960.

**Prestia K, Bandyopadhyay S, Slate A, Francis RO, Francis KP, Spitalnik SL, Fidock DA, Brittenham GM und Hod EA.** Transfusion of stored blood impairs host defenses against Gram-negative pathogens in mice. *Transfusion* 54: 2842-2851, 2014.

**Rapido F, Brittenham GM, Bandyopadhyay S, La Carpia F, L'Acqua C, McMahon DJ, Rebbaa A, Wojczyk BS, Netterwald J, Wang H, Schwartz J, Eisenberger A, Soffing M, Yeh R, Divgi C, Ginzburg YZ, Shaz BH, Sheth S, Francis RO, Spitalnik SL und Hod EA.** Prolonged red cell storage before transfusion increases extravascular hemolysis. *The Journal of clinical investigation* 127: 375-382, 2017.

**Rich PR.** The molecular machinery of Keilin's respiratory chain. *Biochemical Society Transactions* 31: 1095-1105, 2003.

**Ricquier D und Bouillaud F.** The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP. *Biochem J* 345: 161-179, 2000

**Ricquier D.** UCP1, the mitochondrial uncoupling protein of brown adipocyte: A personal contribution and a historical perspective. *Biochimie* 134: 3-8, 2017.

**Roberts CK, Barnard RJ, Sindhu RK, Jurczak M, Ehdaie A und Vaziri ND.** A high-fat, refined-carbohydrate diet induces endothelial dysfunction and oxidant/antioxidant imbalance and depresses NOS protein expression. *J Appl Physiol* 98: 203-210, 2005.

**Saraste M.** Oxidative phosphorylation at the fin de siècle. *Science* 283: 1488-1493, 1999.

**Satoh T, Satoh H, Iwahara S, Hrkal Z, Peyton DH und Muller-Eberhard U.** Roles of heme iron-coordinating histidine residues of human hemopexin expressed in baculovirus-infected insect cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 8423-8427, 1994.

**Schaer DJ, Buehler PW, Alayash AI, Belcher JD und Vercellotti GM.** Hemolysis and free hemoglobin revisited: exploring hemoglobin and hemin scavengers as a novel class of therapeutic proteins. *Blood* 121: 1276-1284, 2013.

**Schaer CA, Deuel JW, Schildknecht D, Mahmoudi L, Garcia-Rubio I, Owczarek C, Schauer S, Kissner R, Banerjee U, Palmer AF, Spahn DR, Irwin DC, Vallelian F, Buehler PW und Schaer DJ.** Haptoglobin Preserves Vascular Nitric Oxide Signaling During Hemolysis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2015.

**Sies H.** Biochemie des oxidativen Stress. *Angew Chemie* 98: 1061-1075, 1986.

**Sies H.** Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem* 215: 213-219, 1993

**Smorodchenko A, Rupprecht A, Sarilova I, Ninnemann O, Bräuer AU, Franke K, Schumacher S, Tschritz S, Nitsch R, Schuelke M und Pohl EE.** Comparative analysis of uncoupling 4 distribution in various tissues under physiological conditions and during development. *Biochim Biophys Acta* 1788: 2309-2319, 2009.

**Sperling E, Frieder C, Raman A, Girguis P, Levin L und Knoll A.** Oxygen, ecology, and the Cambrian radiation of animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110: 13446–13451, 2013.

**Steiner ME, Ness PM, Assmann SF, Triulzi DJ, Sloan SR, Delaney M, Granger S, Bennett-Guerrero E, Blajchman MA, Scavo V, Carson JL, Levy JH, Whitman G, D'Andrea P, Pulkrabek S, Ortel TL, Bornikova L, Raife T, Puca KE, Kaufman RM, Nuttall GA, Young PP, Youssef S, Engelman R, Greilich PE, Miles R, Josephson CD, Bracey A, Cooke R, McCullough J, Hunsaker R, Uhl L, McFarland JG, Park Y, Cushing MM, Klodell CT, Karanam R, Roberts PR, Dyke C, Hod EA und Stowell CP.** Effects of red-cell storage duration on patients undergoing cardiac surgery. *The New England journal of medicine* 372: 1419-1429, 2015.

**Sugamura K und Keaney JF.** Reactive oxygen species in cardiovascular disease. *Free Radical Biology & Medicine* 51: 978-992, 2011.

**Tanaka K, Kanamori Y, Sato T, Kondo C, Katayama Y, Yada I, Yuasa H und Kusagawa M.** Administration of haptoglobin during cardiopulmonary bypass surgery. *ASAIO transactions* 37: M482-483, 1991.

**van Swelm RP, Wetzels JF, Verweij VG, Laarakkers CM, Pertijs JC, van der Wijst J, Thevenod F, Masereeuw R und Swinkels DW.** Renal Handling of Circulating and Renal-Synthesized Heparin and Its Protective Effects against Hemoglobin-Mediated Kidney Injury. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 27: 2720-2732, 2016.

**Thomsen JH, Etzerodt A, Svendsen P und Moestrup SK.** The haptoglobin-CD163-heme oxygenase-1 pathway for hemoglobin scavenging. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2013: 523652, 2013

**Vermeulen-Windsant IC, Snoeijs MG, Hanssen SJ, Altintas S, Heijmans JH, Koepffel TA, Schurink GW, Buurman WA und Jacobs MJ.** Hemolysis is associated with acute kidney injury during major aortic surgery. *Kidney international* 77: 913-920, 2010.

**Vermeulen-Windsant IC, de Wit NC, Sertorio JT, van Bijnen AA, Ganushchak YM, Heijmans JH, Tanus-Santos JE, Jacobs MJ, Maessen JG und Buurman WA.** Hemolysis during cardiac surgery is associated with increased intravascular nitric oxide consumption and perioperative kidney and intestinal tissue damage. *Frontiers in physiology* 5: 340, 2014.

**Villagra J, Shiva S, Hunter LA, Machado RF, Gladwin MT und Kato GJ.** Platelet activation in patients with sickle disease, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and nitric oxide scavenging by cell-free hemoglobin. *Blood* 110: 2166-2172, 2007.

**Vinchi F, De Franceschi L, Ghigo A, Townes T, Cimino J, Silengo L, Hirsch E, Altruda F und Tolosano E.** Hemopexin therapy improves cardiovascular function by preventing heme-induced endothelial toxicity in mouse models of hemolytic diseases. *Circulation* 127: 1317-1329, 2013.

**Wang D, Sun J, Solomon SB, Klein HG und Natanson C.** Transfusion of older stored blood and risk of death: a meta-analysis. *Transfusion* 52: 1184-1195, 2012.

**Watson PE, Watson ID und Batt RD.** Total body water volumes for adult males and females estimated from simple anthropometric measurements. *Am J Clin Nutr* 33: 27-39, 1980.

**Wicher KB und Fries E.** Haptoglobin, a hemoglobin-binding plasma protein, is present in bony fish and mammals but not in frog and chicken. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 4168-4173, 2006.

**Yu B, Raheer MJ, Volpato GP, Bloch KD, Ichinose F und Zapol WM.** Inhaled nitric oxide enables artificial blood transfusion without hypertension. *Circulation* 117: 1982-1990, 2008.

**Yu B, Shahid M, Egorina EM, Sovershaev MA, Raheer MJ, Lei C, Wu MX, Bloch KD und Zapol WM.** Endothelial dysfunction enhances vasoconstriction due to scavenging of nitric oxide by a hemoglobin-based oxygen carrier. *Anesthesiology* 112: 586-594, 2010.

**Zallen G, Offner PJ, Moore EE, Blackwell J, Ciesla DJ, Gabriel J, Denny C und Silliman CC.** Age of transfused blood is an independent risk factor for postinjury multiple organ failure. *American journal of surgery* 178: 570-572, 1999.

## 6 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Claudia D. Spies, Direktorin der Klinik für Anästhesiologie mit Schwerpunkt operative Intensivmedizin der Charité am Campus Virchow-Klinikum und Campus Charité Mitte für die unermüdliche und hervorragende Unterstützung meiner wissenschaftlichen Arbeit, die exzellenten Rahmenbedingungen sowie das in mich gesetzte Vertrauen.

Ich möchte mich weiterhin herzlich bei meinen wissenschaftlichen Lehrern Prof. Dr. Warren M. Zapol, Reginald Jenney Professor für Anästhesie, dem leider verstorbenen William T.G. Morton Professor für Anästhesie, Prof. Dr. Kenneth D. Bloch, und Prof. Dr. Donald B. Bloch am Anesthesia Center for Critical Care Research des Massachusetts General Hospitals der Harvard Medical School in Boston bedanken. Die exzellente wissenschaftliche Ausbildung und das hervorragende Arbeitsumfeld haben nicht nur den Grundstein für diese Arbeit gelegt sondern auch mein Interesse gestärkt, langfristig als Arzt und Wissenschaftler tätig zu sein.

Großer Dank gilt ebenfalls Priv.-Doz. Dr. med. Jan-Peter Braun für seine hervorragende Unterstützung bei den klinischen Forschungsprojekten auf den Intensivstationen unserer Klinik am Campus Charité Mitte.

Für die anregende und fruchtbare Zusammenarbeit gilt mein großer Dank ferner allen meinen Kollegen in den Laboren, in denen ich tätig sein durfte, namentlich Dr. rer. medic. Clarissa von Haefen, Dr. med. Arkadi Beloiartsev, Konrad Hoeft, Dr. med. Mario Menk, Dr. med. Stefan Münster, Dr. Akito Nakagawa, Dr. Alessandro Santini, Dr. med. Martin Wepler und Dr. Luca Zazzeron.

Den wohl größten Dank möchte ich schließlich an meine Eltern sowie an meine Geschwister richten. Für alle Unterstützung und das stete Vertrauen und insbesondere Dr. rer. sci. Frederik Graw für die exzellente Hilfe bei jedem mathematischen Problem.

## 7 Eidesstattliche Erklärung

### Erklärung

#### § 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

Berlin, den 24. Mai 2017