

Aus der Klinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie  
Direktorin: Frau Prof. G. F. E. Nöldge-Schomburg

**Innovative Therapieansätze beim Ischämie-Reperfusionsschaden:  
Untersuchungen zu Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase-Inhibitoren  
und einem anti-inflammatorischen Fibrinolyseprodukt  
im Klein- und Großtierexperiment.**



**Kumulative Habilitationsschrift  
zum Erlangen des akademischen Grades  
„Dr. med. habil. (Doctorus habilitatus)“ an der  
Medizinischen Fakultät der  
Universität Rostock**

vorgelegt von

**Dr. med. J. P. Roesner**  
geboren am 02.07.1972  
in Krefeld

Rostock, den 20.05.2010

**Gutachter der Habilitationsschrift:**

Prof. Dr. Gabriele Nöldge-Schomburg  
Direktorin der Klinik & Poliklinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie  
Universität Rostock  
Schillingallee 35  
18057 Rostock

Prof. Dr. Gregor Theilmeier  
Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin  
Bereich Experimentelle Anästhesiologie  
Medizinische Hochschule Hannover  
Carl-Neuberg-Str. 1  
30625 Hannover

Prof. Dr. T. Koch  
Direktorin der  
Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin  
Universitätsklinik Dresden  
Fetscherstraße 74  
01307 Dresden

Die öffentlichen Habilitationsverteidigung fand am 22.12.2009 statt.

Die öffentlichen Lehrprobe fand am 11.01.2010 statt.

## Inhaltsverzeichnis:

	Seite
<b>1. Einleitung</b>	4
<b>2. Fragestellung</b>	9
<b>3. Originalarbeiten:</b>	11
1. Protektive Effekte der PARP-Inhibition auf die Lebermikrozirkulation und –funktion nach hämorrhagischem Schock und Reperfusion mittels Volumentherapie – Akutversuche an instrumentierten männlichen Sprague Dawley Ratten. <i>Roesner JP, Vagts DA, Iber T, Eipel C, Vollmar B, Nöldge-Schomburg GFE</i> <i>Protective effects of PARP inhibition on liver microcirculation and function after haemorrhagic shock and resuscitation in male rats. Intensive Care Med 2006;32:1649-1657</i>	11
2. Das vom Fibrin abstammende Spaltprodukt B $\beta$ <sub>15-42</sub> ist kardioprotektiv beim Reperfusionsschaden nach Myokardinfarkt – Akutversuche an instrumentierten deutschen Hausschweinen. <i>Roesner JP, Petzelbauer P, Koch A, Mersmann J, Zacharowski PA, Boehm O, Reingruber S, Pasteiner W, Mascher D, Wolzt M, Barthuber C, Nöldge-Schomburg GEF, Scheeren TW, Zacharowski K</i> <i>The fibrin-derived peptide Bbeta<sub>15-42</sub> is cardioprotective in a pig model of myocardial ischemia-reperfusion injury. Crit Care Med 2007;35:1730-1735</i>	13
3. B $\beta$ <sub>15-42</sub> (FX06) reduziert den pulmonalen, kardialen, hepatischen und intestinalen Schaden nach hämorrhagischem Schock und Reperfusion mittels Volumentherapie – Akutversuche an instrumentierten deutschen Hausschweinen. <i>Roesner JP, Petzelbauer P, Koch A, Tran N, Iber T, Vagts DA, Scheeren TWL, Vollmar B, Nöldge-Schomburg GFE, Zacharowski K</i> <i>B<math>\beta</math><sub>15-42</sub> (FX06) reduces pulmonary, myocardial, liver and small intestine damage in a pig model of hemorrhagic shock and reperfusion. Crit Care Med 2009;37:598-605</i>	16
4. Genaue und kontinuierliche Messung des Sauerstoffdefizits während eines hämorrhagischen Schocks. Akutversuche an instrumentierten deutschen Hausschweinen. <i>Roesner JP, Koch A, Bateman R, Scheeren TW, Zander R, Nöldge-Schomburg GE, Zacharowski K</i> <i>Accurate and continuous measurement of oxygen deficit during haemorrhage in pigs. Resuscitation 2009;80:259-263</i>	18
5. Eine doppelblinde und monozentrische Studie zu Auswirkungen von FX06 nach hämorrhagischem Schock und Reperfusion mittels Volumentherapie - subchronische Versuche an instrumentierten deutschen Hausschweinen. <i>Roesner JP, Petzelbauer P, Koch A, Tran N, Iber T, Mutz C, Vollmar B, Nöldge-Schomburg GE, Zacharowski K</i> <i>A double blind, single centre, sub-chronic reperfusion trial evaluating FX06 following haemorrhagic shock in pigs. Resuscitation 2009;80:264-271</i>	21

<b>4. Diskussion</b>	24
<b>5. Zusammenfassung/ Ausblick</b>	31
<b>6. Selbständigkeitserklärung</b>	32
<b>7. Danksagung</b>	33
<b>8. Lebenslauf</b>	35
<b>9. Publikationsliste</b>	36
<b>10. Literaturverzeichnis</b>	38

## 1. Einleitung

### **Pathophysiologie der Ischämie:**

Die Minderperfusion von Geweben, Organen oder des gesamten Organismus (z.B. beim hämorrhagischen Schock) verursacht eine Sauerstoffunterversorgung von Zellen. Um dennoch den zellulären Energiebedarf zu decken, wird kompensatorisch die anaerobe Glykolyse gesteigert. Dies reicht jedoch längerfristig nicht aus, um eine adäquate Energieversorgung der Zelle zu gewährleisten, so dass vermehrt energiereiche Substanzen (Adenosintriphosphat, ATP) abgebaut werden, wobei Hypoxanthin bzw. Xanthin als Abbauprodukte entstehen.

Erfolgt keine Wiederherstellung der Durchblutung des Gewebes (Reperfusion), tritt eine ischämische Nekrose der Zellen ein und die Zelle bzw. das Gewebe stirbt.

### **Pathophysiologie der Reperfusion:**

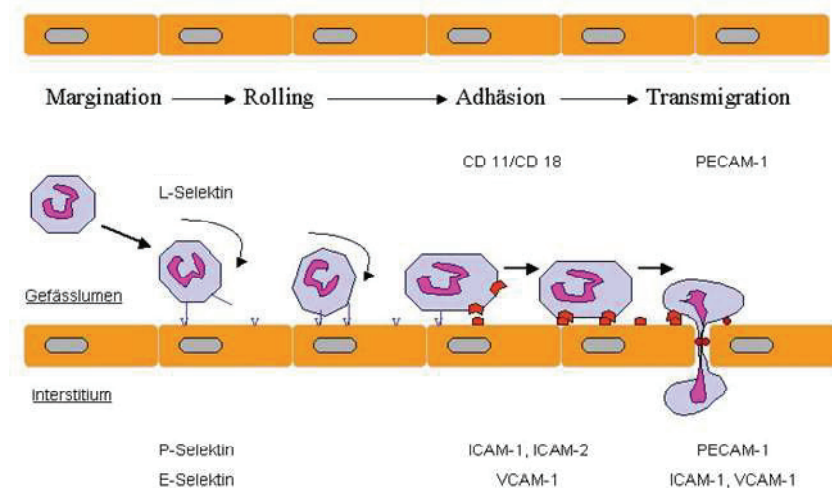
Während der Reperfusion werden die o.g. Abbauprodukte des ATP rasch oxidiert. In weiteren Reaktionsschritten entstehen hochtoxische Sauerstoffintermediate, die Freien Radikale (1,2). Sind die zelleigenen antioxidativen Schutzsysteme (Superoxiddismutase, Katalase, Glutathionperoxidase, Glutathion, Melatonin, Karotinoide u.ä.) nicht in der Lage, diese Radikale zu inaktivieren, spricht man von „Oxidativem Stress“. In der Folge werden proinflammatorische Substanzen (Zytokine, Chemokine u.a.) freigesetzt sowie Ionen-Kanäle und -Rezeptoren aktiviert, wodurch komplexe inflammatorische Reaktionen ausgelöst werden (3,4). Neuere Untersuchungen zeigen allerdings, dass für eine Aktivierung zellulärer inflammatorischer Prozesse freie Radikale nicht unbedingt erforderlich sind, sondern endogene und exogene Oxidantien wie Peroxide, Aldehyde, Quinone und Epoxide ausreichen (5).

Nach einer Ischämie ist die Reperfusion für das zelluläre Überleben unabdingbar, jedoch verstärkt sie das Ausmaß des ischämischen Zellschadens unter anderem durch Aktivierung von Inflammationskaskaden. Dies wird auch als „Reflow-Paradox“ bezeichnet (6). Dabei werden zirkulierende Leukozyten aktiviert, die sich verstärkt am Endothel anlagern und später in das geschädigte Gewebe einwandern (7,8).

Ortsständige aktivierte Makrophagen produzieren zusätzlich Sauerstoffradikale, Stickstoffmonoxid (NO) und andere proinflammatorische Mediatoren (Zytokine wie TNF-alpha, Interleukin-(IL-)6, IL-1 $\beta$ , IL-12, *monocytes chemotactic protein-1 (MCP-1)* oder Chemokine aus der CXC-Gruppe (9,10). Diese führen auf der Oberfläche der Endothelzellen und polymorphkernigen Leukozyten (PMN) zu einer gesteigerten Expression von

Adhäsionsmoleküle wie *vascular adhesion molecule-1 (VCAM-1)*, *intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)* u. a. (9).

Die Interaktion der Adhäsionsmoleküle auf der Oberfläche der PMN und des Endothels führt zu einer Annäherung der PMN an die Gefäßwand (*margination*) und einer lockeren Anhaftung entlang des Endothels (*rolling*), gefolgt von einer Anlagerung an die Gefäßwand (adhesion) und Einwanderung (*transmigration*) in das Parenchym der betroffenen Organe (s. Abbildung 1).



### Abbildung 1:

Die Leukozyten-Endothel-Interaktion des „Reflow-Paradox“ lässt sich in vier Teilschritte, (Margination, Rolling, Adhäsion und Transmigration) untergliedern. Der Vorgang der Interaktion wird durch verschiedene Adhäsionsmoleküle vermittelt.

CD = Cluster of Differentiation; ICAM = Interstitiell Cell (intercellular) Adhesion Molecule; VCAM = Vascular Cell Adhesion Molecule; PECAM = Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule

Die Einwanderung von Leukozyten in geschädigtes Gewebe verursacht eine weitere Zellschädigung, da nekrotische Zellen durch die Leukozyten abgeräumt werden, wobei wiederum Freie Radikale entstehen. Des Weiteren führt der Zellerfall zur Freisetzung lytischer Enzyme, die für eine weitere Zellschädigung verantwortlich sind.

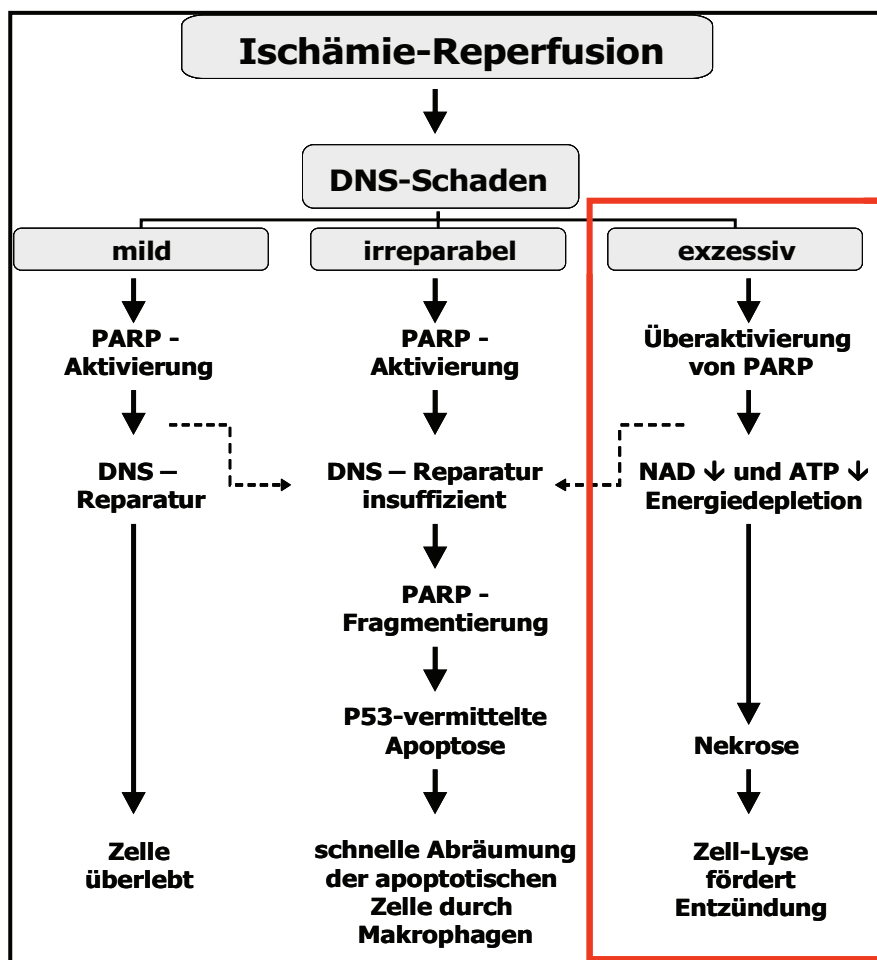
Die Einwanderung von Leukozyten wird als einer der wichtigsten Schritte im Verlauf der Reperfusion-bedingten Gewebeschädigung angesehen (4,11,12). Bei der Transmigration von Leukozyten spielen zum einen das in allen Zellen vorkommende „Wächterenzym“, die Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP), zum anderen inflammatorische Fibrinolyseprodukte eine wichtige Rolle.

### Aktivierung der Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP)

Selbst unter physiologischen Bedingungen können Schäden der Desoxynukleinsäure (DNS) auftreten. Diese Schäden werden von einem in allen eukaryotischen Zellen vorkommenden

„Wächterenzym“, der Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP, 116 kDa), früher auch Poly-(ADP-Ribose)-Synthetase (PARS) genannt, zusammen mit den Enzymen des sog. *base-excision-and-repair complex* (BER: Glykosylasen, Endonucleasen, Polymerasen, Ligasen u.a.) in energieverbrauchenden Prozessen repariert (13). Die PARP stellt damit ein wichtiges Enzym dar, das das zelluläre Überleben durch kontinuierliche „DNS-Reparatur“ sichert. Ist der DNS-Schaden zu groß, um repariert zu werden, wird die PARP mittels enzymatischer Aufspaltung in Fragmente inaktiviert. Die Zelle ist nun in der Lage, bei ausreichenden zellulären Energiespeichern den Prozess der Apoptose, des programmierten Zelltods, zu aktivieren. Der Nachweis der zwei PARP-Fragmente (24 und 89 kDa) gilt daher als Apoptosenachweis (14).

Bei exzessiver DNS-Schädigung kann eine energieverbrauchende Überaktivierung von PARP auftreten. In frustranen Reparaturversuchen werden zelluläre Energiespeicher, d.h. Nicotinamid (NAD) und Adeninnukleotidtriphosphat (ATP) verbraucht. Dies führt unter Umständen zu einer Energiedepletion der Zelle und in der Folge zum Zelltod (Abbildung 2).



**Abbildung 2:**

PARP-Aktivierung und deren Folge in Abhängigkeit vom Schweregrad der DNS-Schädigung (modifiziert nach 15)

Neben der DNS-Reparatur nimmt PARP eine Schlüsselposition in der Regulation der Transkription pro-inflammatorischer Gene und der Expression inflammatorischer Zytokine ein. PARP ist beispielsweise ein Co-Activator von *nuclear-factor-kappa-B(NF-κB)*-abhängigen Transkriptionsprozessen (16,17). Diese können von sog. PARP-Inhibitoren pharmakologisch gehemmt werden, wodurch Proteine wie das *intercellular adhesion molecule (ICAM-1)* sowie die *inducible nitric oxide synthase (iNOS)* nicht oder in geringerem Ausmaß exprimiert werden (15). Des Weiteren ist die PARP an der Aktivierung anderer proinflammatorischer Signalkaskaden (JNK, p38, MAP-Kinase) (18) und der Transkriptionsfaktoren *activator-protein-1 (AP-1)* und *signal transducer and activator of transcription-1 (STAT-1)* (19) beteiligt. Damit greift die PARP an mehreren Stellen regulatorisch in Inflammationsprozesse ein. Inhibitoren der PARP wirken dementsprechend antiinflammatorisch, indem sie die Leukozyten-Endothel-Interaktionen verringern und die Freisetzung inflammatorischer Zytokine reduzieren.

### **Fibrinspaltprodukte bei Entzündungsreaktionen**

Seit den 70er Jahren gibt es Hinweise darauf, dass Fibrinogen bzw. Fibrin nicht nur an der Blutgerinnung, sondern auch an der Genese von inflammatorischen Prozessen beteiligt ist. So wurden beim Menschen Fibrinablagerungen an der Gefäßwand mit entzündlichen Erkrankungen in Zusammenhang gebracht (20). Des Weiteren konnte in Tiermodellen gezeigt werden, dass bei Abwesenheit von Fibrinogen experimentell ausgelöste Entzündungskrankheiten in deutlich geringerem Ausmaß ablaufen (21,22).

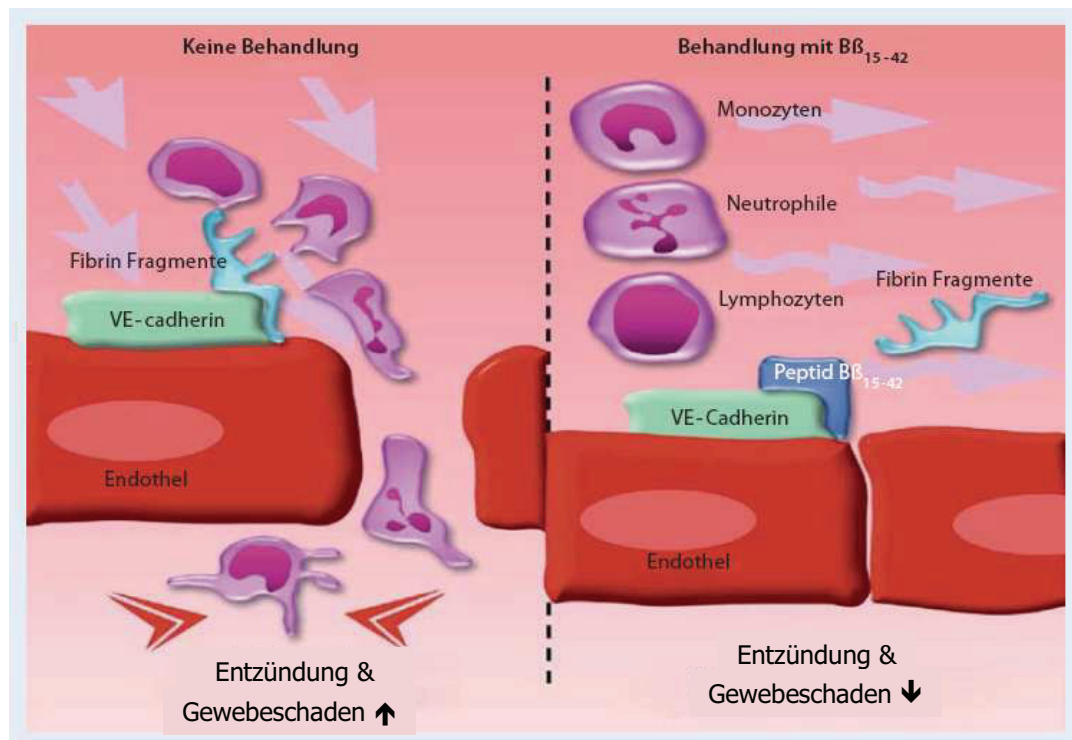
Fibrin wird bei Entzündungsreaktionen gebildet, entlang von Gefäßwänden abgelagert sowie gleichzeitig durch Plasmin abgebaut. Dabei entstehen sog. D- und E-Fragmente. Lediglich E-Fragmente besitzen sowohl Bindungsstellen für *vascular endothelial cadherin (VE-Cadherin)* als auch für CD11c, einen Oberflächenmarker von Leukozyten. VE-Cadherin ist ein endothelzellspezifisches Adhäsionsmolekül, das bei der Transmigration von Leukozyten aus dem Gefäß ins Gewebe eine wichtige Rolle spielt (23). Damit haben Fibrinfragmente eine pro-inflammatorische Wirkung, indem sie über eine initiale Anhaftung am Endothel schließlich die Transmigration von Leukozyten aus dem Blutstrom in das umliegende Gewebe fördern (24). Als Bindungsstelle für das VE-Cadherin auf den Endothelzellen wurde ein kurzer Peptidabschnitt auf den E-Fragmenten identifiziert ( $\beta\beta_{15-42}$  mit der Aminosäuresequenz GHRPLDKKREEAPSLRPAPPPISGGGYR; 24).

Das Fibrinfragment  $\beta\beta_{15-42}$  entsteht im menschlichen Organismus während der Fibrinspaltung aus E-Fragmenten in niedriger Konzentration (0,41 pmol/ml) (25). Es bindet



nur an VE-Cadherin, jedoch nicht an Leukozyten. Wird es in supraphysiologischer Dosis verabreicht, werden die Bindungsstellen an VE-Cadherin besetzt, so dass weniger Leukozyten-Endothel-Interaktionen auftreten und damit die Leukozytentransmigration in geschädigtes Gewebe signifikant reduziert wird (Abbildung 3).

Das körpereigene Peptid  $\text{B}\beta_{15-42}$  (als Testsubstanz FX06 genannt) repräsentiert eine neue anti-inflammatorische Substanzklasse, die die Auswanderung von Leukozyten in geschädigtes Gewebe reduziert (24).



**Abbildung 3:**

Anti-inflammatorischer Wirkmechanismus von  $\text{B}\beta_{15-42}$  nach supraphysiologischer Dosis (modifiziert nach Zacharowski, 26).

Auf der linken Seite der Abbildung binden die bei Reperfusion entstandenen pro-inflammatorischen Fibrinspaltprodukte (E-Fragmente) an VE-Cadherin und Leukozyten und unterstützen die Leukozytentransmigration in das geschädigte Gewebe. Dadurch werden die Entzündung und der Gewebeschaden verstärkt. Wird  $\text{B}\beta_{15-42}$  (FX06) appliziert (rechte Seite der Abbildung), werden die Bindungsstellen an VE-Cadherin besetzt. Dadurch ist die Bindung von Leukozyten an VE-Cadherin vermindert und die Leukozytentransmigration in das geschädigte Gewebe reduziert. In der Folge verringert sich die Entzündung im betroffenen Gewebe und somit der Gewebeschaden.

## 2. Fragestellung

Eine Minderperfusion mit konsekutiver Einschränkung der Sauerstoffversorgung von Geweben oder Organen wird als Ischämie bezeichnet. Diese kann einerseits nach Verschluss eines Blutgefäßes isoliert an einem Organ auftreten, wie beispielsweise bei einem Myokardinfarkt. Andererseits erzeugt ein niedriger systemischer Perfusionsdruck wie beim hämorrhagischen Schock eine Ischämie in fast allen Organen und Geweben, so dass man von einer Ischämie des gesamten Organismus sprechen kann. Wird die Ischämie nicht beseitigt, werden die Zellen in Abhängigkeit von der Ischämietoleranz durch Sauerstoffmangel irreversibel geschädigt und nekrotisch. Die rechtzeitige Wiederherstellung der Perfusion von ischämischem Gewebe ist essentiell, damit ein Großteil der Zellen überleben kann (z.B. durch perkutane transluminale koronare Angioplastie [PTCA] beim Herzinfarkt bzw. mittels Volumentherapie beim hämorrhagischen Schock). Paradoxerweise verursacht die Wiederherstellung des regionalen und peripheren Blutflusses jedoch eine erneute, diesmal oxidative Zellschädigung. Dieses Phänomen wird auch als Reperusionsparadox bzw. „*lethal reperfusion therapy*“ bezeichnet (21). Dabei tritt neben der Nekrose auch vermehrt die Apoptose auf (27). Sie stellt im Gegensatz zur Nekrose einen geregelten und gesteuerten Zelluntergang dar. Am Ende eines apoptotischen Zelluntergangs werden die Überreste durch Makrophagen abgeräumt, ohne dass andere Zellen durch Freisetzung lytischer Enzyme geschädigt werden. Eine Hemmung der Apoptose reduziert im Tierversuch den myokardialen Reperfusionsschaden und könnte ein zukünftiger Therapieansatz sein (28).

Einen großen Stellenwert im Pathomechanismus des Reperfusionsschadens hat die Entzündung im betroffenen Gewebe. Dabei nimmt die Transmigration von Leukozyten aus dem Gefäßsystem in das geschädigte Gewebe eine Schlüsselposition ein (4,9,11,46,73). Bis heute ist kein Therapieverfahren bzw. Medikament beim Menschen zugelassen, das den Reperfusionsschaden verringern oder gar verhindern kann.

Deshalb war es Ziel der vorliegenden Arbeit, die Leukozytentransmigration pharmakologisch zu hemmen. Untersucht wurden zwei neue Substanztypen mit unterschiedlichen Wirkmechanismen: der PARP-Inhibitor 5-Aminoisoquinolinon (5-AIQ) und das vom Fibrin abstammende Peptid B $\beta$ <sub>15-42</sub>.

Dabei sollten folgende Fragestellungen beantwortet werden: Wird durch Hemmung der PARP bzw. den Einsatz des Peptids B $\beta$ <sub>15-42</sub> der Reperfusionsschaden an einzelnen Organen wie dem Herzen (nach Myokardinfarkt mit anschließender Reperfusion) oder am gesamten Organismus (am Beispiel des hämorrhagischen Schocks mit nachfolgender Volumentherapie) gemindert?

Die Fragestellung wurde nach jeweiliger Genehmigung der Tierversuche mit Hilfe von im weiteren detailliert beschriebenen Klein- und Großtierexperimenten bearbeitet.

### 3. Originalarbeiten

#### 1. Protektive Effekte der PARP-Inhibition auf die Lebermikrozirkulation und –funktion nach hämorrhagischem Schock und Reperfusion mittels Volumentherapie – Akutversuche an instrumentierten männlichen Sprague Dawley Ratten.

*Roesner JP, Vagts DA, Iber T, Eipel C, Vollmar B, Nöldge-Schomburg GFE. Protective effects of PARP inhibition on liver microcirculation and function after haemorrhagic shock and resuscitation in male rats. Intensive Care Med 2006;32:1649-1657*

**Fragestellung:** Reduziert die intravenöse Anwendung des PARP-Inhibitors 5-Aminoisoquinolinon (5-AIQ) den Reperfusionsschaden an der Leber nach hämorrhagischem Schock? Ist dabei eine Reduktion der Leukozyten-Endothel-Interaktion zu beobachten? Kann durch PARP-Inhibition der zelluläre Energiegehalt konserviert bzw. verbessert werden? Wirkt sich ein möglicher protektiver Effekt auch auf die Organfunktion der Leber aus?

**Material und Methoden:** In Pentobarbitalanästhesie wurden männliche Sprague-Dawley-Ratten tracheotomiert und maschinell beatmet. Die rechte Arteria carotis wurde zur invasiven Blutdruckmessung und Blutentnahme, die rechte Vena jugularis zur Medikamentenapplikation und Flüssigkeitstherapie kanüliert. Nach Laparotomie wurde der linke Leberlappen mobilisiert, um 180° rotiert und zur Intravitalmikroskopie mit einem Deckglas versehen. Der Gallengang wurde kanüliert, um die Galleproduktion kontinuierlich zu messen. Unter Aufrechterhaltung der Pentobarbitalanästhesie wurde ein hämorrhagischer Schock durch Blutentnahme über die A. carotis bis auf einen mittleren arteriellen Druck (MAP) von 40 mmHg für eine Stunde induziert. Der PARP-Inhibitor 5-Aminoisoquinolinon (5-AIQ) wurde mit  $3\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  (Schock+5-AIQ, n=7) bzw. identisches Volumen an Vehikellösung (Schock+Vehikel, n=7) 5 Minuten vor der Volumentherapie intravenös injiziert. Eine Kontrollgruppe (n=7) wurde operiert und für 5 h in Pentobarbitalnarkose beobachtet. Zu den Zeitpunkten Ausgangswert, Ende der Schockphase (nach 1h) sowie nach 1h bzw. 5h Reperfusion erfolgte die Analyse der hepatischen Mikrozirkulation mittels hochauflösender Multifluoreszenzmikroskopie. Dabei wurden die sinusoidale Leukozytenstase, venoläre Leukozytenadhärenz, sinusoidale Perfusion und NADH-Autofluoreszenz als parenchymatöser Hypoxiemarker erfasst. Der Gallefluss wurde als Parameter der hepatobiliären Exkretionsfunktion erfasst. Die kumulative Pentobarbitaldosis wurde ermittelt, um Einflüsse der Narkose auszuschließen. Zu den vier Messzeitpunkten wurden Blutproben zur Bestimmung der Freisetzung der Aspartat-Aminotransferase (AST), der Alanin-

Aminotransferase (ALT) und der Laktatdehydrogenase (LDH) entnommen.

Die Ergebnisse sind als Mediane mit 25/75 Quartilen dargestellt. Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mittels Wilcoxon-Rank-Sum-Test und innerhalb der Gruppen mittels Tukey-Kramer HSD-Test ermittelt.  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen und mittels „#“ gekennzeichnet.

**Ergebnisse:** Im Vergleich zu den unbehandelten Tieren (Schock+Vehikel) war in der Gruppe Schock+5-AIQ nach 5h Reperfusion eine geringere Leukozyten-Endothel-Interaktion in der Leber mit einer geringeren sinusoidalen Leukozytenstase [33 (30/37) vs. 66<sup>#</sup> (42/78)/mm<sup>2</sup>] und einer geringeren venolären Leukozytenadhärenz [80 (33/105) vs. 605<sup>#</sup> (493/673)/mm<sup>2</sup>] nachweisbar. Die sinusoidale Perfusion als Zeichen der nutritiven Perfusion war weniger stark eingeschränkt [92 (90/94) vs. 82<sup>#</sup> (78/83) %]. Die NADH-Autofluoreszenz als Marker einer Gewebhypoxie war verringert [91 (89/99) vs. 118<sup>#</sup> (108/122) aU]. Die exkretorische Organfunktion gemessen als Gallefluss war höher als bei den unbehandelten Tieren [1,6 (1,5/1,8) vs. 1,1<sup>#</sup> (0,7/1,2)  $\mu\text{l Galle} \cdot \text{g Lebergewebe}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ]. Nach 5 h Reperfusion entsprach der Gallefluss in der Schock+5-AIQ-Gruppe dem des Ausgangswertes. Die AST, ALT und LDH in der Schock+5-AIQ-Gruppe waren niedriger als in der Schock-Gruppe [AST: 1215 (475/1487) vs. 1530<sup>#</sup> (1704/3090  $\text{U} \cdot \text{l}^{-1}$ ), ALT: 401 (240/502) vs. 609<sup>#</sup> (1571/730)  $\text{U} \cdot \text{l}^{-1}$ , LDH: 2545 (1570/2942) vs. 4075<sup>#</sup> (3342/4800)  $\text{U} \cdot \text{l}^{-1}$ ].

**Schlussfolgerung:** Die Ergebnisse unserer Untersuchung am hämorrhagischen Schockmodell akut instrumentierter Ratten zeigten, dass die systemische PARP-Inhibition mittels 5-AIQ vor Volumentherapie die intrahepatische Akkumulation von Leukozyten verringerte und die hepatische Mikrozirkulation und Oxygenierung verbesserte. Gleichzeitig wurde die Leberschädigung verringert, so dass die hepatobiliäre Exkretionsfunktion wieder das Ausgangsniveau erreichte.

## **2. Das vom Fibrin abstammende Spaltprodukt B $\beta$ <sub>15-42</sub> ist kardioprotektiv beim Reperfusionsschaden nach Myokardinfarkt – Akutversuche an instrumentierten deutschen Hausschweinen.**

*Roesner JP, Petzelbauer P, Koch A, Mersmann J, Zacharowski PA, Boehm O, Reingruber S, Pasteiner W, Mascher D, Wolzt M, Barthuber C, Nöldge-Schomburg GEF, Scheeren TW, Zacharowski K. The fibrin-derived peptide Bbeta<sub>15-42</sub> is cardioprotective in a pig model of myocardial ischemia-reperfusion injury. Crit Care Med 2007;35:1730-1735*

**Vorversuche:** In Vorversuchen an Ratten zeigte sich, dass nach Injektion von radioaktiv markiertem B $\beta$ <sub>15-42</sub> in einer Dosierung von 2,4 mg\*kg<sup>-1</sup> Körpergewicht ausreichend hohe Wirkspiegel in vielen Organen einschließlich des Herzens erreicht werden (Aurich Life Science GmbH, Tutzingen). Pharmakokinetische Untersuchungen zu B $\beta$ <sub>15-42</sub> wurden an Hunden vorgenommen. Nach i.v.-Bolusinjektionen von 2,4, 240 und 1200 mg\*kg<sup>-1</sup> Körpergewicht lag die Plasmahalbwertszeit unabhängig von der gewählten Dosis bei 15 Minuten (RCC Ltd., Itingen, Schweiz).

**Fragestellung:** Reduziert das aus Fibrin abgespaltene Peptid B $\beta$ <sub>15-42</sub> den Myokardschaden nach Myokardinfarkt und Reperfusion im Großtiermodell? Wie ausgeprägt ist die Kardioprotektion im Vergleich zur ischämischen Präkonditionierung?

**Material und Methoden:** 18 männliche deutsche Hausschweine wurden in Allgemeinanästhesie intubiert und druckkontrolliert beatmet. In der V. jugularis interna dextra wurden ein zentralvenöser Katheter und ein Pulmonalarterienkatheter platziert. Die rechte Arteria femoralis wurde mit einem PiCCO-Katheter zur invasiven Messung der Hämodynamik kanüliert.

Die Tiere wurden median sternotomiert. Nach Eröffnung des Perikards wurde die linke Koronararterie (LAD) präpariert. Eine Ligatur nach dem ersten Gefäßabgang wurde angelegt und erzeugte einen Myokardinfarkt. Nach 1 h wurde diese Ligatur eröffnet und das zuvor ischämische Areal reperfundiert. Nach 3 h wurde die Koronararterie erneut ligiert und der Farbstoff (Evans Blau) zentralvenös injiziert, woraufhin sich das perfundierte Gewebe blau anfärbte. Die Tiere wurden in tiefer Allgemeinanästhesie mittels Kaliumchloridüberdosierung getötet. Nach Entnahme des Herzens wurde der linke Ventrikel in 4 mm große transversale Scheiben geschnitten, die in definiertem Abstand beidseits digital fotografiert wurden. Das nicht perfundierte Ischämiegebiet stellte sich bei fehlender Blaufärbung rosa dar und wurde als Risikogebiet definiert. Diese Areale wurden aus den Schnitten herauspräpariert, erneut fotografiert und in Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) für 20 Minuten bei 38°C inkubiert. Lebende Zellen verstoffwechseln TTC in den roten Farbstoff Formazan, so dass eine

Differenzierung zwischen vitalem und nekrotischem Gewebe möglich ist. Die Gewebestücke wurden erneut digital fotografiert. Aus den Bildern wurden jeweils der Ventrikel, das Risiko- und das Infarktgebiet rekonstruiert und vermessen. Zur weiteren Quantifizierung des myokardialen Schadens wurden als Serummarker für myokardiale Zellschädigung das Troponin-I (TnI), die Kreatininkinase und die Laktatdehydrogenase gemessen. Das Monitoring der kardialen Funktion erfolgte mittels invasiver Messung der Hämodynamik (PiCCO-System) und Bestimmung der gemischt-venösen Sauerstoffsättigung des Blutes.

Die Therapiegruppe erhielt zur Reperfusion einen  $B\beta_{15-42}$ -Bolus i.v. ( $B\beta_{15-42}$ , 2,4 mg\*kgKG<sup>-1</sup>). Die Kontrollgruppe (n=6) erhielt einen i.v.-Bolus eines sog. Randompeptids, das kein inflammatorisches bzw. antiinflammatorisches Potential aufweist. Eine weitere Gruppe diente als Positivkontrolle. Vor Infarktinduktion wurden diese Tiere ischämisch präkonditioniert. Dazu wurde die Koronararterie für 10 Minuten okkludiert und anschließend für 15 Minuten wieder eröffnet. Danach wurde die Koronararterie zur Infarktinduktion für 60 Minuten verschlossen (IP, n=6).

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte±Standardfehler dargestellt. Der statistische Vergleich der Gruppen erfolgte bei Normalverteilung mittels ANOVA (analysis of variance) gefolgt von einer Bonferroni post-hoc-Analyse.  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen und mittels „#“ gekennzeichnet.

**Ergebnisse:**  $B\beta_{15-42}$  reduzierte die Infarktgröße (Infarktgröße in % des Risikogebietes:  $B\beta_{15-42}$ :  $39 \pm 2,5^{\#}$  vs. IP:  $35 \pm 7,5^{\#}$  vs. Kontrolle:  $65 \pm 3,7$ ) und Troponin-I-Freisetzung (TnI:  $B\beta_{15-42}$ :  $1,9 \pm 0,2^{\#}$  vs. IP:  $1,8 \pm 0,4^{\#}$  vs. Kontrolle:  $3,4 \pm 0,6$  ng\*ml<sup>-1</sup>\*gGewebe<sup>-1</sup>) nach 3 h Reperfusion in gleicher Ausprägung wie die IP. Des Weiteren wurde die Interleukin (IL)-6- Freisetzung durch die Therapie mit  $B\beta_{15-42}$  deutlich gesenkt ( $B\beta_{15-42}$ :  $17,1 \pm 2,1^{\#}$  vs. IP:  $29,9 \pm 6,4$  vs. Kontrolle:  $28,6 \pm 5,7$  pg\*ml<sup>-1</sup>).

**Schlussfolgerung:** Das vom Fibrin abstammende Peptid  $B\beta_{15-42}$  wirkt nach myokardialer Ischämie und Reperfusion im Großtiermodell mit deutschen Hausschweinen kardioprotektiv. Die klinische Sicherheit beim gesunden Probanden wurde in einer Phase-I-Studie erfolgreich nachgewiesen. Die Ergebnisse untermauern das Konzept der Beteiligung von Fibrinfragmenten an der Genese des myokardialen Reperfusionsschadens, deren Wirkung durch  $B\beta_{15-42}$  partiell gehemmt werden kann.

### **Verträglichkeitsstudie (Phase I):**

Aufgrund der vorliegenden Daten sowie vergleichbarer Ergebnisse bei Mäusen (24,29) wurde eine Verträglichkeitsstudie (Phase I-Studie mit 30 Probanden, prospektiv, randomisiert, doppelblind, Plazebo-kontrolliert, Parallelgruppen, *single ascending dose*

*study*) mit B $\beta$ <sub>15-42</sub> mit verschiedenen Dosierungen (0,7 mg\*kg<sup>-1</sup>, 2,1 mg\*kg<sup>-1</sup>, 6,3 mg\*kg<sup>-1</sup> und 17,5 mg\*kg<sup>-1</sup>) an der Medizinischen Fakultät der Universität Wien durchgeführt. Es traten dabei keine nennenswerten Nebenwirkungen auf. Auch laborchemisch waren keine Auffälligkeiten insbesondere der Gerinnungsparameter zu beobachten.



### **3. B $\beta$ <sub>15-42</sub> (FX06) reduziert den pulmonalen, kardialen, hepatischen und intestinalen Schaden nach hämorrhagischem Schock und Reperfusion mittels Volumentherapie – Akutversuche an instrumentierten deutschen Hausschweinen.**

*Roesner JP, Petzelbauer P, Koch A, Tran N, Iber T, Vagts DA, Scheeren TWL, Vollmar B, Nöldge-Schomburg GFE, Zacharowski K. B $\beta$ <sub>15-42</sub> (FX06) reduces pulmonary, myocardial, liver and small intestine damage in a pig model of hemorrhagic shock and reperfusion. Crit Care Med 2009;37:598-605*

**Fragestellung:** Reduziert das aus Fibrin abgespaltene Peptid B $\beta$ <sub>15-42</sub> den Reperfusionsschaden des Herzens, der Lunge, der Leber und des Darms nach hämorrhagischem Schock und Reperfusion mittels Volumentherapie? Gibt es Veränderungen der regionalen Durchblutung im Splanchnikusgebiet während der Reperfusion? Wie wirkt sich die Therapie mit B $\beta$ <sub>15-42</sub> zur Reperfusion auf die Oxygenierung des Darms und der Leber aus?

**Material und Methoden:** 15 männliche deutsche Hausschweine (Gewicht ~30 kg) wurden in Allgemeinanästhesie intubiert, druckkontrolliert beatmet und instrumentiert. In die Vena jugularis interna dextra wurden ein zentralvenöser Katheter und ein Pulmonalarterienkatheter platziert. Die linke Arteria femoralis wurde mit einem PiCCO-Katheter zur Messung von Herz-Zeit-Volumen, intrathorakalem Blutvolumen und extravaskulärem Lungenwasser kanüliert. Die rechte Arteria femoralis wurde mit einer großlumigen Schleuse zur schnellen Blutentnahme kanüliert. Die Tiere wurden median laparotomiert. Ultraschallflussmessköpfe wurden um die großen Gefäße des Splanchnikusgebietes (Arteria mesenterica cranialis (=superior), Arteria hepatica und Vena portae) gelegt, um die regionale Durchblutung zu messen. Zusätzlich wurden Katheter in venös drainierende Gefäße der Splanchnikusorgane gelegt (Vena mesenterica inferior, Vena portae und Vena hepatica), um die regionale Sauerstoffbilanz (O<sub>2</sub>-Angebot/O<sub>2</sub>-Verbrauch) zu erfassen. Anschließend wurde unter aufrechterhaltener Narkose ein akuter hämorrhagischer Schock durch kontrolliertes Ausbluten bis auf einen mittleren arteriellen Blutdruck von 40 mmHg über 1 h induziert. Nach einer Stunde wurden die Tiere mit dem entnommenen, in Citrat-Phosphat-Dextrose konservierten Blut und kristalloider Lösung entsprechend des Vorlastparameters „intrathorakaler Blutvolumenindex“ (ITBVI) volumentherapiert und für insgesamt 5 h unter Konstanzhaltung des ITBVI nachbeobachtet.

Die Therapiegruppe (B $\beta$ <sub>15-42</sub>, n=8) erhielt das Peptid B $\beta$ <sub>15-42</sub> in einer Dosierung von 2,4 mg\*kg<sup>-1</sup> Körpergewicht direkt zu Beginn der Reperfusion sowie nach 150 min als i.v.-Bolus.

Die Kontrollgruppe (n=7) erhielt zu den gleichen Zeitpunkten jeweils einen i.v.-Bolus identischen Volumens der Trägerlösung (*phosphate-buffered solution*; PBS). Zum Ausgangszeitpunkt, nach 1 h Schock sowie nach 1, 3 und 5 h Reperfusion erfolgten Messungen der hämodynamischen Parameter und der Sauerstoffbilanz. Außerdem wurden Blutproben zur Bestimmung von kardialem Troponin-T (TnT) und Interleukin-6 (IL-6) sowie Blutgasanalysen aus verschiedenen Gefäßregionen (A. femoralis, A. pulmonalis, V. hepatica, V. mesenterica inferior und V. portae) entnommen. Nicht zuletzt wurde die Gewebeoberflächenoxygenierung (tpO<sub>2</sub>) von Leber und Dünndarm (Serosa und Mukosa) gemessen. Nach 5 h Reperfusion wurden die Tiere durch eine Kaliumchloridinfusion getötet, und es wurde Gewebe für histologische Untersuchungen entnommen.

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte±Standardabweichung dargestellt. Der statistische Vergleich der Gruppen erfolgte bei Normalverteilung mittels ANOVA (analysis of variance) gefolgt von einer Bonferroni post-hoc-Analyse. Bei nicht nachgewiesener Normalverteilung (Leukozyteninfiltration im Gewebe und Myeloperoxidasenachweis im Gewebe) erfolgte der Vergleich mittels Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben. p<0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen und mittels „#“ gekennzeichnet.

**Ergebnisse:** Nach 5 h Reperfusion hatten die Tiere der Kontrollgruppe im Vergleich zu den B $\beta$ <sub>15-42</sub>-behandelten Tieren eine akute Lungenschädigung mit einer paO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>-Ratio (Horowitz-Index: 260 mmHg<sup>#</sup> vs. 400 mmHg) im Sinne eines *acute lung injury* (ALI) bei gleichzeitig erhöhtem extravaskulärem Lungenwasser-Index (EVLWI: 9,0±0,5<sup>#</sup> vs. 5,2±0,6 ml\*kg<sup>-1</sup>). Das Herz zeigte funktionell und laborchemisch eine in der Therapiegruppe nicht nachweisbare Schädigung (Herzindex: 4,3±0,1<sup>#</sup> vs. 6,3±0,3 l\*min<sup>-1</sup>\*m<sup>2</sup>\*<sup>-1</sup>; Schlagvolumenindex: 30±1<sup>#</sup> vs. 51±1 ml\*m<sup>2</sup>\*<sup>-1</sup>; TnT: 0,58±0,15<sup>#</sup> vs. 0,11±0,03 ng\*ml<sup>-1</sup>). Die Gewebeoberflächenoxygenierung der Kontrolltiere war im Vergleich zu den B $\beta$ <sub>15-42</sub>-behandelten Tieren stärker beeinträchtigt (tpO<sub>2</sub>: Leber 51±2<sup>#</sup> vs. 65±2; Dünndarmserosa: 42±2<sup>#</sup> vs. 55±3, Dünndarmmukosa: 14±2<sup>#</sup> vs. 26±2 mmHg). Die Therapie mit B $\beta$ <sub>15-42</sub> reduzierte die Leukozytenakkumulation in Myokard, Lunge, Leber und Dünndarm. Des Weiteren war die IL-6-Freisetzung bei den Kontrolltieren höher als bei den B $\beta$ <sub>15-42</sub>-behandelten Tieren (131±35<sup>#</sup> vs. 24±9 pg\*ml<sup>-1</sup>). Unterschiede in der regionalen Durchblutung und dem Sauerstoffangebot oder -verbrauch wurden nicht beobachtet.

**Schlussfolgerung:** B $\beta$ <sub>15-42</sub> reduziert den Reperfusionsschaden nach hämorrhagischem Schock und Volumentherapie in Herz, Lunge, Leber und Darm am akut instrumentierten Hausschwein. Eine reduzierte Leukozyteneinwanderung in die geschädigten Gewebe sowie eine geringere IL-6-Freisetzung können eine Erklärung hierfür sein.

#### **4. Genaue und kontinuierliche Messung des Sauerstoffdefizits während eines hämorrhagischen Schocks. Akutversuche an instrumentierten deutschen Hausschweinen.**

*Roesner JP, Koch A, Bateman R, Scheeren TW, Zander R, Nöldge-Schomburg GFE, Zacharowski K. Accurate and continuous measurement of oxygen deficit during haemorrhage in pigs. Resuscitation 2009;80:259-263*

**Problemstellung:** In der Literatur werden drei klassische Modelle des traumatisch-hämorrhagischen Schocks beschrieben (30):

- 1) unkontrollierte Blutung (*uncontrolled-hemorrhage*-Modell)
- 2) Blutentzug eines zuvor festgelegten Hämorrhagievolumens über einen festgelegten Zeitraum (*fixed-volume*-Modell)
- 3) Blutentzug bis zu einem bestimmten mittleren arteriellen Blutdruck (bzw. Herzzeitvolumenindex), der für einen zuvor festgelegten Zeitraum beibehalten wird (*fixed-pressure*-Modell).

Dabei muss jedoch beachtet werden, dass die Zielgrößen eines Schocks wie Blutdruck oder Herzfrequenz das Ausmaß der zellulären Schädigung nur unzureichend widerspiegeln, da diese hämodynamischen Variablen von physiologischen Kompensationsmechanismen beeinflusst werden (31).

Aufgrund des aktuellen pathophysiologischen Kenntnisstandes des hämorrhagischen Schocks sowie unter Berücksichtigung bestehender Definitionen durch das *American College of Surgeons* (32), die explizit auf die Bedeutung der inadäquaten Organperfusion und Gewebeoxygenierung hinweisen, bedarf es eines verbesserten Schockmodells. Dies sollte perfusionsbezogene Parameter wie Sauerstoffdefizit, Basenüberschuss und Laktat erfassen bzw. diesbezüglich standardisiert sein. In der vorliegenden Untersuchung versuchten wir, ein solches Modell zu etablieren. Ziel war es, ein kumulatives Sauerstoffdefizit über einen definierten Zeitraum zu erreichen. Die Versuche basierten auf den Vorarbeiten von Rixen et al. (33), wobei in der vorliegenden Untersuchung insbesondere durch Verbesserung der Methoden (Verwendung eines kalorimetrischen Monitors: Deltatrac TM II) auf Praktikabilität und Reproduzierbarkeit fokussiert wurde.

**Material und Methoden:** Deutsche Hausschweine (n=22, Gewicht ~30 kg) wurden anästhesiert, intubiert und druckkontrolliert beatmet. In der rechten Vena jugularis wurde ein zentralvenöser Katheter und in der rechten Arteria femoralis wurde ein PiCCO-Katheter platziert. Die linke Arteria femoralis wurde mit einer großlumigen Schleuse zur raschen Blutentnahme kanüliert. Mit Hilfe des kalorimetrischen Monitors Deltatrac TM II,

MBM-200<sup>®</sup> (Datex-Ohmeda, Helsinki, Finnland) wurde bei jedem Tier nicht-invasiv und kontinuierlich der Sauerstoffverbrauch ( $\text{VO}_2$ ) in Ruhe unter Vollnarkose (Ausgangs- $\text{VO}_2$ ) ermittelt. Im Rahmen der Induktion des hämorrhagischen Schocks fiel der  $\text{VO}_2$  ab. Minütlich konnte durch Subtraktion des aktuellen  $\text{VO}_2$  vom Ausgangs- $\text{VO}_2$  bezogen auf das Körpergewicht das Sauerstoffdefizit in  $\text{ml}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  ermittelt werden. Der hämorrhagische Schock wurde durch Blutentzug bzw. Retransfusion so gesteuert, dass ein Sauerstoffdefizit von 1,5 bis 2  $\text{ml}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  erzeugt wurde. Die innerhalb einer Stunde minütlich gemessenen Sauerstoffdefizite wurden zu einem kumulativen Sauerstoffdefizit addiert. Entsprechend der Vorarbeiten von Rixen et al. wurde als Ziel ein kumulatives Sauerstoffdefizit von ca. 100  $\text{ml}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  (Bereich 95-115  $\text{ml}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ) angestrebt.

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe einer Varianzanalyse (One-Way-ANOVA) gefolgt von einem Bonferroni post-hoc-Test. Die Daten sind als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung dargestellt.  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen und mittels „#“ gekennzeichnet.

**Ergebnisse:** Nur die Daten der Tiere wurden ausgewertet, die ein kumulatives Sauerstoffdefizit von 95-115  $\text{ml}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  erreichten und den hämorrhagischen Schock überlebten. Insgesamt erreichten 3 Tiere diese Studieneinschlusskriterien nicht. Zwei weitere Tiere verstarben während des hämorrhagischen Schocks, so dass 17 Tiere bei der Auswertung berücksichtigt werden konnten.

Das erreichte Sauerstoffdefizit lag bei  $106 \pm 3 \text{ ml}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  und wurde durch einen Blutverlust von ca. 60% (durchschnittlich  $47 \pm 6 \text{ ml}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) des zirkulierenden Blutvolumens erreicht (34). Die Streuung der entnommenen Blutvolumina innerhalb der Gruppe von 17 Tieren war groß (Minimum: 37, Maximum 61  $\text{ml}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). Der mittlere arterielle Blutdruck sank von  $83 \pm 10 \text{ mmHg}$  vor Blutentnahme auf  $22 \pm 7 \text{ mmHg}$  in der Schockphase (Minimum: 12, Maximum: 38 mmHg). Die Herzfrequenz stieg kompensatorisch von  $83 \pm 7$  auf  $147 \pm 37 \text{ min}^{-1}$  an (Minimum: 96, Maximum: 205  $\text{min}^{-1}$ ). Der Herzzeitvolumenindex fiel von  $5,0 \pm 0,5$  auf  $1,3 \pm 0,4 \text{ l}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{m}^2\cdot\text{kg}^{-1}$  (Minimum: 0,8, Maximum: 2,0  $\text{l}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{m}^2\cdot\text{kg}^{-1}$ ). Die gemischt-venöse Sauerstoffsättigung fiel von 63 auf 12% (Minimum: 7, Maximum: 32%). Die Plasmalaktat Spiegel stiegen von  $1,5 \pm 0,4$  auf  $13,3 \pm 2,4 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  an (Minimum: 10,2, Maximum: 15,5  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ).

Die Auswertung ergab, dass keine Korrelation zwischen der entnommenen Blutmenge und hämodynamischen Parametern wie Herzfrequenz (HF;  $r=0,3872$ ;  $p=0,1540$ ), mittlerer arterieller Blutdruck (MAP;  $r=0,3901$ ;  $p=0,1505$ ), Herzzeitvolumenindex (CI;  $r=0,2101$ ;  $p=0,4523$ ) und gemischt-venöse Sauerstoffsättigung ( $\text{svO}_2$ ;  $r=0,0944$ ;  $p=0,7379$ )

bestand. Das kumulative Sauerstoffdefizit korrelierte signifikant mit den zuvor genannten Parametern: HF ( $r=0,7175$ ;  $p=0,0026$ ), MAP ( $r=0,5039$ ;  $p=0,0556$ ), CI ( $r=0,6260$ ;  $p=0,0125$ ) und  $svO_2$  ( $r=0,7084$ ;  $p=0,0031$ ).

**Schlussfolgerung:** In der vorliegenden Arbeit wurde ein valides Modell zur Untersuchung des hämorrhagischen Schocks am deutschen Hausschwein etabliert. Das Ergebnis ist ein Großtiermodell zum hämorrhagischen Schock, in dem die Schwere des Schocks durch das kumulative Sauerstoffdefizit definiert wird. Dieses Modell ist gut standardisierbar, mit einfachen Mitteln durchführbar und ermöglicht einen direkten Vergleich von Ergebnissen unterschiedlicher Arbeitsgruppen anhand des Schweregrads des experimentell erzeugten hämorrhagischen Schocks.

## **5. Eine doppelblinde und monozentrische Studie zu Auswirkungen von FX06 nach hämorrhagischem Schock und Reperfusion mittels Volumentherapie - subchronische Versuche an instrumentierten deutschen Hausschweinen.**

*Roesner JP, Petzelbauer P, Koch A, Tran N, Iber T, Mutz C, Vollmar B, Nöldge-Schomburg GE, Zacharowski K. A double blind, single centre, sub-chronic reperfusion trial evaluating FX06 following haemorrhagic shock in pigs. Resuscitation 2009;80:264-271*

**Fragstellung:** Sind die im Akutversuch nachgewiesenen protektiven Effekte von B $\beta$ <sub>15-42</sub> (FX06) nach hämorrhagischem Schock und Reperfusion mittels Volumentherapie im Großtiermodell auch mittelfristig über einen Zeitraum von 72 h nachweisbar? Hat die Therapie mit B $\beta$ <sub>15-42</sub> einen protektiven Einfluss auf die zerebrale Schädigung und die zerebrale Funktion? Ist die Translokation von Bakterien bzw. Endotoxin eine Folge der Minderperfusion des Darmes und wird sie durch B $\beta$ <sub>15-42</sub> (FX06) beeinflusst?

**Material und Methoden:** Männliche deutsche Hausschweine (n=19, Gewicht ~30 kg) wurden anästhesiert, intubiert und druckkontrolliert beatmet. In der rechten Vena jugularis wurde ein zentralvenöser Katheter und in der rechten Arteria femoralis wurde ein PiCCO-Katheter platziert. Die linke Arteria femoralis wurde mit einer großlumigen Schleuse zur raschen Blutentnahme kanüliert. Mit Hilfe des kalorimetrischen Monitors Deltatrac TM II, MBM-200<sup>®</sup> (Datex-Ohmeda, Helsinki, Finnland) wurde bei jedem Tier nicht-invasiv und kontinuierlich der Sauerstoffverbrauch (VO<sub>2</sub>) in Ruhe unter Vollnarkose (Ausgangs-VO<sub>2</sub>) ermittelt. Im Rahmen der Induktion des hämorrhagischen Schocks fiel der VO<sub>2</sub> ab. Minütlich konnte durch Subtraktion des aktuellen VO<sub>2</sub> vom Ausgangs-VO<sub>2</sub> bezogen auf das Körpergewicht das Sauerstoffdefizit in ml\*kg<sup>-1</sup>\*min<sup>-1</sup> ermittelt werden. Entsprechend unserer Vorarbeiten (35) wurde als Ziel ein kumulatives Sauerstoffdefizit von ca. 100 ml\*kg<sup>-1</sup>\*h<sup>-1</sup> (Bereich 95-115 ml\*kg<sup>-1</sup>\*h<sup>-1</sup>) angestrebt. Nach einer Stunde erfolgte die Reperfusion mittels Volumentherapie mit dem zuvor entnommenen und in Citrat-Phosphat-Dextrose-konservierten Blut und kristalloider Lösung entsprechend des kardialen Vorlastparameters ITBVI (intrathorakaler Blutvolumenindex). Die Therapiegruppe (FX06, n=8) erhielt mit Beginn der Reperfusion einen i.v.-Bolus FX06 von 3 mg\*kg<sup>-1</sup>. Anschließend folgte eine kontinuierliche Infusion von FX06 mit 0,3 mg\*kg<sup>-1</sup>\*min<sup>-1</sup> für eine Stunde. Die Kontrollgruppe (n=9) erhielt die identischen Volumina an Trägerlösung (PBS; *phosphate buffered solution*) zu den gleichen Zeitpunkten. Nach einer Stunde wurden bei stabilisierter Hämodynamik alle Katheter bis auf den zentralen Venenkatheter entfernt, die Präparationsstellen chirurgisch verschlossen und die Tiere vom Respirator entwöhnt. Die Tiere wurden für 72 h im Tierhaus der Allgemeinen Tierhaltung des Instituts für

Experimentelle Chirurgie intensiv nachbeobachtet. Messzeitpunkte waren neben dem Ausgangswert nach 1 h Schock sowie nach 1, 24, 48 und 72 h Reperfusion. Blutproben wurden zu den jeweiligen Zeitpunkten zur Bestimmung der folgenden Parameter entnommen: kleines Blutbild, zentralvenöse Blutgasanalyse, Kreatinkinase (CK), Laktatdehydrogenase (LDH), Aspartataminotransferase (AST), Alaninaminotransferase (ALT), Glutamatdehydrogenase (GLDH), Troponin-T (TnT), Kreatinin (Crea), Harnstoff (BUN), Lipase, Amylase, Laktat, neuronenspezifisches Protein S-100B, Tumor-Nekrosefaktor-alpha (TNF $\alpha$ ), Interleukin-1 $\beta$ , Interleukin-2, Interleukin-6 und Endotoxin. Die Quantifizierung der neurologischen Funktion der Tiere erfolgte mit Hilfe einer neurologischen Bewertungsskala (*neurological deficit score for pigs*; 0 Punkte = gesund, 400 Punkte = hirntot) nach Prof. Sipos von der Veterinärmedizinischen Universität Wien.

Zum letzten Messzeitpunkt (72h) wurden die Tiere erneut anästhesiert und mit einem PICCO-Katheter versorgt. Umfangreiche invasive hämodynamische Messungen wurden vorgenommen. Nach Beendigung der Messungen wurden die Tiere in tiefer Allgemeinanästhesie mit einer Kaliumchloridinfusion getötet. Gewebe und Blutproben für weitere Untersuchungen wurden entnommen.

Die statistische Auswertung erfolgte mit einer Varianzanalyse (One-Way-ANOVA) gefolgt von einem Bonferroni post-hoc-Test. Die Daten sind als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung dargestellt.  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen und mittels „#“ gekennzeichnet.

**Ergebnisse:** Zwei Tiere der Kontrollgruppe verstarben in der Frühphase der Reperfusion (<3 h). Damit lag die Mortalität in der Kontrollgruppe bei 22%. In der FX06-Gruppe überlebten alle Tiere die 72-stündige Beobachtungszeit. Die mit FX06 behandelten Tiere zeigten nach 72 h eine bessere Herzfunktion (Schlagvolumenindex: 67<sup>#</sup> vs. 33 ml\*m<sup>2</sup>\*<sup>-1</sup>) bei niedrigerer TnT-Freisetzung in der Frühphase der Reperfusion (0,24<sup>#</sup> vs. 0,78 ng\*ml<sup>-1</sup>). Außerdem waren die Surrogatparameter für eine Leberschädigung (Aspartataminotransferase nach 24 h Reperfusion: 106<sup>#</sup> vs. 189 U\*l<sup>-1</sup>; Glutamatdehydrogenase nach 48 h: 3,5<sup>#</sup> vs. 11,5 U\*l<sup>-1</sup>) und einer eingeschränkten Nierenfunktion (Serumkreatinin nach 72 h: 87<sup>#</sup> vs. 140  $\mu$ mol\*l<sup>-1</sup>) geringer. Auch die Lungenfunktion (Horovitz-Index, paO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>: 429<sup>#</sup> vs. 340 mmHg) war nach 72 h signifikant besser.

Bei den Kontrolltieren konnten hohe Plasmaendotoxinspiegel als Zeichen einer bakteriellen Translokation nachgewiesen werden. Diese war bei den FX06-behandelten Tieren nicht zu beobachten (24,3<sup>#</sup> vs. 0,2 U\*l<sup>-1</sup>). Analog dazu war bei den Kontrolltieren die Leukozytenzahl im peripheren Blut deutlich höher (25,4 $\pm$ 4,1<sup>#</sup> vs. 18,5 $\pm$ 3,7 \*nl<sup>-1</sup>). Die

Plasmakonzentrationen der proinflammatorischen Zytokine (Interleukin-1 $\beta$ , -2 und -6) stiegen während des Untersuchungszeitraums signifikant an, während sie in der FX06-Gruppe wieder rückläufig waren.

Nach 24 h wiesen die Tiere der Kontrollgruppe auf der neurologischen Bewertungsskala einen Wert von 70 Punkten auf. Demgegenüber erreichten die Tiere aus der FX06-Gruppe einen Wert von 20<sup>#</sup> Punkten. Objektiviert wurde diese Beurteilung durch Messungen des S-100B, eines im Plasma nachweisbaren Markers einer Schädigung von Gliazellen. Dieser Marker war nach 48 h in der FX06-Gruppe etwa halb so hoch wie bei den Kontrolltieren (mit 0,72<sup>#</sup> vs. 1,25  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ).

**Schlussfolgerung:** Die Therapie mit FX06 während des hämorrhagischen Schocks und vor der Reperfusion mittels Volumentherapie wirkte sich protektiv auf Herz, Lunge, Leber, Dünndarm, Niere und Gehirn aus. Dieser Effekt konnte über einen Zeitraum von 72 h beobachtet werden.



#### 4. Diskussion:

Die Aktivierung multipler inflammatorischer Prozesse bei der Reperfusion von ischämischem Gewebe verläuft rasch und parallel (21,36,37,38). Versuche, diese Prozesse gezielt inhibitorisch positiv zu beeinflussen, ob durch Antioxidantien (39), Reduktion der intrazellulären Calciumüberladung (40), Antikörper gegen Adhäsionsmoleküle wie P-selectin (41), Antikörper gegen Oberflächenmarker von Leukozyten wie CD11 und CD 18 (42) oder Antikörper gegen C5-Komplement (43) schlugen bei klinischer Erprobung fehl (44,45).

Es erschien deshalb sinnvoll, gezielt die gemeinsame Endstrecke der schädigenden Entzündungsprozesse, die Transmigration von Leukozyten über das Endothel aus den Gefäßen in das ischämische Gewebe, zu verhindern (46). Beide in dieser Arbeit untersuchten Substanztypen hemmen als Teil ihres Wirkungsprofils die Transmigration von Leukozyten in vorgeschädigtes Gewebe. Die PARP-Inhibitoren beeinflussen den Transkriptionsfaktor *nuclear-factor-kappa-B* (NF-κB), wohingegen das vom Fibrin abstammende Peptid Bβ<sub>15-42</sub> direkt mit dem Adhäsionsmolekül VE-Cadherin interagiert.

Allerdings muss dabei immer bedacht werden, dass Inflammation und Leukozyteneinwanderung auch sinnvolle und notwendige Prozesse sind. Ohne sie würden sich tote Zellen und Zellmaterial ansammeln und die Narbenbildung beispielsweise nach einem Myokardinfarkt behindern (47,48). Versuche, die Leukozyten bei kardiochirurgischen Hochrisikopatienten unter extrakorporaler Zirkulation künstlich zu depletieren, zeigten eher einen nachteiligen Effekt. Es wurden eine stärkere Leukozytenaktivierung und eine höhere Sterblichkeit beobachtet (49).

Man muss davon auszugehen, dass die Dauer der therapeutischen Maßnahmen eine wichtige Rolle spielt. Das in unseren Untersuchungen eingesetzte Peptid Bβ<sub>15-42</sub> hat mit ca. 15 Minuten eine kurze Halbwertszeit. Dies bedeutet, dass die Leukozyten nur in der Initialphase der Inflammation bei Reperfusion beeinflusst werden. Außerdem werden sie nicht direkt inhibiert oder alteriert, sondern lediglich ihre Auswanderung aus dem Gefäßsystem erschwert.

Bei der PARP-Inhibition gilt ähnliches. Die Inhibitoren wirken nur in den betroffenen Geweben, in denen auch die PARP aktiviert wird. Außerdem ist die Hemmung der PARP zeitlich begrenzt und reversibel, so dass physiologische Prozesse der Zelle, die durch die PARP gesteuert bzw. beeinflusst werden, im weiteren Verlauf wieder ablaufen können.

Die Aktivierung der Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) bei der energieverbrauchenden Reparatur von Reperfusion-induzierter oxidativer DNS-Schädigung ist unumstritten (50,51).

Dabei kann die Zelle jedoch durch Energiedepletion weiter geschädigt werden (s. Abbildung 2, S. 5). Diese könnte pharmakologisch verhindert werden. Hierbei ist der therapeutische Einsatz von modernen PARP-Inhibitoren attraktiv, da er innovativ und multimodal ist:

Innovativ sind die Spezifität und Wasserlöslichkeit der neueren Generation von Inhibitoren. Die älteren PARP-Inhibitoren [Nicotinamid und 3-Aminobenzamide (3-AB)] waren unspezifisch, da für therapeutische Effekte hohe Dosen notwendig waren. Andere PARP-Inhibitoren wie das 1,5-Dihydroxyisoquinolinon (1,5-DIQ) sind nicht wasserlöslich und werden in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. DMSO hat Radikalfängereigenschaften, vermittelt in höherer Dosierung jedoch toxische Effekte. Erst die neueste Generation von PARP-Inhibitoren, zu denen auch 5-Aminoisoquinolinon (5-AIQ, Isoquinolinon-Derivat), PJ-34 (Phenanthridion-Derivat) und INO-1001 (Isoindolinon-Derivat) gehören, sind sowohl sehr gut wasserlöslich als auch spezifisch für PARP. INO-1001 wird bereits in Phase-II-Studien bei Reperfusionzuständen und in der Krebstherapie eingesetzt (15).

Die Therapie des Reperfusionsschadens mit PARP-Inhibitoren ist multimodal. Zum einen werden die geschädigten Zellen selbst geschützt, indem durch die Hemmung der energieverbrauchenden DNS-Reparatur der Zelle ausreichend Energie für Stoffwechselprozesse wie die Proteinbiosynthese oder die Aufrechterhaltung der intrazellulären Calciumhomöostase zur Verfügung gestellt werden kann. Sollte die Zelle irreparabel geschädigt sein, kann in energieabhängigen Prozessen die Apoptose und damit der kontrollierte Zelltod erfolgen. Zum anderen ist PARP ein Co-Aktivatoren von NF- $\kappa$ B-abhängigen Transkriptionsprozessen und Transkriptionsfaktoren wie activator-protein-1 (AP-1). Als Folge einer PARP-Inhibition werden die Expression von proinflammatorischen Mediatoren wie Adhäsionsmolekülen (ICAM-1) und dadurch die Adhärenz und spätere Transmigration von Leukozyten in das geschädigte Gewebe reduziert.

Die PARP-Aktivierung beim hämorrhagischen Schock ist mehrfach untersucht und beschrieben worden (52,53). Zudem wurden protektive Effekte von PARP-Inhibitoren beim hämorrhagischen Schock gezeigt (54), wobei eine Reduktion von Surrogatparametern einer Schädigung wie beispielsweise Alaninaminotransferase, Aspartataminotransferase, Lipase und Kreatinkinase, jedoch keine Verbesserung einer Organfunktion nachgewiesen werden konnte. In unseren Untersuchungen an Ratten konnten wir zeigen, dass 5-AIQ die Leukozyten-Endothel-Interaktionen nach einem hämorrhagischen Schock protektiv beeinflusst (**Originalarbeit 1; 55**). Vergleichbare Ergebnisse wurden von Khandoga et al. bei Leberischämie und Reperfusion nach vaskulärem „Ausklemmen“ erzielt (56). In unserem Kleintiermodell nach hämorrhagischem Schock und Reperfusion mittels Volumentherapie

wirkte sich eine PARP-Inhibition positiv auf die Mikrozirkulation der Leber aus. Dies führte zu einer verbesserten nutritiven Perfusion und Energiebilanz und dadurch bedingt letztendlich zu einer verbesserten exkretorischen Organfunktion.

Unsere Untersuchung stellt eine für den klinischen Alltag relevante Situation dar, da der bereits präklinische Einsatz von PARP-Inhibitoren im hämorrhagischen Schock möglich und sinnvoll erscheint.

Nach kritischer Bewertung der eigenen Untersuchungen sowie der aktuellen Literatur erscheint der Einsatz von PARP-Inhibitoren beim systemischen Reperfusionsschaden wie dem hämorrhagischen Schock mit nachfolgender Reperfusion mittels Volumentherapie sinnvoll. Als weitere zukünftige Einsatzschwerpunkte könnten Reperfusionsgeschehen wie z.B. nach großer Aorten Chirurgie oder Herzoperationen mit extrakorporaler Zirkulation sein. Zu dieser Fragestellung wurde bereits eine Phase-II-Studie durchgeführt, deren Ergebnisse jedoch noch nicht publiziert wurden (*A Trial of INO-1001 in Patients Undergoing Heart Surgery That Involves Heart-Lung Bypass*; <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00271167?term=INO1001+heart+surgery&rank=1>, gelesen am 16.05.2009).

Ein weiterer großer Einsatzbereich für die modernen PARP-Inhibitoren wird vermutlich die Onkologie sein. Derzeit werden 24 Studien mit PARP-Inhibitoren als adjuvante Therapie durchgeführt (<http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=PARP+Inhibitor>; gelesen am 16.05.2009). PARP-Inhibitoren verstärken durch Hemmung der PARP-abhängigen DNS-Reparatur in schnell wachsenden Tumorzellen die Sensitivität gegenüber alkylierenden Substanzen, Topoisomerase-Inhibitoren und radioaktiver Strahlung (57,58).

In den letzten Jahren wurde die Rolle von Fibrin und Fibrinfragmenten bei Entzündungsreaktionen wiederholt untersucht. Es wurde nachgewiesen, dass Fibrin die Expression von Interleukin-1 $\beta$  (59), Interleukin-8 (60), ICAM-1 (61) sowie die Makrophagenadhäsion (62) erhöht. Außerdem wurde im Tierversuch in knock-out-Modellen gezeigt, dass inflammatorische Prozesse in Abwesenheit von Fibrin deutlich geringer ausgeprägt sind (24,63,64). Somit ist ein kausaler Zusammenhang zwischen Fibrin und Inflammation nachgewiesen. Einen Pathomechanismus, der den Zusammenhang zwischen Fibrinolyseprodukten und der Leukozytenmigration bzw. deren Hemmung durch das Fibrinopeptid B $\beta$ <sub>15-42</sub> erklärt, deckten Petzelbauer et al. 2005 auf. Daraus entwickelte sich der therapeutische Ansatz der Gabe von Fibrinopeptid B $\beta$ <sub>15-42</sub> (FX06).

Nachdem die myokardiale Protektion durch B $\beta$ <sub>15-42</sub> im Kleintiersversuch (Maus) nachgewiesen worden war (24,29), führten wir unsere Untersuchung am Großtiermodell mit gleicher

Fragestellung durch **(Originalarbeit 2; 65)**. Eine akute myokardiale Ischämie wurde für eine Stunde induziert, die ohne weitere Therapie nach 3 h Reperfusion zu einer Infarzierung von ca. einem Viertel des linken Ventrikels führte. Die Therapie mit  $\text{B}\beta_{15-42}$  reduzierte die Infarktgröße um die Hälfte und war damit genauso effektiv wie die ischämische Präkonditionierung als Goldstandard. Letztere gilt bisher als stärkster nachgewiesener endogener Protektionsmechanismus beim Reperfusionsschaden (66). Eine FX06-Therapie reduzierte die Infarktgröße und den myokardialen Schädigungsparameter Troponin-I signifikant.  $\text{B}\beta_{15-42}$  senkte zudem auch die IL-6-Freisetzung. IL-6 spielt bei myokardialer Schädigung nach Ischämie und Reperfusion eine wichtige Rolle (67) und ist auch an der Genese des Herzversagens beteiligt (68). Die Beeinflussung der Zytokinfreisetzung durch einen bisher unklaren Mechanismus, scheint ein weiterer protektiver Effekt von  $\text{B}\beta_{15-42}$  zu sein.

Die Ergebnisse aus den groß- und kleintierexperimentellen Studien und die gute Verträglichkeit in der Phase-I-Studie führten zur Durchführung einer europaweiten Multicenterstudie (F.I.R.E.-Trial, <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00326976?term=f.i.r.e.&rank=1>, gelesen am 16.05.2009) mit  $\text{B}\beta_{15-42}$  (FX06). In die Studie wurden 234 Patienten eingeschlossen, von denen 114 Patienten bei Penetration des Katheterdrahtes durch den Thrombus während der Herzkatheteruntersuchung (PCI) sowie 10 Minuten danach 400 mg FX06 i.v. erhielten, während 120 Kontrollpatienten ein Plazebo erhielten. Nach 5 Tagen konnte mittels nuklearmedizinischer Bildgebung eine Reduktion der myokardialen Nekrosezone um 58% nach Gabe von FX06 nachgewiesen werden. Nach 4 Monaten war keine Reduktion der Infarkt Narbe mehr zu beobachten. Ein Überlebensvorteil wurde - bei der kleinen Anzahl an Patienten erwartungsgemäß - nicht beobachtet (69).

Im hämorrhagischen Schock wirkte  $\text{B}\beta_{15-42}$  protektiv an wichtigen untersuchten Organen (Herz, Lunge, Leber, Niere, Darm und Gehirn) **(Originalarbeiten 3 und 5; 79,86)**. Bei den Kontrolltieren waren die kardiale Funktion, gemessen an Schlagvolumen und Herzzeitvolumen eingeschränkt, und der Plasma-TnT-Spiegel deutlich erhöht. In der  $\text{B}\beta_{15-42}$ -Gruppe waren die kardiale Funktion besser und die TnT-Freisetzung geringer. Eine Hypovolämie, die eine Beeinträchtigung der kardialen Funktion verursachen könnte, war bei normwertigem intrathorakalem Blutvolumen in beiden Gruppen ausgeschlossen. Eine eingeschränkte linksventrikuläre Funktion nach Ischämie und Reperfusion geht mit einem Anstieg der Zahl eingewanderter Leukozyten (24) und erhöhten Plasmaspiegeln von IL-6 (70) einher. Beide Parameter wurden durch die Therapie mit  $\text{B}\beta_{15-42}$  signifikant positiv beeinflusst.

Die Kontrolltiere im Akutversuch (5h Reperfusion) entwickelten schwere Oxygenierungsstörungen, die nicht auf ein kardiales Versagen oder eine Hypervolämie zurückzuführen waren. Der  $paO_2/FiO_2$ -Quotient entsprach einem akuten Lungenversagen. Auffällig waren ein erhöhter extravaskulärer Lungenwasserindex (EVLWI) und ein hoher pulmonaler Gefäßwiderstand bei normwertigem intrathorakalem Blutvolumen und ausreichendem Herzzeitvolumen. Entsprechend der Ergebnisse anderer Autoren korreliert der EVLWI gut mit der Schwere des Lungenversagens, der Beatmungsdauer und der Sterblichkeit (71,72). Die Lungenfunktionsschädigung geht mit einem Anstieg der Leukozytenzahl im Lungengewebe (73) und erhöhten Plasmaspiegeln von IL-1 $\beta$  und IL-6 (74,75) einher. Bei Reperfusionen sammeln sich Leukozyten rasch in der Lunge an, wo sie direkt und indirekt an der Zytokinfreisetzung beteiligt sind. Intratracheale Instillation von IL-6 löst die Einwanderung von neutrophilen Granulozyten in die Alveolen und das Lungeninterstitium aus (76). IL-6 defiziente Mäuse wiederum zeigen keine Leukozyteneinwanderung in Alveolen und Interstitium nach hämorrhagischem Schock (77).  $B\beta_{15-42}$  hatte keinen Einfluss auf die Makrozirkulation im Systemkreislauf und in der Splanchnikusregion. Die Durchblutung von Leber und Darm war gegenüber unbehandelten Tieren unverändert. Auch Sauerstoffangebot ( $DO_2$ ) und -verbrauch ( $VO_2$ ) waren zu allen Messzeitpunkten zwischen den Gruppen vergleichbar. Die Gewebeoxygenierung von Leber und Dünndarm, insbesondere der Mukosa, war bei den Kontrolltieren jedoch deutlich eingeschränkt. Dies zeigt einmal mehr, dass Makrozirkulation und Mikrozirkulation nach hämorrhagischem Schock und Reperfusion nicht korrelieren und eine intakte Makrozirkulation keine Aussage über die Gewebeoxygenierung auf mikrozirkulatorischer Ebene ermöglicht (78). Die von uns beobachtete Differenz der Leberoberflächenoxygenierung erscheint nominell nicht sehr ausgeprägt (**Originalarbeit 3; 79**), spiegelt jedoch eine gravierende Veränderung wider: Die Kapsel der Schweineleber ist von einem gut arterialisierten Netz umgeben (80), so dass die Leberoberflächenoxygenierung bei physiologischen  $paO_2$ -Werten nur bei ausgeprägten Veränderungen der Gewebeoxygenierung abfällt. Dies korreliert mit den Resultaten unserer Untersuchungen an Ratten (**Originalarbeit 1; 55**), bei denen ebenfalls eine Gewebehypoxie in der Leber nach hämorrhagischem Schock und Volumentherapie nachweisbar war.  $B\beta_{15-42}$  verbesserte die Gewebeoxygenierung in Leber und Darm an instrumentierten Schweinen nach hämorrhagischem Schock und Volumentherapie (**Originalarbeit 3; 79**). Dies ist wahrscheinlich auf eine Verbesserung der nutritiven Perfusion (81,82,83) aufgrund einer reduzierten Leukozyteneinwanderung ins Gewebe und einer geringeren Freisetzung inflammatorischer Zytokine zurückzuführen. Die Reduktion der

Leukozyteninfiltration in geschädigtes Gewebe konnte in jeder Untersuchungsreihe mittels Auszählung der Leukozyten in histologischen Schnitten oder durch Bestimmung der Myeloperoxidase in kryokonservierten Geweben nachgewiesen werden.

Bei den  $B\beta_{15-42}$ -behandelten Tieren wurden niedrigere IL-1 $\beta$ -, IL-2- und IL-6-Spiegel nach hämorrhagischem Schock und Volumentherapie gemessen. IL-6 wird auch beim hämorrhagischen Schock als wichtiger Mediator angesehen, der für die Dysfunktion von Leber, Lunge (84) und Dünndarm (85) mitverantwortlich gemacht wird (**Originalarbeit 3 und 5; 79,86**).

Beeindruckend waren der Nachweis einer schweren Sauerstoffminderversorgung der Dünndarmmukosa im hämorrhagischen Schock sowie die geringe Erholungstendenz in den nachfolgenden 5 h im akuten Modell. Im subchronischen Modell (**Originalarbeit 5; 86**) waren als Folge der schwer geschädigten Mukosabarriere des Dünndarms nach 24 h hohe Endotoxinspiegel im Blut nachweisbar (87).

In der gleichen Studie wurde auch eine Beeinträchtigung der zerebralen Funktion nach hämorrhagischem Schock und Reperfusion nachgewiesen. Dies verdeutlicht nochmals, dass bei diesem Modell ein Ischämie-Reperfusionsgeschehen untersucht wurde, das den gesamten Organismus betrifft. Objektiviert wurde dies durch einen Anstieg des glialen Schädigungsmarkers S-100B im Blut. Der Anstieg beider Parameter der zerebralen Schädigung wurde durch  $B\beta_{15-42}$  signifikant reduziert.

Langfristige Auswirkungen über einen Zeitraum von 72h hinaus müssen noch untersucht werden.

Mittlerweile ist ein weiterer protektiver Mechanismus von  $B\beta_{15-42}$  nachgewiesen worden:  $B\beta_{15-42}$  stabilisiert die Endothelbarriere bzw. reduziert das *capillary leak* bei inflammatorischen Prozessen (88). Ein *capillary leak* ist definiert als ein Zusammenbruch der Endothelbarriere, so dass es zu einem Verlust von Flüssigkeit und Plasmaproteinen in den extravaskulären Raum kommt. Dieses Phänomen ist charakteristisch für inflammatorische Prozesse, insbesondere für die schwere Sepsis.

In Endothelzellen verhindert  $B\beta_{15-42}$  die Bildung von sogenannten Stressfasern (*stress fibers*) und die Aktivierung von RhoA (*Ras homolog gene family, member A*). Dadurch werden eine Zellkontraktion und die damit verbundene Störung der Endothelbarriere verhindert (89). Der Mechanismus wurde anhand von drei Tiermodellen (Denguefieber im Mäusemodell, Lipopolysaccharid-Schock im Rattenmodell und Lipopolysaccharid-Pneumonitis im Mäusemodell) mit nachgewiesenem *capillary leak* untersucht. In allen Modellen konnte eine Stabilisierung der Endothelbarriere nachgewiesen werden (88).

Dieser Mechanismus erklärt auch die in unseren Untersuchungen zum hämorrhagischen Schock beobachtete verbesserte Gewebeoxygenierung von Leber und Darm im akuten Modell sowie die Verbesserung des Horovitz-Index und die Verringerung des extravaskulären Lungenwassers im akuten und subchronischen hämorrhagischen Schockmodell durch B $\beta$ <sub>15-42</sub> **(Originalarbeit 3 und 5; 79,86)**.

## **5. Zusammenfassung/ Ausblick:**

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei innovative Therapieansätze des Reperfusionsschadens nach Ischämie vorgestellt. Zum einen handelt es sich um einen Inhibitor der Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (5-Aminoisoquinolinon, 5-AIQ), eines in allen eukaryotischen Zellen vorkommenden und bei DNS-Schädigung aktivierten Wächterenzym, zum anderen um ein körpereigenes Fibrinopeptid ( $B\beta_{15-42}$ ). Beide Substanzen reduzierten direkt bzw. indirekt die Leukozyteneinwanderung in geschädigtes Gewebe.

Die Ergebnisse der Tierversuche dieser Arbeit zeigten eine Reduktion des Reperfusionsschadens durch PARP-Inhibition und  $B\beta_{15-42}$  sowohl bei Einzelorganischämie wie dem Myokardinfarkt als auch bei Vorgängen, die den gesamten Organismus betreffen wie dem hämorrhagischen Schock (Ischämie aller Organe und Gewebe).

Beide Substanztypen zeichneten sich durch weitere protektive Wirkmechanismen aus, die zum jetzigen Zeitpunkt teils noch ungeklärt sind. Deren Erforschung in weiteren Untersuchungen voranzutreiben, wird eine große und interessante Aufgabe für die Zukunft sein. Aktuell werden beide Substanzen in Phase-I- und -II-Studien eingesetzt. Von ihrem perspektivischen Nutzen bei der klinischen Anwendung im Betätigungsfeld der Anästhesie, Notfallmedizin und Intensivtherapie beispielsweise bei hämorrhagischem Schock, Sepsis, ARDS und extrakorporaler Zirkulation in der näheren Zukunft kann man aufgrund der dargelegten Ergebnisse aus den Tierexperimenten überzeugt sein.



**Selbständigkeitserklärung:**

Hiermit erkläre ich, diese Arbeit selbständig angefertigt, alle verwendeten Ergebnisse und Daten anderer vollständig angegeben und korrekt zitiert sowie jedwede weitere Mitwirkung Dritter offengelegt zu haben.

Rostock, den 22.06.2009

Dr. med. Jan P. Roesner

## **Danksagung:**

Die vorliegende Arbeit wurde durch die aktive Unterstützung zahlreicher Menschen, akademischer Lehrer, Kolleginnen, Kollegen und Freunde ermöglicht, denen an dieser Stelle herzlich gedankt sei. Und ich danke denjenigen, die mir im klinischen Alltag durch Mehrarbeit bzw. Kompensation meiner Abwesenheit ermöglichten, mich mit meiner wissenschaftlichen Arbeit zu befassen.

Mein besonderer Dank gilt:

- Frau Prof. Dr. med. Gabriele F.E. Nöldge-Schomburg, Direktorin der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock. Dank ihres Vertrauens, ihrer Anregungen zum wissenschaftlichen Arbeiten, ihrer Motivation, das Projekt voranzutreiben, der Schaffung von Freiräumen im klinischen Alltag und der Bereitstellung der finanziellen Mittel konnte die vorliegende Arbeit entstehen und zu Ende gebracht werden.

- Herrn Prof. Dr. Dr. med. Kai Zacharowski, FRCA, Direktor der Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main, für das Vertrauen in meine Arbeit und die sich daraus entwickelnde interessante und fruchtbare Kooperation. Prof. Zacharowski lehrte mich, „über den Tellerrand hinauszuschauen“ und meine Methoden und experimentellen Modelle zu verfeinern. Des Weiteren ermöglichte er mir den Zugang zu neuen anti-inflammatorischen Substanzen, die ich in den zuvor beschriebenen Tierversuchen einsetzen und auf ihre anti-inflammatorischen Potentiale untersuchen konnte.

- Herrn PD Dr. med. Dierk Vagts, Herrn PD Dr. med. Thomas Iber und Herrn Dr. med. Mutz für die Einarbeitung in das bewährte Großtiermodell des akut instrumentierten Hausschweins. Ich erinnere mich gerne an die schöne und erfolgreiche Zusammenarbeit der ursprünglichen AG Splanchnikus. Insbesondere gilt mein Dank Herrn PD Thomas Iber, der mich auf die Protektion durch PARP-Inhibition aufmerksam machte und mir damit Gelegenheit gab, mich mit eigenen Ideen zu verselbständigen.

Auch gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. Thomas Scheeren, der mir mit guten Ideen und technischem Equipment zur Seite stand.

- Frau Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar, Direktorin des Instituts für Experimentelle Chirurgie mit Zentraler Versuchstierhaltung der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock. Ihr gilt mein Dank für die Möglichkeit, neue Methoden zu erlernen, für ihre konstruktive und anregende Kritik an den Projekten sowie für ihre Offenheit und ihr Bestreben, dass ich mich in ihrem Institut zu Hause fühlen möge.

Mein herzlicher Dank gilt auch den Mitarbeitern von Frau Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar: Frau Dr. rer. nat. Kerstin Abshagen und Herrn Dr. rer. nat. Christian Eipel, die immer Zeit hatten, mit mir methodische Fragen zu diskutieren und mir beim Erlernen vieler Methoden und Techniken zur Seite standen. Des Weiteren danke ich Frau Berit Blendow, Frau Doris Butzlaff, Frau Dorothea Frenz, Frau Maren Nerowski für die ausgezeichnete Arbeit bei der Aufarbeitung und Analyse der Proben.

Auch gilt mein Dank Frau Ricarda Frenz, Frau Karin Gerber, Frau Sigrid Reincke, Frau Kathrin Sievert, Frau Andrea Wilhelm, Herrn Roland Gerber und Herrn Reinhard Schwärmer für die Zucht, die prä- und postoperative Versorgung, den Transport und die Prämedikation der Versuchstiere, die Assistenz im OP und das Engagement im Umfeld der Versuche. Ohne Sie wären die Untersuchungen kaum möglich gewesen.

- Meiner Ehefrau Dagmar Roesner und meinen Kindern Julian und Pauline, die durch Geduld und Verständnis, aber auch durch Motivation einen entscheidenden Anteil an der Fertigstellung dieser Arbeit haben. Ohne diese Hilfe wären eine erfolgreiche wissenschaftliche Tätigkeit und das Leben als glücklicher Familienvater nicht in Einklang zu bringen.

## Lebenslauf Jan P. Roesner

### Angaben zur Person:

Name: Jan Patrick Roesner  
Adresse: Thomas-Mann-Str. 25  
18055 Rostock  
Geburtsdatum/-ort: 02.07.1972 in Krefeld  
Familienstand: verheiratet, zwei Kinder

### Schulbildung:

06/1991 Abitur am „Ricarda-Huch-Gymnasium“ in Krefeld

### Studium:

10/1992 – 10/1998 Medizinstudium:  
„Komenius-Universität“ in Bratislava, Slowakische Republik  
Universität Rostock  
„Brown University“, Providence, RI, USA  
„University of Newcastle upon Tyne“, Großbritannien  
10/1998 Abschluß des Medizinstudiums an der Universität Rostock

### Berufliche Tätigkeit:

11/1998 – 03/2004 Arzt im Praktikum, Assistenzarzt an der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock  
03/2004 Facharzt an der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock  
11/2007 – 01/2009 Stationsarzt der Perioperativen Intensivtherapiestation 1 (PIT1)  
09/2008 Subspezialisierung: „Spezielle Intensivmedizin“  
seit 02/2009 Oberarzt der Perioperativen Intensivtherapiestation

### Promotion:

„Zur Rolle von Kalzium im Mechanismus der oxidativ induzierten Zellschädigung. Untersuchungen am Modell isolierter Pankreasazinuszellen der Ratte.“ Abschluß des Promotionverfahrens am 26.05.2003.

### Wissenschaftliche Preise:

2008 Hansepreis für Intensivmedizin; 18. Symposium für Intensivmedizin und Intensivpflege, Bremen für: „The fibrin-derived peptide Bbeta<sub>15-42</sub> is cardioprotective in a pig model of myocardial ischemia-reperfusion injury“ publiziert in Crit Care Med 2007;35:1730-1735

## Publikationsliste

Die in der kumulativen Habilitation integrierten Originalarbeiten sind mit einem \* markiert.

\***Roesner JP**, Petzelbauer P, Koch A, Tran N, Iber T, Vagts DA, Scheeren TWL, Vollmar B, Nöldge-Schomburg GFE, Zacharowski K  
B $\beta$ <sub>15-42</sub> (FX06) reduces pulmonary, myocardial, liver and small intestine damage in a pig model of hemorrhagic shock and reperfusion.  
Crit Care Med 2009;37:598-605 (IF 6,8)

\***Roesner JP**, Petzelbauer P, Koch A, Tran N, Iber T, Mutz C, Vollmar B, Nöldge-Schomburg GE, Zacharowski K  
A double blind, single centre, sub-chronic reperfusion trial evaluating FX06 following haemorrhagic shock in pigs.  
Resuscitation 2009;80:264-271 (IF 2,5)

\***Roesner JP**, Koch A, Bateman R, Scheeren TW, Zander R, Nöldge-Schomburg GE, Zacharowski K  
Accurate and continuous measurement of oxygen deficit during haemorrhage in pigs.  
Resuscitation 2009;80:259-263 (IF 2,5)

Iber T, Hecker K, Vagts DA, **Roesner JP**, Otto B, Steinicke A, Nöldge-Schomburg GF, Rossaint R  
Xenon anesthesia impairs hepatic oxygenation and perfusion in healthy pigs.  
Minerva Anesthesiol 2008;74:511-519 (IF 0,0)

Meissner K, Iber T, **Roesner JP**, Mutz C, Wagner HE, Layher C, Bartels U, Gründling M, Usichenko TI, Wendt M, Lehmann C, Pavlovic D.  
Successful transtracheal lung ventilation using a manual respiration valve: an in vitro and in vivo study.  
Anesthesiology 2008;109:251-259 (IF 4,6)

**Roesner JP**, Petzelbauer P, Koch A, Tran N, Iber T, Vagts DA, Scheeren, Nöldge-Schomburg GEF, Zacharowski K  
Das Peptid B $\beta$ <sub>15-42</sub> reduziert die Schädigung von Herz, Lunge, Leber und Dünndarm nach hämorrhagischem Schock und Reperfusion beim Schwein.  
Anästh Intensivmed 2008; 49: 392-392 (IF 0,0)

\***Roesner JP**, Petzelbauer P, Koch A, Mersmann J, Zacharowski PA, Boehm O, Reingruber S, Pasteiner W, Mascher D, Wolzt M, Barthuber C, Nöldge-Schomburg GEF, Scheeren TW, Zacharowski K  
The fibrin-derived peptide B $\beta$ <sub>15-42</sub> is cardioprotective in a pig model of myocardial ischemia-reperfusion injury.  
Crit Care Med 2007;35:1730-1735 (IF 6,8)

Iber T, **Roesner JP**, Mutz C, Werner B, Peters E, Brüderlein K, Nöldge-Schomburg G, Vagts DA  
Influence of clonidine-induced systemic sympathicolysis on oxygenation and perfusion of the liver. Investigations with healthy pigs under general anesthesia.  
Anaesthesist 2007;56:470-477 (IF 0,8)

Iber T, **Roesner JP**, Mutz C, Nöldge-Schomburg GFE, D. A. Vagts  
(“equal contribution” von Iber und Roesner)

Induction of a reproducible, hypoxemic and hemodynamically compromised but stable early Acute Lung Injury (ALI) model with oleic acid in pigs - tips and pitfalls.

Applied Cardiopulmonary Pathophysiology 2007; 11: 60-66 (IF 0,0)

\***Roesner JP**, Vagts DA, Iber T, Eipel C, Vollmar B, Nöldge-Schomburg GF

Protective effects of PARP inhibition on liver microcirculation and function after haemorrhagic shock and resuscitation in male rats.

Intensive Care Med 2006;32:1649-1657 (IF 4,6)

**Roesner JP**, Vagts DA, Iber T, Vollmar B, Nöldge-Schomburg GFE

Verbesserung von Mikrozirkulation und Funktion der Rattenleber nach hämorrhagischem Schock und Reperfusion durch Hemmung der Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase mittels 5-Aminoisoquinolinon (5-AIQ)

Anästh Intensivmed 2005; 46: 557-558 (IF 0,0)

Vagts DA, Iber T, **Roesner JP**, Mutz C, Kurzweg V, Harkner C, Brüderlein K, Nöldge-Schomburg GF. Effects of systemically applied clonidine on intestinal perfusion and oxygenation in healthy pigs during general anaesthesia and laparotomy.

Eur J Anaesthesiol 2005;22:879-886 (IF 1,4)

Vagts DA, Hecker K, Iber T, **Roesner JP**, Spee A, Otto B, Rossaint R, Nöldge-Schomburg GF

Effects of xenon anaesthesia on intestinal oxygenation in acutely instrumented pigs.

Br J Anaesth 2004;93:833-841 (IF 2,9)

Weber H, **Roesner JP**, Nebe B, Rychly J, Werner A, Schröder H, Jonas L, Leitzmann P, Schneider KP, Dummler W

Increased cytosolic Ca<sup>2+</sup> amplifies oxygen radical-induced alterations of the ultrastructure and the energy metabolism of isolated rat pancreatic acinar cells.

Digestion 1998;59:175-185 (IF 2,1)

1 McCord JM

Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury.  
N Engl J Med 1985; 312: 159-163

2 Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J

Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease.  
Int J Biochem Cell Biol 2007; 39: 44-84

3 Li C, Jackson RM

Reactive species mechanisms of cellular hypoxiareoxygenation injury  
Am J Physiol Cell Physiol 2002; 282: C227–C241

4 Kaminski KA, Bonda TA, Korecki J, Musial WJ

Oxidative stress and neutrophil activation--the two keystones of ischemia/reperfusion injury.  
Int J Cardiol 2002; 86: 41-59

5 Jones DP

Radical-free biology of oxidative stress.  
Am J Physiol Cell Physiol 2008; 295: C849-868

6 Tauber S, Menger MD, Lehr HA

Microvascular in vivo assessment of reperfusion injury: significance of prostaglandin E(1) and I(2) in postischemic "no-reflow" and "reflow-paradox".  
J Surg Res 2004; 120: 1-11

7 Minamiya Y, Tozawa K, Kitamura M, Saito S, Ogawa J

Platelet-activating factor mediates intercellular adhesion molecule-1-dependent radical production in the nonhypoxic ischemia rat lung.  
Am J Respir Cell Mol Biol 1998; 19: 150-157

8 Frijns CJ, Kappelle LJ

Inflammatory cell adhesion molecules in ischemic cerebrovascular disease.  
Stroke 2002; 33: 2115-2122

9 Jordan JE, Zhao ZQ, Vinten-Johansen J

The role of neutrophils in myocardial ischemia-reperfusion injury.  
Cardiovasc Res 1999; 43: 860-878

10 Bizzarri C, Beccari AR, Bertini R, Cavicchia MR, Giorgini S, Allegretti M

ELR+ CXC chemokines and their receptors (CXC chemokine receptor 1 and CXC chemokine receptor 2) as new therapeutic targets.  
Pharmacol Ther 2006; 112: 139-149

11 Jaeschke H and Smith CW

Mechanisms of neutrophil-induced parenchymal cell injury.  
J Leukoc Biol 1997; 61: 647–653

12 Jaeschke H

Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning.  
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2003; 284: G15–G26

13 Pacher P, Szabo C

Role of the Peroxynitrite-Poly(ADP-Ribose)Polymerase Pathway in Human Disease  
The American Journal of Pathology 2008; 173: 2-13

14 Soldani C, Scovassi AI

Poly(ADP-ribose) polymerase-1 cleavage during apoptosis: an uptake  
Apoptosis 2002; 7: 321-328

15 Pacher P, Szabo C

Role of poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) in cardiovascular diseases: the therapeutic potential of PARP inhibitors.  
Cardiovasc Drug Rev 2007; 25: 235-260

- 16 Oliver FJ, Menissier-de Murcia J, Nacci C, Decker P, Andriantsitohaina R, Muller S, de la Rubia G, Stoclet JC, de Murcia G  
Resistance to endotoxic shock as a consequence of defective NF-kappaB activation in poly (ADP-ribose) polymerase-1 deficient mice.  
EMBO J 1999; 18: 4446–4454
- 17 Hassa PO, Hottiger MO  
The functional role of poly(ADP-ribose)polymerase 1 as novel coactivator of NF-kappaB in inflammatory disorders.  
Cell Mol Life Sci 2002; 59: 1534-1553
- 18 Song ZF, Ji XP, Li XX, Wang SJ, Wang SH, Zhang Y  
Inhibition of the activity of poly (ADP-ribose) polymerase reduces heart ischaemia/reperfusion injury via suppressing JNK-mediated AIF translocation.  
J Cell Mol Med 2008; 12: 1220-1228
- 19 Ha HC, Hester LD, Snyder SH  
Poly(ADP-ribose) polymerase-1 dependence of stress-induced transcription factors and associated gene expression in glia.  
Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99: 3270–3275
- 20 Colvin RB, Johnson RA, Mihm MC Jr, Dvorak HF  
Role of the clotting system in cell-mediated hypersensitivity. I. Fibrin deposition in delayed skin reactions in man.  
J Exp Med 1973; 138: 686-698
- 21 Yellon DM, Hausenloy DJ  
Myocardial reperfusion injury.  
N Engl J Med 2007; 357: 1121-1135
- 22 Busso N, Péclat V, Van Ness K, Kolodzieszyk E, Degen J, Bugge T, So A  
Exacerbation of antigen-induced arthritis in urokinase-deficient mice.  
J Clin Invest 1998; 102: 41-50
- 23 Shaw SK, Bamba PS, Perkins BN, Luscinskas FW  
Real-time imaging of vascular endothelial-cadherin during leukocyte transmigration across endothelium. J Immunol 2001; 167:2323-2330
- 24 Petzelbauer P, Zacharowski PA, Miyazaki Y, Friedl P, Wickenhauser G, Castellino FJ, Gröger M, Wolff K, Zacharowski K  
The fibrin-derived peptide Bbeta15-42 protects the myocardium against ischemia-reperfusion injury.  
Nat Med 2005; 11: 298-304
- 25 Kudryk B, Robinson D, Netré C, Hessel B, Blombäck M, Blombäck B  
Measurement in human blood of fibrinogen/fibrin fragments containing the Bβ15–42 sequence.  
Thromb Res 1998; 25: 277-291
- 26 Zacharowski K  
Neue Überlegungen zu Entzündung und Gerinnung  
Anaesthesist 2007; 56:482–484
- 27 Gottlieb RA, Burleson KO, Kloner RA, Babior BM, Engler RL  
Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes.  
J Clin Invest 1994; 94: 1621-1628
- 28 Chandrasekhar Y, Sen S, Anway R, Shuros A, Anand I  
Long-term caspase inhibition ameliorates apoptosis, reduces myocardial troponin-I cleavage, protects left ventricular function, and attenuates remodeling in rats with myocardial infarction.  
J Am Coll Cardiol 2004; 43: 295-301



29 Zacharowski K, Zacharowski PA, Friedl P, Mastan P, Koch A, Boehm O, Rother RP, Reingruber S, Henning R, Emeis JJ, Petzelbauer P  
The effects of the fibrin-derived peptide Bbeta(15-42) in acute and chronic rodent models of myocardial ischemia-reperfusion.  
Shock 2007; 27: 631-637

30 Deitch EA  
Animal models of sepsis and shock: a review and lessons learned.  
Shock 1998; 9: 1-11

31 Siegel JH, Rivkind AI, Dala S, Goodarzi S  
Early physiologic predictors of injury severity and death in blunt multiple trauma.  
Archives of surgery 1990; 125: 498-508

32 Kortbeek JB, Al Turki SA, Ali J, Antoine JA, Bouillon B, Brasel K, Brenneman F, Brink PR, Brohi K, Burris D, Burton RA, Chapleau W, Cioffi W, Collet e Silva Fde S, Cooper A, Cortes JA, Eskesen V, Fildes J, Gautam S, Gruen RL, Gross R, Hansen KS, Henny W, Hollands MJ, Hunt RC, Jover Navalon JM, Kaufmann CR, Knudson P, Koestner A, Kosir R, Larsen CF, Livaudais W, Luchette F, Mao P, McVicker JH, Meredith JW, Mock C, Mori ND, Morrow C, Parks SN, Pereira PM, Pogetti RS, Ravn J, Rhee P, Salomone JP, Schipper IB, Schoettker P, Schreiber MA, Smith RS, Svendsen LB, Taha W, van Wijngaarden-Stephens M, Varga E, Voiglio EJ, Williams D, Winchell RJ, Winter R  
Advanced trauma life support, 8th edition, the evidence for change.  
J Trauma 2008; 64: 1638-50

33 Rixen D, Raum M, Holzgraefe B, Sauerland S, Nagelschmidt M, Neugebauer EA  
A pig hemorrhagic shock model: oxygen debt and metabolic acidemia as indicators of severity.  
Shock 2001; 16: 239-244

34 Hannon JP, Bossone CA, Wade CE  
Normal physiological values for conscious pigs used in biomedical research.  
Laboratory animal science 1990; 40: 293-298

35 Roesner JP, Koch A, Bateman R, Scheeren TW, Zander R, Nöldge-Schomburg GE, Zacharowski K  
Accurate and continuous measurement of oxygen deficit during haemorrhage in pigs.  
Resuscitation 2009; 80:259-263

36 Crimi E, Ignarro LJ, Napoli C  
Microcirculation and oxidative stress.  
Free Radic Res 2007; 41: 1364-1375

37 Carden DL, Granger DN  
Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury.  
J Pathol 2000; 190: 255-266

38 Seal JB, Gewertz BL  
Vascular dysfunction in ischemia-reperfusion injury.  
Ann Vasc Surg 2005; 19: 572-584

39 The EMIP-FR Group  
Effect of 48-h intravenous trimetazidine on short- and long-term outcomes of patients with acute myocardial infarction, with and without thrombolytic therapy; A double-blind, placebo-controlled, randomized trial. The EMIP-FR Group. European Myocardial Infarction Project--Free Radicals.  
Eur Heart J 2000; 21: 1537-1546

40 Bär FW, Tzivoni D, Dirksen MT, Fernández-Ortiz A, Heyndrickx GR, Brachmann J, Reiber JH, Avasthy N, Tatsuno J, Davies M, Hibberd MG, Krucoff MW; CASTEMI Study Group.  
Results of the first clinical study of adjunctive CAIdaret (MCC-135) in patients undergoing primary percutaneous coronary intervention for ST-Elevation Myocardial Infarction: the randomized multicentre CASTEMI study.  
Eur Heart J 2006; 27: 2516-2523

- 41 Mertens P, Maes A, Nuyts J, Belmans A, Desmet W, Esplugas E, Charlier F, Figueras J, Sambuceti G, Schwaiger M, Mortelmans L, Van de Werf F; PSALM investigators  
Recombinant P-selectin glycoprotein ligand-immunoglobulin, a P-selectin antagonist, as an adjunct to thrombolysis in acute myocardial infarction. The P-Selectin Antagonist Limiting Myonecrosis (PSALM) trial. Department of Cardiology, University of Leuven  
*Am Heart J* 2006; 152: 125.e1-8
- 42 Faxon DP, Gibbons RJ, Chronos NA, Gurbel PA, Sheehan F; HALT-MI Investigators  
The effect of blockade of the CD11/CD18 integrin receptor on infarct size in patients with acute myocardial infarction treated with direct angioplasty: the results of the HALT-MI study.  
*J Am Coll Cardiol* 2002; 40: 1199-1204
- 43 Mahaffey KW, Granger CB, Nicolau JC, Ruzyllo W, Weaver WD, Theroux P, Hochman JS, Filloon TG, Mojcik CF, Todaro TG, Armstrong PW; COMPLY Investigators  
Effect of pexelizumab, an anti-C5 complement antibody, as adjunctive therapy to fibrinolysis in acute myocardial infarction: the COMPLEMENT inhibition in myocardial infarction treated with thrombolYTics (COMPLY) trial.  
*Circulation* 2003; 108: 1176-1183
- 44 Bolli R, Becker L, Gross G, Mentzer R Jr, Balshaw D, Lathrop DA; NHLBI Working Group on the Translation of Therapies for Protecting the Heart from Ischemia. Myocardial protection at a crossroads: the need for translation into clinical therapy.  
*Circ Res* 2004; 95: 125-134
- 45 Dirksen MT, Laarman GJ, Simoons ML, Duncker DJ  
Reperfusion injury in humans: a review of clinical trials on reperfusion injury inhibitory strategies.  
*Cardiovasc Res* 2007; 74: 343-355
- 46 Vinten-Johansen J  
Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury.  
*Cardiovasc Res* 2004; 61: 481-497
- 47 Frangogiannis NG  
Targeting the inflammatory response in healing myocardial infarcts.  
*Curr Med Chem* 2006; 13: 1877-1893
- 48 Roy S, Khanna S, Kuhn DE, Rink C, Williams WT, Zweier JL, Sen CK  
Transcriptome analysis of the ischemia-reperfused remodeling myocardium: temporal changes in inflammation and extracellular matrix.  
*Physiol Genomics* 2006; 25: 364-374
- 49 Bakhtiary F, Moritz A, Kleine P, Dzemali O, Simon A, Ackermann H, Martens S  
Leukocyte depletion during cardiac surgery with extracorporeal circulation in high risk patients.  
*Inflamm Res* 2008; 57: 577-585
- 50 Satoh MS, Lindahl T  
Role of poly(ADP-ribose) formation in DNA repair.  
*Nature* 1992; 356: 356-358
- 51 Thiemermann C, Bowes J, Myint FP, Vane JR  
Inhibition of the activity of poly(ADP ribose) synthetase reduces ischemia-reperfusion injury in the heart and skeletal muscle.  
*Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94: 679-683
- 52 Szabo C  
Potential role of the peroxynitrate-poly(ADP-ribose) synthetase pathway in a rat model of severe hemorrhagic shock.  
*Shock* 1998; 9: 341-344
- 53 Watts JA, Robert M, Grattan II RM, Whitlow BS, Kline JA  
Activation of poly(ADP-ribose) polymerase in severe hemorrhagic shock and resuscitation. *Am J Gastrointest Liver Physiol* 2001; 281: G498-G506

54 McDonald MC, Mota-Filipe H, Wright JA, Abdelrahman M, Threadgill MD, Thompson AS, Thiemermann C  
Effects of 5-aminoisoquinolinone, a water-soluble, potent inhibitor of the activity of poly (ADP-ribose) polymerase on the organ injury and dysfunction caused by haemorrhagic shock. *Br J Pharmacol* 2000; 130: 843-850

55 Roesner JP, Vagts DA, Iber T, Eipel C, Vollmar B, Nöldge-Schomburg GFE  
Protective effects of PARP inhibition on liver microcirculation and function after haemorrhagic shock and resuscitation in male rats.  
*Intensive Care Med* 2006;32:1649-1657

56 Khandoga A, Biberthaler P, Enders G, Krombach F  
5-Aminoisoquinolinone, a novel inhibitor of poly(adenosine disphosphate-ribose) polymerase, reduces microvascular liver injury but not mortality rate after hepatic ischemia-reperfusion.  
*Crit Care Med* 2004; 32: 472-477

57 Di Cosimo S, Baselga J  
Targeted therapies in breast cancer: where are we now?  
*Eur J Cancer* 2008; 44: 2781-2790

58 Rodon J, Iñiesta MD, Papadopoulos K  
Development of PARP inhibitors in oncology.  
*Expert Opin Investig Drugs* 2009; 18: 31-43

59 Perez RL, Roman J  
Fibrin enhances the expression of IL-1 beta by human peripheral blood mononuclear cells. Implications in pulmonary inflammation.  
*J Immunol* 1995; 154: 1879-1887

60 Qi J, Goralnick S, Kreutzer DL  
Fibrin regulation of interleukin-8 gene expression in human vascular endothelial cells.  
*Blood* 1997; 90: 3595-3602

61 Qi J, Kreutzer DL, Piela-Smith TH  
Fibrin induction of ICAM-1 expression in human vascular endothelial cells.  
*J Immunol* 1997; 158: 1880-1886

62 Szaba FM, Smiley ST  
Roles for thrombin and fibrin(ogen) in cytokine/chemokine production and macrophage adhesion in vivo.  
*Blood* 2002; 99: 1053-1059

63 Drew AF, Tucker HL, Liu H, Witte DP, Degen JL, Tipping PG  
Crescentic glomerulonephritis is diminished in fibrinogen-deficient mice.  
*Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 281: F1157-1163

64 Wilberding JA, Ploplis VA, McLennan L, Liang Z, Cornelissen I, Feldman M, Deford ME, Rosen ED, Castellino FJ  
Development of pulmonary fibrosis in fibrinogen-deficient mice.  
*Ann N Y Acad Sci* 2001; 936: 542-548

65 Roesner JP, Petzelbauer P, Koch A, Mersmann J, Zacharowski PA, Boehm O, Reingruber S, Pasteiner W, Mascher D, Wolzt M, Barthuber C, Nöldge-Schomburg GEF, Scheeren TW, Zacharowski K  
The fibrin-derived peptide Bbeta15-42 is cardioprotective in a pig model of myocardial ischemia-reperfusion injury.  
*Crit Care Med* 2007;35:1730-1735

66 Hausenloy DJ, Yellon DM  
Preconditioning and postconditioning: united at reperfusion.  
*Pharmacol Ther* 2007; 116: 173-191

67 Sawa Y, Ichikawa H, Kagisaki K, Ohata T, Matsuda H  
Interleukin-6 derived from hypoxic myocytes promotes neutrophil-mediated reperfusion injury in myocardium.  
*J Thorac Cardiovasc Surg* 1998; 116: 511-517

- 68 Deswal A, Petersen NJ, Feldman AM, Young JB, White BG, Mann DL  
Cytokines and cytokine receptors in advanced heart failure: an analysis of the cytokine database from the Vesnarinone trial (VEST).  
Circulation 2001; 103: 2055-2059
- 69 Atar D, Petzelbauer P, Schwitter J, Huber K, Rensing B, Kasprzak JD, Butter C, Grip L, Hansen PR, Süselbeck T, Clemmensen PM, Marin-Galiano M, Geudelin B, Buser PT; F.I.R.E. Investigators.  
Effect of intravenous FX06 as an adjunct to primary percutaneous coronary intervention for acute ST-segment elevation myocardial infarction - results of the F.I.R.E. (Efficacy of FX06 in the Prevention of Myocardial Reperfusion Injury) trial.  
J Am Coll Cardiol 2009; 53: 720-729
- 70 Ikonomidis I, Athanassopoulos G, Lekakis J, Venetsanou K, Marinou M, Stamatelopoulos K, Cokkinos DV, Nihoyannopoulos P  
Myocardial ischemia induces interleukin-6 and tissue factor production in patients with coronary artery disease: a dobutamine stress echocardiography study.  
Circulation 2005; 112: 3272-3279
- 71 Michard F  
Bedside assessment of extravascular lung water by dilution methods: temptations and pitfalls.  
Crit Care Med 2007; 35: 1186-1192
- 72 Sakka SG, Klein M, Reinhart K, Meier-Hellmann A  
Prognostic value of extravascular lung water in critically ill patients.  
Chest 2002; 122: 2080-2086
- 73 Abraham E  
Neutrophils and acute lung injury.  
Crit Care Med 2003; 31: S195-199
- 74 Hierholzer C, Kalff JC, Omert L, Tsukada K, Loeffert JE, Watkins SC, Billiar TR, Tweardy DJ  
Interleukin-6 production in hemorrhagic shock is accompanied by neutrophil recruitment and lung injury.  
Am J Physiol 1998; 275: L611-621
- 75 Bhatia M, Mochhala S  
Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome.  
J Pathol 2004; 202: 145-156
- 76 Romano M, Sironi M, Toniatti C, Polentarutti N, Fruscella P, Ghezzi P, Faggioni R, Luini W, van Hinsbergh V, Sozzani S, Bussolino F, Poli V, Ciliberto G, Mantovani A  
Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment.  
Immunity 1997; 6: 315-325
- 77 Meng ZH, Dyer K, Billiar TR, Tweardy DJ  
Essential role for IL-6 in postresuscitation inflammation in hemorrhagic shock.  
Am J Physiol Cell Physiol 2001; 280: C343-351
- 78 Schwarte LA, Picker O, Bornstein SR, Fournell A, Scheeren TW  
Levosimendan is superior to milrinone and dobutamine in selectively increasing microvascular gastric mucosal oxygenation in dogs.  
Crit Care Med 2005; 33: 135-142
- 79 Roesner JP, Petzelbauer P, Koch A, Tran N, Iber T, Vagts DA, Scheeren TWL, Vollmar B, Nöldge-Schomburg GFE, Zacharowski K  
B $\beta$ 15-42 (FX06) reduces pulmonary, myocardial, liver and small intestine damage in a pig model of hemorrhagic shock and reperfusion.  
Crit Care Med 2009; 37: 598-605
- 80 Ekataksin W  
The isolated artery: an intrahepatic arterial pathway that can bypass the lobular parenchyma in mammalian livers.  
Hepatology 2000; 31: 269-279

81 Vollmar B, Lang G, Menger MD, Messmer K

Hypertonic hydroxyethyl starch restores hepatic microvascular perfusion in hemorrhagic shock.

Am J Physiol 1994; 266: H1927-1934

82 Chien S

The Microcirculatory Society Eugene M. Landis Award lecture. Role of blood cells in microcirculatory regulation.

Microvasc Res 1985; 29: 129-151

83 House SD, Lipowsky HH

Leukocyte-endothelium adhesion: microhemodynamics in mesentery of the cat.

Microvasc Res 1987; 34: 363-379

84. Meng ZH, Dyer K, Billiar TR, Tweardy DJ

Essential role for IL-6 in postresuscitation inflammation in hemorrhagic shock.

Am J Physiol Cell Physiol 2001; 280: C343-351

85. Yang R, Han X, Uchiyama T, Watkins SK, Yaguchi A, Delude RL, Fink MP

IL-6 is essential for development of gut barrier dysfunction after hemorrhagic shock and resuscitation in mice.

Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2003; 285: G621-629

86 Roesner JP, Petzelbauer P, Koch A, Tran N, Iber T, Mutz C, Vollmar B, Nöldge-Schomburg GE, Zacharowski K

A double blind, single centre, sub-chronic reperfusion trial evaluating FX06 following haemorrhagic shock in pigs.

Resuscitation 2009; 80: 264-271

87 Van Leeuwen PA, Boermeester MA, Houdijk AP, Ferwerda CC, Cuesta MA, Meyer S, Wesdorp RI

Clinical significance of translocation.

Gut 1994; 35: S28-34

88 Gröger M, Pasteiner W, Ignatyev G, Matt U, Knapp S, Atrasheuskaya A, Bukin E, Friedl P, Zinkl D, Hofer-Warbinek R, Zacharowski K, Petzelbauer P, Reingruber S

Peptide Bbeta(15-42) preserves endothelial barrier function in shock.

PLoS ONE 2009; 4: e5391

89 Holinstat M, Knezevic N, Broman M, Samarel AM, Malik AB, Mehta D

Suppression of RhoA activity by focal adhesion kinase-induced activation of p190RhoGAP: role in regulation of endothelial permeability.

J Biol Chem 2006; 281: 2296-2305