

T. Koch¹ · R. H. W. Funk²

¹Klinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie, Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus der Technischen Universität Dresden

²Institut für Anatomie, Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus der Technischen Universität Dresden

Zelluläre Dysfunktion in der Pathogenese des Organversagens

Neue Erkenntnisse durch molekular- und zellbiologische Methoden

Zusammenfassung

In den letzten Jahren richtet sich das Hauptforschungsinteresse auf die organspezifischen intrazellulären Stressreaktionen als mögliche Pathomechanismen des Organversagens. In dieser Übersicht werden aktuelle Erkenntnisse der Reaktionsmuster auf zellulären Stress, unter besonderer Berücksichtigung der Hypoxie, der oxidativen Schädigung durch Sauerstoffradikale (ROS), des Hitzeschocks und nach mechanischem Stress dargestellt. Generell scheinen verschiedene Stressgenprogramme abhängig von Zelltyp und Art der Schädigung zur Zytrotektion aktiviert zu werden, die jedoch bei fulminanter oder protrahierter Stimulation Apoptose bzw. Nekrose induzieren. Als guter Indikator für Zellstress reagieren relativ früh die Mitochondrien auf Hitzeschock und oxidativen Stress mit Veränderung ihrer Membranintegrität, Schwellung und Verlust von Zytocrom c in das Zytoplasma. Diese Veränderungen können vitalmikroskopisch analysiert und durch neue histomorphologische Methoden (pH-, Kalzium-Imaging) quantifiziert werden. Die ischämisch/anoxische Stressreaktion ist durch anaerobe Glykolyse und verminderte Proteinsynthese, Expression von „hypoxia associated proteins“, Akutphase- und Hitzeschockproteine charakterisiert. Allgemein führen Ischämie und ATP-Mangel unter pH-Veränderung zu einem Zerfall des Aktinskeletts und der assoziierten Strukturen. Dabei lösen sich die Zellen häufig aus dem Gewebsverband und sterben ab. Pharmakologische Interventionen, die modulierend in die Apoptosekaskade eingreifen, weisen auf zukünftige therapeutische Optionen hin.

Schlüsselwörter

Zellstress · Organdysfunktion · Organversagen · Apoptose · Nekrose

Trotz erheblicher Fortschritte in der Intensivmedizin stellt das Organversagen infolge von Trauma, Schock, Verbrennungen und Sepsis noch immer die Haupttodesursache auf operativen Intensivstationen dar. Die bisher fehlenden kausalen therapeutischen Strategien reflektieren den extrem komplexen biochemischen und pathophysiologischen Prozess, der diesem Krankheitsbild zugrunde liegt. Das Versagen vitaler Organe resultiert auf dem Boden der Gewebhypoxie, als gemeinsame pathogenetische Endstrecke meist infolge einer systemisch inflammatorischen Reaktion, die durch eine gestörte Makro- und Mikrozirkulation und zelluläre Dysfunktion charakterisiert ist. Inflammatorische Reaktionen können mikrobiell, toxisch oder immunologisch induziert werden und führen bei protrahierter Aktivierung humoraler und zellulärer Mediatorsysteme zu den führenden Symptomen einer gestörten Vasoregulation und den Zeichen eines kapillären Lecks [20]. Die beteiligten Systeme können sowohl kaskadenartig verlaufen als auch im Sinne eines Netzwerks verbunden sein. Die initial häufig überschießende Immunantwort kann im Verlauf in eine Immunparalyse übergehen. Durch die Dysregulation der Entzün-

dungsantwort kommt es zu einer gestörten Vasoregulation und Endothel-Dysfunktion mit konsekutiver Distributionsstörung in der Makro- und Mikrozirkulation. So kann z. B. durch Endotoxin ein Spasmus der Lungenendstrombahn bis hin zu den kapillären Strecken ausgelöst werden [19].

Das Missverhältnis zwischen dem Sauerstoffangebot und einem bei verminderter Utilisation reduzierten Sauerstoffverbrauch führt zur Hypoxie einzelner Organe oder Organbezirke. Im Bereich der Mikrozirkulation treten rheologische Störungen sowie eine gesteigerte transkapilläre Flüssigkeitssequestration mit interstitiellem Ödem und Abnahme des intravasalen Volumens auf. Trotz Volumensubstitution und dem Einsatz inotroper und vasoaktiver Substanzen kann die durch Maldistribution und gestörte Sauerstoff-Utilisation beeinträchtigte Gewebeoxygenierung häufig nicht gesichert werden. Organminderperfusion und Zellhypoxie stellen daher den Hauptfaktor für die Entwicklung des Multiorganversagens dar.

In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl an innovativen Therapien mit spezifischen Antikörpern und Rezeptorantagonisten, die auf verschiedenen Ebenen des komplexen Entzündungsgeschehens eingreifen auf ihre therapeutische Wirksamkeit überprüft (Tabelle 1).

Prof. Dr. Thea Koch

Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin, Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus, Fetscherstraße 74, 01307 Dresden, E-Mail: tkoch@rcs.urz.tu-dresden.de

Cellular dysfunction in the pathogenesis of organ failure. New insights from molecular and cell biology

Summary

Multiple organ failure remains the major cause of death in critically ill patients. In view of therapeutic strategies, current research activities focus on the cellular response to different kinds of cellular stress (hypoxia, oxidative damage and mechanical distress) in the pathogenic sequelae of organ failure. The cellular stress reactions are characterized by induction of adaptive programs of gene expression (e.g. acute phase proteins, heat shock proteins, hypoxia-associated proteins) to protect the cells from energy depletion and cell death. Generally, the mitochondria are early indicators of cellular stress showing a loss of cytochrome c and a breakdown of the transmembrane potential. Shortage of ATP and decrease of pH can be observed in the cytoplasm which leads to a disintegration of the cytoskeleton. As a consequence, the cell becomes spherical and separates from the surrounding cells. Depending on the acuity of the stressor, the cell dies due to necrosis or apoptosis. Dysregulation of the balance of apoptosis and necrosis in different organs seems to be an important mechanism in the development of organ failure. New insights into the cellular mechanisms during organ dysfunction promote the development of new diagnostic (e.g. optical and spectroscopic) and pharmacological tools leading to a better prevention and therapy of organ failure.

Keywords

Cellular stress · Organ dysfunction · Organ failure · Apoptosis · Necrosis

Tabelle 1

Anzahl der Studien mit den jeweiligen Patientenzahlen zu verschiedenen immunmodulatorisch wirksamen Substanzen. (Mod. nach [1])

Immunmodulatorische Therapie bei Sepsis (n=15262)

Substanz	Anzahl der Studien	Patientenzahl
Kortikosteroide	9	1298
Anti-Endotoxin-Antikörper		
HA-1A	2	2742
E5	2	1335
IL-1ra	3	1688
Bradykinin-Antagonisten	2	755
Anti-TNF α monoclonal Antibodies		
Murine anti-TNF	3	3414
Murine anti-TNF α Fab ₂ fragment	3	607
TNF receptor fusion proteins		
p75 TNF receptor fusion protein	1	179
p55 TNF receptor fusion protein	2	1838
Plättchen aktivierender Faktor (PAF)	2	930
Ibuprofen (Zyklooxygenaseinhibitor)	3	514

TNF Tumornekrosefaktor.

Zusammenfassend waren die Ergebnisse nach erfolgreichem Einsatz in experimentellen Studien in der klinischen Prüfung hinsichtlich einer Senkung der Mortalität enttäuschend [1]. Als mögliche Gründe hierfür werden eine unzureichende Stratifizierung des Krankenguts, fehlende Beachtung der zeitlichen Dynamik der inflammatorischen Reaktion und des individuellen Immunstatus sowie die noch ungeklärten Prozesse auf zellulärer Ebene diskutiert.

Durch die Fortschritte in der Grundlagenforschung, insbesondere auf dem Gebiet der Molekularbiologie, konnten in den letzten Jahren neue Einblicke in die Pathomechanismen zellulärer und subzellulärer Dysfunktion gewonnen werden, die Hoffnungen auf zukünftige therapeutische Optionen wecken. In dieser Übersicht werden aktuelle Erkenntnisse der Pathomechanismen und Reaktionsmuster auf zellulären Stress, die schließlich zum Zelluntergang führen können, unter besonderer Berücksichtigung der Hypoxie und der oxidativen Schädigung durch Sauerstoffradikale (ROS) zusammengefasst (Abb. 1).

Zelltod: Apoptose und Nekrose

Prinzipiell sind 2 Formen des Zelltods (Apoptose und Nekrose) zu unterscheiden.

Diese Differenzierung zwischen Nekrose und Apoptose ist auch für die Entwicklung neuer Therapeutika essentiell. Die Nekrose ist eine nichtspezifische Art des Zelltods, die durch extreme Abweichungen physiologischer Bedingungen z. B. durch physikalische, chemische oder toxische Einwirkungen, wie Verbrennungen, Vergiftungen oder mechanische Beschädigung ausgelöst wird. Diese führen zu einer Schädigung der Zytoplasmamembran und zur Zerreißen der Zelle, in deren Folge eine Entzündungsreaktion ausgelöst wird. Beim nekrotischen Zelltod kann durch einen zellulären Stoffwechsellkollaps die ionische Homöostase nicht mehr aufrechterhalten werden. Das ATP-Niveau erschöpft sich und die Transmembranionengradienten gehen verloren. In deren Folge kommt es zur Zell- und Organellschwellung und zur Zerreißen der Plasmamembran mit Freisetzung lysosomaler Enzyme, die ihrerseits zu einer inflammatorischen Reaktion in den umgebenden Geweben führen. Die Nekrose scheint nach dem heutigen Kenntnisstand nicht genetisch beeinflusst zu werden.

Im Gegensatz dazu setzt bei der Apoptose ein genetisch gesteuertes Programm den gezielten so genannten programmierten Zelltod in Gang. Neben physiologischen Signalstoffen wie dem Tumornekrosefaktor (TNF) oder den

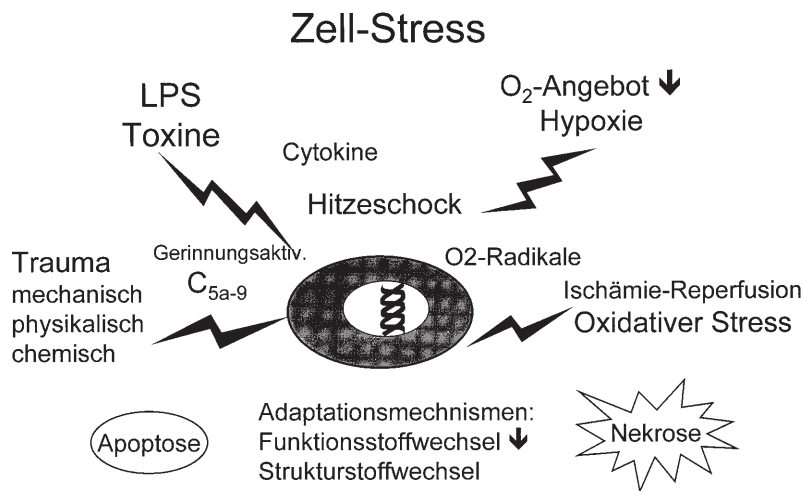


Abb. 1 ▲ Schema: Verschiedene Auslöser von Zellstress, die in Abhängigkeit von dem zellulären Reaktionsmuster zu Apoptose und Nekrose führen können

Liganden des APO-1/CD95-Rezeptors können u. a. g- oder UV-Strahlen, Chemotherapeutika, ROS, Hitzeschock sowie Schädigungen der DNA einen apoptotischen Zelltod auslösen. Morphologisch kann man zu Beginn der Apoptose eine Verringerung des Zellvolumens beobachten. Doch der Stoffwechsel der apoptotischen Zelle läuft noch über einen langen Zeitraum normal weiter. Dann schrumpfen Zytoplasma und Zellkern, jedoch bleiben im Gegensatz zur Nekrose die Organellen, wie Mitochondrien und endoplasmatisches Retikulum, intakt. Im Endstadium der Apoptose bilden sich an der Zellmembran charakteristische Ausstülpungen und Bläschen, und die Zelle und der Zellkern (Abb. 2) zerfallen schließlich in membranumschlossene Abschnürungen (apoptotische Körperchen), die von phagozytierenden Zellen aufgenommen und ohne lokale Entzündungsreaktion eliminiert werden. Die Zytoplasmamembran bleibt bis zu diesem Zeitpunkt funktionell intakt.

Biochemisch kommt es aber bereits zu Beginn der Apoptose zu charakteristischen Veränderungen, die Ansatzpunkte für spezifische Detektionssysteme bieten. So wird in der Membran Phosphatidylserin, das normalerweise ausschließlich auf der zytoplasmatischen Membranseite lokalisiert ist, auf die extrazelluläre Seite verlagert. Im Zellkern werden spezifische kalzium- und magnesiumabhängige DNasen aktiviert, die die genomische DNA in charakteristische Bruchstücke zerschneiden.

Die Bedeutung des Zelltods für den Organismus wird besonders klar, wenn

der Prozess fehlreguliert wird. Wie ein Zuviel an Zelltod kann ebenso ein Zuwenig die Ursache von Krankheiten sein. So führt entgegen früherer Ansichten nicht nur verstärkte Proliferation zur Entstehung eines Tumors, sondern vermutlich auch eine verringerte Zelleliminationsrate. Vorzeitige oder verstärkte Apoptose resultiert beispielsweise in Anämien und Zelluntergang nach ischämischen Infarkten und bei neurodegenerativen Erkrankungen.

Die Störung des fein ausbalancierten Gleichgewichts zwischen Zellproliferation und -elimination verursacht also pathologische Zustände.

Die klinische Relevanz des Phänomens von Apoptose und Nekrose in der

Genese der Organdysfunktion wird z. Z. intensiv in experimentellen Studien untersucht [25]. Trotz unterschiedlicher Schädigungsmechanismen und der variablen zellspezifischen Reaktionen scheint die Apoptose als gemeinsame Konsequenz nach Aktivierung verschiedener Signaltransduktionsmechanismen durch unterschiedliche Noxen beim Organversagen eine wichtige pathogenetische Rolle zu spielen. Erste überzeugende klinische Hinweise wurden kürzlich von Hotchkiss et al. publiziert [15], die die Relevanz von Apoptose und Nekrose bei Organdysfunktion infolge Sepsis prospektiv bei 20 Patienten, die am Multiorganversagen starben, im Vergleich zu 16 nichtseptischen Patienten histomorphologisch untersuchten. Die Detektion von Apoptose in den verschiedenen Organen erfolgte über 3 unabhängige Methoden (TUNEL, DNA-Gel-Elektrophorese, immunhistochemischer Nachweis von Caspase-3) und wurde mit der prä-mortalen Organdysfunktion korreliert. Während Nekrose vorwiegend in der Leber nachweisbar war, wurde Apoptose vorwiegend in der Milz, im Ileum und Kolon (intestinale Epithelzellen) sowie insbesondere in den Lymphozyten festgestellt. Bei septischen Patienten wurde eine signifikant erhöhte Caspase-3-Aktivität im Vergleich zur Kontrollgruppe immunhistochemisch nachgewiesen. Diese Ergebnisse weisen auf eine erhöhte Caspase-3-medierte Lymphozytenapoptose hin, die zur kompromittierten Immunabwehr bei Sepsis beiträgt.

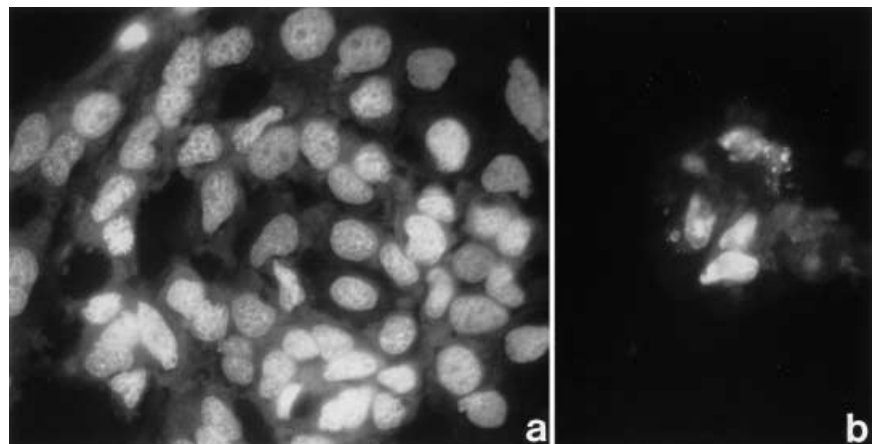


Abb. 2a,b ▲ Darstellung von Zellkernen retinaler Zellen (Einzelzellen einer Zelllinie, R28) während verschiedener Stadien der Apoptose (Indikator YOPRO). Ausgelöst wurde die Apoptose durch Glyoxal, ein physiologisch vorkommender Metabolit im Energiestoffwechsel, der oxidativen Stress und Proteinquervernetzung erzeugen kann. a Neben Kernen mit normalem Chromatinmuster sind kondensierte Kerne zu erkennen. In b ist oben eine Fragmentierung eines Kerns in mehrere Bruchstücke (Ende der Apoptosekaskade) zu erkennen

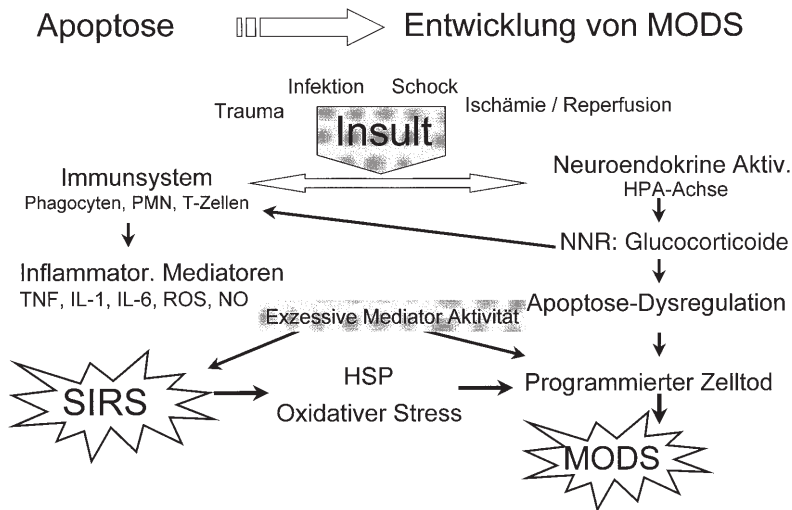


Abb.3 ▲ Schematische Darstellung der pathophysiologischen Zusammenhänge von Apoptose in der Entwicklung des Multiorgan dysfunktionssyndroms (MODS). HPA Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren; IL Interleukin; HSP Hitzeschockprotein; NO Stickstoffmonoxid; PMN polymorphkernige neutrophile Granulozyten; ROS reaktive Sauerstoffspezies; TNF Tumornekrosefaktor

Organdysfunktion resultiert also aus der zellulären Antwort auf eine Reihe unterschiedlicher Noxen, die durch Aktivierung humoraler und zellulärer Mediatorsysteme zur Amplifikation inflammatorischer Prozesse führen und über zellspezifische Signaltransduktionswege so genannte Stressgenprogramme aktivieren und den apoptotischen Zelltod induzieren können. Das Schema in Abb. 3 verdeutlicht die pathophysiologischen Zusammenhänge von Apoptose in der Entwicklung des Multiorganversagens. Inwiefern organspezifische zelluläre Reaktionen hinsichtlich der Auslösung von Apoptose und Nekrose die klinisch zu beobachtende Sequenz von Organdysfunktion mit häufig beginnendem Lungenversagen, gefolgt von Leber-, Nieren- und Myokard- sowie intestinaler Dysfunktion determinieren, ist noch ungeklärt. Neue Einsichten in die verschiedenen Schädigungsmechanismen auf zellulärer und molekularer Ebene und der daran beteiligten Gene versprechen zukünftige therapeutische Ansatzpunkte zur Prävention von unkontrolliertem Zelluntergang und Organdysfunktion.

Zelluläre Stressreaktionen

Die zellulären Reaktionen auf verschiedene Arten von Stress sind durch die Induktion von adaptiven Stressgenprogrammen zur Verhinderung einer Energieverarmung und Aufrechterhaltung

der Homöostase gekennzeichnet. Diese beinhalten die *ischämisch/anoxische Stressreaktion*, die durch anaerobe Glykolyse und verminderte Proteinsynthese, Expression von „hypoxia associated proteins“ (z. B. Glyzeraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase), Akutphaseproteine und Hitzeschockproteine charakterisiert ist (Abb. 4). Unterschiede im Muster der Akutphaseproteine zeigen sich in Abhängigkeit des jeweiligen Zellstresses. So ist z. B. das eisentransportierende Protein Transferrin nur bei Hypoxie erhöht. Die Akutphaseproteine haben u. a. folgende Wirkungen:

- ▶ Proteaseninhibition (Verminderung der Granulozyten-medierten Gewebeschädigung,

- ➔ Akut-Phase Reaktion: CRP, α_1 -Antitrypsin, α_1 -Chymotrypsin, C3, Haptoglobin, saures Glykoprotein
- ➔ Hochregulation Hypoxie-induz. Proteine: z.B. Transferrin, Glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
- ➔ Induktion von Glucose regulierenden Proteinen
- ➔ Zytokine (IL-6, TNF α)
- ➔ Heat Shock Response (HSP 70 family)
- ➔ Erythropoetin



Abb.4 ▲ Adaptationsmechanismen des Organismus auf zellulären Stress

- ▶ prokoagulatorische Aktivität,
- ▶ Hochregulation spezieller Proteine für den anaeroben Metabolismus,
- ▶ Opsonierung von Bakterien,
- ▶ Modulation der Immunantwort.

Als einen weiteren wichtigen Schutzmechanismus vor hypoxischer Zellschädigung konnte an einer Vielzahl von Zelllinien (Hepatozyten, glatte Muskelzellen der Lunge, Enterozyten, Fibroblasten) die Expression des hypoxia inducible factor (HIF-) 1 nachgewiesen werden, der als regulatorischer Transkriptionsfaktor die Hypoxie-induzierte Genexpression reguliert [4]. Zu den so genannten „hypoxia responsive genes“ gehören die Genregulation der Enzyme, die zur Aufrechterhaltung der zellulären Glukosehomöostase beitragen (u. a. Aldolase A, Enolase-1, Laktatdehydrogenase, Phosphoglyceratkinase-1), aber auch die Expression der induzierbaren NO-Synthase, von Vascular endothelial growth factor (VEGF) und Erythropoetin. Die maximale Expression von HIF-1 erfolgt bei Gewebesauerstoffpartialdrücken von 0,5–1,07 kPa nach ca. 2–4 h und wird als gemeinsamer Signaltransduktionsmechanismus bei Hypoxie angesehen.

Kann durch inadäquate Adaptation oder protrahierten Stress eine (v. a. durch Mitochondrienschädigung bedingte) ATP-Depletion nicht verhindert werden, kommt es durch Aktivierung von Caspasen zum Versagen der Membranionpumpe mit Verlust der Zellmembranintegrität und konsekutiver Zellschwellung. Durch intrazellulären Einstrom von Ca²⁺ werden verschiedene degradative Prozesse initiiert, die schließlich zum Zelltod führen [8].

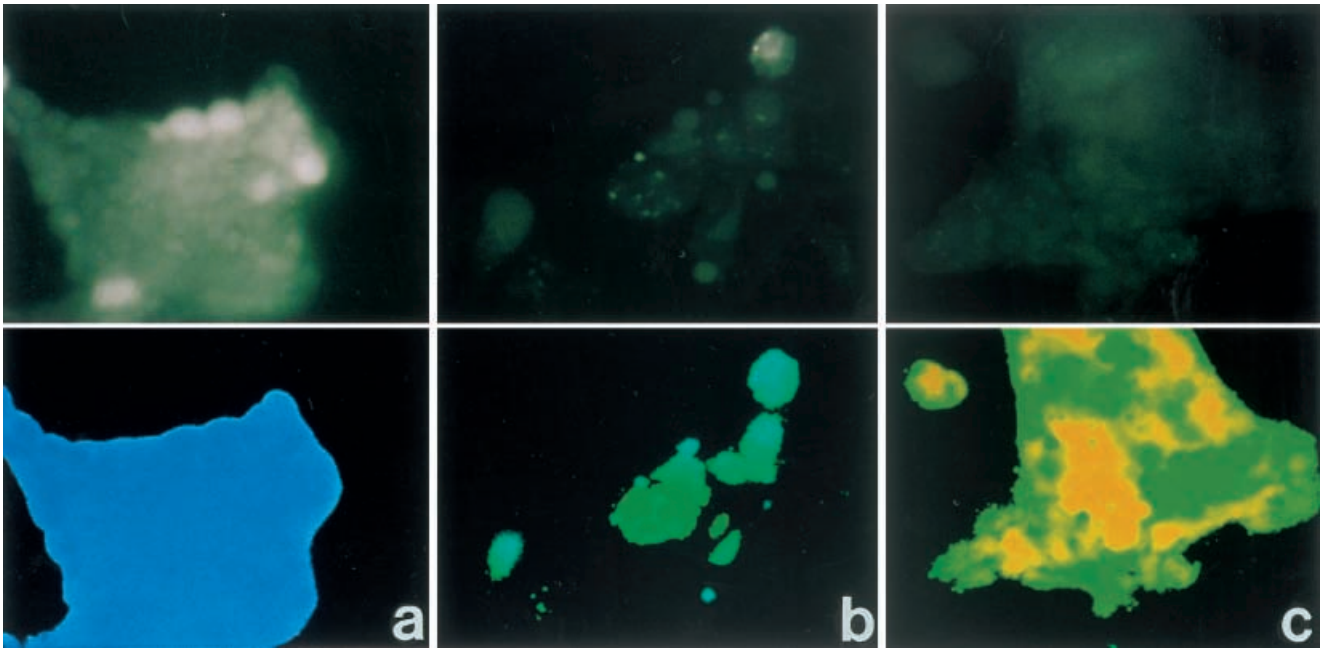


Abb. 5 ▲ Darstellung des intrazellulären pH-Werts in lebenden retinalen Zellen (R28) mit dem Indikator BCECF vor (a), nach Hypoxie (b) und nach Kombination von metabolischem Stress (Glyoxal) und Hypoxie (c). Beachte den Farbübergang von Blau (physiologischer pH) nach Grün bzw. Gelb (sinkender pH) in der unteren Bildreihe und die Konzentration des Farbindikators im Zytoplasma bzw. in den Lysosomen (obere, schwarz-weiße Bildreihe)

Hauptmechanismen der *oxidativen Schädigung* stellen die Lipidperoxidation und die Zerstörung von Zell- und Organellmembranen, die Beeinträchtigung mitochondrialer Enzyme der Atmungskette und direkte Schäden bzw. Mutationen der DNA dar. Hierbei ist die mitochondriale DNA durch das Fehlen an effizienten DNA-Reparaturenzymen besonders empfindlich gegenüber mutagenen Schäden. Darüber hinaus wird an Proteinen die Bildung von advanced glycation endproducts (AGE) über die so genannte „Maillard-Reaktion“ („Zuckerquervernetzung“) eingeleitet [22]. AGEs wiederum können die Proteine der Atmungskette schädigen. Dies führt in Kombination mit den oben genannten Schädigungsmechanismen über eine verminderte ATP-Produktion und Auswirkung auf die Na^+/K^+ -ATPase zur Membrandepolarisation und Einleitung der Apoptosekaskade [11]. Neue Erkenntnisse, die darauf hinweisen, dass ein Absinken des intramitochondrialen und später intrazellulären pH auf den Aktindepolarisationsfaktor (ADF) wirkt, lassen Auswirkungen auf das Zytoskelett erwarten. In diesem Zusammenhang ist bisher bekannt, dass eine Ischämie und ATP-Mangel unter pH-Veränderung (Abb. 5) zu einem Zerfall des Aktinske-

letts und der assoziierten Strukturen führt und sich die Verbindungen zwischen Zellmembran und Zytoskelett lösen. Alle diese Vorgänge führen zu Veränderungen der Zellmorphologie und zur Zelldysfunktion und begünstigen schließlich den Verlust von Zellen. Dabei lösen sich die Zellen häufig aus dem Verband, kugeln sich ab und sterben.

Die bei diesen Vorgängen entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies induzieren über die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NFκB die Zytokinsynthese, die ihrerseits die inflammatorische Reaktion amplifiziert und mit weiterem apoptotischen Zelltod einhergeht.

Die *Hitzeschockreaktion* stellt ein potenziell protektives Genprogramm im Rahmen der Sepsis dar. Wie neuere Ergebnisse aus der zell- und molekularbiologischen Forschung ergaben, haben alle lebenden Systeme, von den Bakterien bis hin zu den Menschen, Mechanismen entwickelt, um trotz verschiedenster Umweltstressoren ihre Homöostase aufrechtzuerhalten [9]. Heute sind 4 so genannte Stressgenprogramme bekannt: der Hitzeschock, die oxidative Stressantwort, die Stressantwort auf UV-Licht und die Akutphasereaktion. Vermittler der Hitzeschockreaktion sind so genannte Hitzeschockproteine (z. B. heat shock protein

72), die als „Molekulare Chaperone“ die Struktur und Faltung neu synthetisierter Peptide stabilisieren und vor Denaturierung schützen. Die Expression von HSP wurde in Leber, Milz, Darm, Lunge, Niere, Gehirn, Muskulatur und Myokard bei Sepsis und unter anderen klinisch relevanten Stressbedingungen beobachtet wie z. B. Ischämie und Reperfusion, akuter Lungenschädigung und nach Organtransplantation (Niere, Pankreas). Als Hauptauslöser der Hitzeschockreaktion werden ROS, Stickstoffmonoxid (NO), Endotoxin, TNFα und IL-1β angesehen. Weiterhin wurden HSP unter Hypoxie infolge von kardialen oder hämorrhagischem Schock detektiert. Ferner scheint auch eine akute Hypertension die HSP-Expression in vaskulären Endothelzellen zu initiieren. Da die Expression der Stressgenprogramme hauptsächlich über sequenzspezifische Transkriptionsfaktoren reguliert wird, besteht zwischen den verschiedenen Stressgenprogrammen eine Verbindung auf genetischer Ebene. Dies trifft jedoch nicht für den Hitzeschock und die Akutphasereaktion zu [7]. Interessanterweise vermindert ein vorausgegangener Hitzeschock die Lungenschädigung und die Mortalität nach Induktion einer Sepsis an der Ratte [30]. Endotoxingabe führt ihrerseits zu einer Hitzeschockreaktion. Im Rahmen dieser stressinduzierten Hitzeschockreaktion kommt es neben anderen Veränderungen zur Expression der Hämoxxygenase 1, dem Hitzeschockprotein 32. Die Hämoxxygenase induziert über die Bildung von Kohlen-

monoxid eine Erhöhung des second messengers cGMP, der die Gefäßmuskelzellen relaxiert. Die Aktivierung dieser Stressreaktion stellt somit einen alternativen Weg zum Stickstoffmonoxid-Synthesystem dar, das über die Produktion von NO intrazelluläres cGMP erhöht. NO scheint nach neuesten Erkenntnissen durch die Inhibition der Zytochrom-c-Oxidase der Atmungskette unter Stressbedingungen protektiv auf die Aufrechterhaltung des mitochondrialen Membranpotentials und damit antiapoptotisch zu wirken [3]. Durch die kompetitiven Effekte von NO und Sauerstoff (O₂) in den Mitochondrien wird diesen Organellen eine führende Rolle als zellulärer O₂-Sensor zugesprochen.

Relativ früh reagieren die Mitochondrien auf Hitzeschock und oxidativen Stress mit Veränderung ihrer Membranintegrität, Schwellung und Verlust von Zytochrom c in das Zytoplasma. Diese Beobachtungen an Mitochondrien deuten darauf hin, dass diese Organellen als guter Indikator für Zellstress dienen. Die Auswirkungen von Hitzeschock auf zelluläre und subzelluläre Strukturen unter In-vivo-Beobachtung von Zellkulturen wurden von unserer Arbeitsgruppe mittels Vitalmikroskopie analysiert und die physiologischen, histochemischen und in vivo sichtbaren Parameter quantifiziert (Abb. 6) [12]. In diesen Studien konnten wir erstmals zeigen, dass sich die Mitochondrienform von der normalerweise dünnen, länglichen in eine ovale Form mit gelegentlichen Ein-

schnürungen änderte [13]. Bei starkem Hitzeschock traten vermehrt Schwellungen der Mitochondrien mit Verlust der Leistungsfähigkeit der Atmungskette (mitochondriales Potenzial) auf (Abb. 7). Irreversible Formveränderungen der Mitochondrien stellten sich als Ringform dar. Inkorporiertes Membranmaterial deutet darauf hin, dass Teile der Mitochondrien sich mit Lysosomen verbinden und vermutlich abgebaut werden. Biochemisch wurde nach Hitzeschock bzw. Zellstress die Produktion von Mitochondrien-spezifischen HS-Proteinen nachgewiesen. In den Anfangsstadien sind die geschilderten Veränderungen noch reversibel. Sind die genetischen und metabolischen Adaptationsmechanismen im Vergleich zum Zellstress inadäquat, kommt es in Abhängigkeit von Zelltyp und Schädigungsmechanismus zu Zelluntergang durch Apoptose bzw. Nekrose. Beide Formen des Zelltods sind morphologisch durch Zellschwellung charakterisiert [15, 24], wobei es im Endstadium der Apoptose zusätzlich zu einer Fragmentierung des Kerns kommt (Abb. 2). Während zytoplasmatische Blebs, Kondensierung des Kernchromatins, Dilatation des endoplasmatischen Retikulums und Schwellung der Mitochondrien reversible Veränderungen nach Zellschädigung darstellen, sind irreversible Zellschäden durch die Beeinträchtigung der Membranintegrität mit Verlust der Barrierefunktion und Zusammenbruch des Membranpotentials, der Aktivierung der Caspasekaskade

und durch Kalzifikationen in den Mitochondrien charakterisiert.

Ein Stressor, der sich in seiner Wirkung von subzellulären Strukturen bis hin zu Organen und zum Gesamtorganismus verfolgen lässt, ist die *mechanische Dehnung*. Dieser Reiz verändert zunächst die Konfiguration der Zellmembran und die Anordnung der Zellhaften [10, 27]. Darüber hinaus können die Zellhaften und feine vesikelartige Membraneinstülpungen (Caveolen) über Phosphorylierung und p38-MAP-Kinase Signalkaskaden aktivieren. In Korrelation mit den Zellhaften ändert sich auch das Zytoskelett. Über De/Phosphorylierung von Paxilin über Moesin [23], Ezrin [14] und Dynamin [24] wird das Aktinzytoskelett modifiziert, wobei die gesamte Zellform und das Zytoskelett der neuen Situation angepasst werden. Gleichzeitig wird bei einem bestimmten Verlauf von Druck- und Zuglinien (z. B. bei Vorliegen eines Druckgefälles) die Zelle mitogen aktiviert. So entstehen z. B. bei einer Monolayerkultur von Endothelzellen dann reaktiv mehrere Zelllagen [32]. Über MAP-Kinasen, Leukotrienbildung und Tyrosinphosphorylierung vermittelt, wird die vermehrte Produktion von extrazellulärem Material angestoßen, wie z. B. Elastin oder Typ-II-Kollagen [5]. Dies führt im Gewebe z. B. zu Gefäßwandverdickungen und zur Verstärkung der Basalmembranen. So kommt es in der Mikrozirkulationsstrecke aber auch in den größeren Gefäßen zu einer

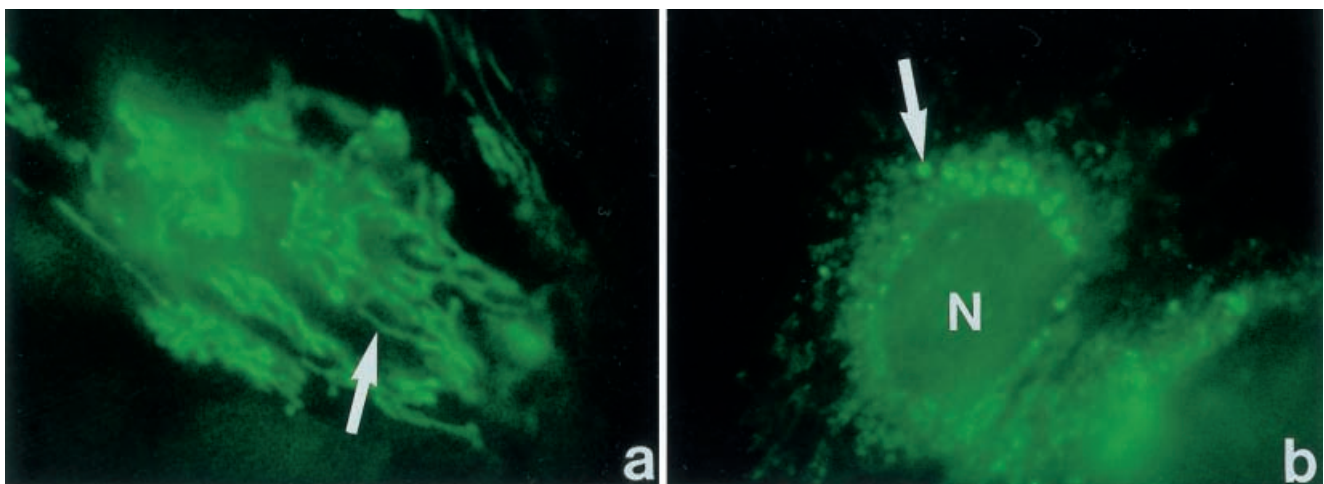


Abb. 6 ▲ Verhalten der Mitochondrien in retinalen Zellen (Einzelzellen einer Zelllinie, R28) vor (a) und nach Zellstress (Hitzeschock 37>43°C; b). Man beachte die Formveränderung der Mitochondrien (länglich wurmartig markiert durch Pfeil in a bzw. kurz kugelig entsprechend Pfeil in (b) und das Heranrücken der Organellen an den Zellkern (N) in (b)

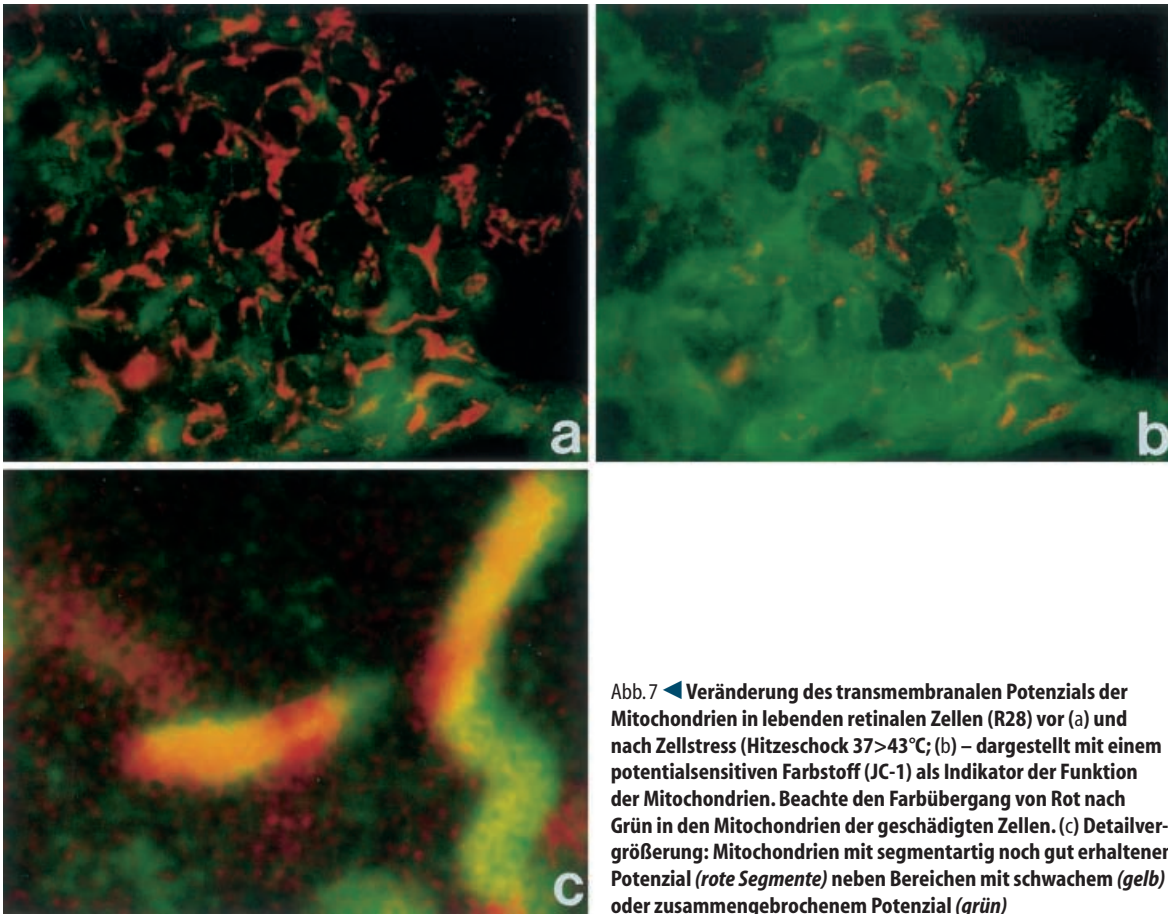


Abb. 7 ◀ **Veränderung des transmembranalen Potentials der Mitochondrien in lebenden retinalen Zellen (R28) vor (a) und nach Zellstress (Hitzeschock 37>43°C; (b) – dargestellt mit einem potentialsensitiven Farbstoff (JC-1) als Indikator der Funktion der Mitochondrien. Beachte den Farbübergang von Rot nach Grün in den Mitochondrien der geschädigten Zellen. (c) Detailvergrößerung: Mitochondrien mit segmentartig noch gut erhaltenem Potenzial (rote Segmente) neben Bereichen mit schwachem (gelb) oder zusammengebrochenem Potenzial (grün)**

Versteifung der Wandstrukturen, die den allgemeinen Blutdruck anhebt.

Distension des Lungengewebes bei Überdruckbeatmung im Sinne eines Volu- bzw. Barotraumas kann über solche Mechanismen auch die inflammatorische Reaktion perpetuieren [6, 33] und schließlich zu einer reaktiven Versteifung und Fibrosierung führen. Erst in jüngster Zeit haben experimentelle Studien auf die pathogenetische Bedeutung der Überdruckbeatmung bei der Entwicklung des Organversagens, die als so genannte Ventilator-induzierte Lungenschädigung bezeichnet wird, hingewiesen [28, 29]. So führen hohe Beatmungsdrücke und Überdehnung der Alveolen insbesondere durch die auftretenden Scherkräfte bei der zyklischen Expansion mit folgender Retraktion zur Aktivierung von Effektorzellen mit der Freisetzung von inflammatorischen und proapoptotischen Zytokinen und zu strukturellen Schäden der alveolokapillären Membran [31]. Diese Befunde wurden durch klinische Studien unterstützt. So konnten Ranieri et al. [26] erstmals in einer randomisierten kontrollierten Studie

bei ARDS-Patienten zeigen, dass unter konventioneller Beatmung mit Atemzugvolumina von 10–12 ml/kg Körpergewicht (KG) erhöhte lokale und systemische Zytokinkonzentrationen (IL-1b, TNF α , IL-6) auftraten, die mit der Schwere des Organversagens korrelierten. Im Vergleich dazu war bei Patienten, die mit reduzierten Tidalvolumina (6 ml/kgKG) und niedrigen Plateaudrücken beatmet wurden (so genannte protektive Ventilation) bei besserer Lungenfunktion die Zytokinsynthese signifikant reduziert. Diese Erkenntnisse einer verminderten Zytokinsynthese und einer Reduktion der Mortalität durch protektive Ventilation wurden durch die Interimsanalyse der ARDS-Network Study nach Einschluss von 861 ARDS Patienten bestätigt [2] und haben Eingang in die jüngsten Empfehlungen der Konsensuskonferenz zur mechanischen Ventilation gefunden [17].

In den letzten Jahren richtet sich das Hauptforschungsinteresse auf die organspezifischen intrazellulären Stressreaktionen als mögliche Pathomechanismen des Organversagens.

Fazit für die Praxis

Zusammenfassend scheinen verschiedene Stressgenprogramme abhängig von Zelltyp und Art der Schädigung zur Zytoprotektion aktiviert zu werden, die jedoch bei fulminanter oder protrahierter Stimulation Apoptose bzw. Nekrose induzieren. Pharmakologische Interventionen, die modulierend in die Apoptosekaskade eingreifen, wie z. B. Antioxidanzien, Anti-TNF-Antikörper oder Steroidantagonisten weisen auf therapeutische Optionen hin. In Abb. 8 sind die z. Z. bekannten Apoptose-induzierenden Faktoren bei der Entwicklung der Organdysfunktion zusammengefasst. Das Verständnis der zellulären und subzellulären Mechanismen, die über die Zelldysfunktion letztendlich zum Organversagen führen, sind die Basis für die Entwicklung zukünftiger (gen)therapeutischer Strategien zur Prävention des multiplen Organversagens. Hierzu sind weitere Studien zur Analyse der Reaktionsmuster in Abhängigkeit von der Schädigung, der zeitlichen Sequenz und der komplexen Interaktionen auf zellulärer und subzellulärer Ebene erforderlich, um gezielt pharmakologisch in die intrazelluläre Stressantwort eingreifen zu können.

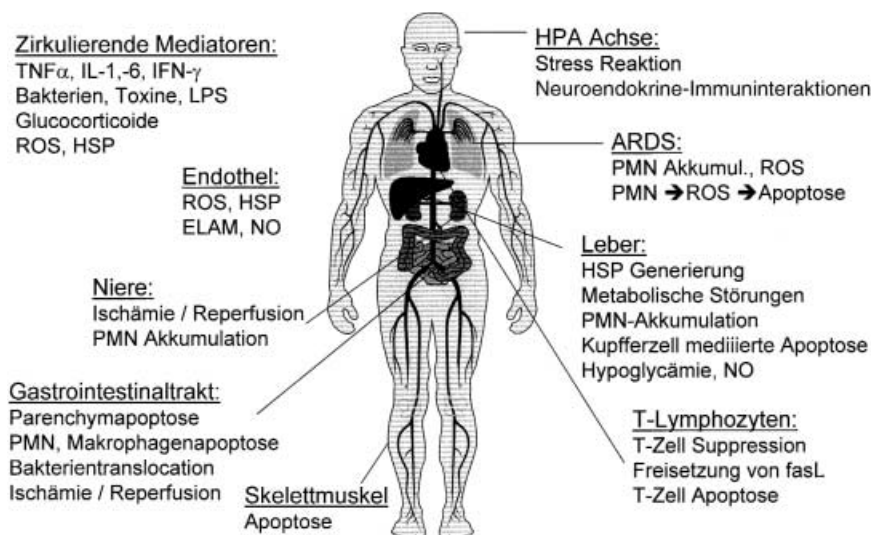


Abb. 8 ▲ **Modifizierte schematische Darstellung der Apoptose-induzierenden Faktoren bei der Entwicklung des Organversagens nach [24]. HPA Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren; IFN Interferon; IL Interleukin; HSP Hitzeschockprotein; NO Stickstoffmonoxid; PMN polymorphe neutrophile Granulozyten; ROS reaktive Sauerstoffspezies; TNF Tumornekrosefaktor**

Zur Prävention und frühzeitigen therapeutischen Intervention sind daher neue diagnostische Verfahren von Interesse, die eine Früherkennung solcher sich auf zellulärer Ebene anbahnenden Schäden ermöglichen. Hierzu eignen sich vorzugsweise fiberoptische Methoden, die den zellulären bzw. mitochondrialen Energiestatus und die geschilderten Veränderungen auf zellulärer und subzellulärer Ebenen mit Hilfe spektroskopischer Methoden (z. B. Absorptions-, Fluoreszenz-, Phosphoreszenz-, Raman-Spektroskopie) erfassen können [16, 18, 21]. Dadurch könnte in Zukunft ein On-line-Monitoring der bioenergetischen Prozesse zur frühen Diagnostik und Verlaufsbeobachtung von zellulärer und subzellulärer Dysfunktion zur Verfügung stehen.

Danksagung. Die vitalmikroskopischen Untersuchungen zum Hitzeschock wurden durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (FU 220/2-7) gefördert.

Literatur

1. Abraham E (1999) Why immunomodulatory therapies have not worked in sepsis. *Intensive Care Med* 25:556–566
2. Acute Respiratory Distress Syndrome Network (2000) Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 342:1301–1308
3. Beltran B, Mathur A, Duchon MR, Erusalimsky JD, Moncada S (2000) The effect of nitric oxide on cell respiration. A key to understanding its role in cell survival or death. *Proc Natl Acad Sci* 97 (26): 14602–14607

4. Bertges DJ, Fink MP, Delude RL (2000) Hypoxic signal transduction in critical illness. *Crit Care Med [Suppl]* 28:N78–N86
5. Breen EC (2000) Mechanical strain increases type I collagen expression in pulmonary fibroblasts in vitro. *J Appl Physiol* 88:203–209
6. Broccard AF, Hotchkiss JR, Suzuki S, Olson D, Marini JJ (1999) Effects of mean airway pressure and tidal excursion on lung injury induced by mechanical ventilation in an isolated perfused rabbit model. *Crit Care Med* 27:1533–1541
7. Buchman TG (1994) Manipulation of stress gene expression: a novel therapy for the treatment of sepsis? *Crit Care Med* 22:901–903
8. Cobb JP, Hotchkiss RS, Karl IE, Buchman TG (1996) Mechanisms of cell injury and death. *Br J Anaesth* 77:3–10
9. De Maio A (1999) Heat shock proteins: facts, thought, and dreams. *Shock* 11:1–12
10. Dieterich P, Odenthal-Schnittler M, Mrowietz C, Kramer M, Sasse L, Oberleithner H, Schnittler HJ (2000) Quantitative morphodynamics of endothelial cells within confluent cultures in response to fluid shear stress. *Biophys J* 79:1285–1297
11. Dykens JA (1997) Mitochondrial free radical production and oxidative pathophysiology. In: Beal MF, Howell N (eds) *Mitochondria and free radicals in neurodegenerative diseases*. Wiley-Liss, New York, pp 29–55
12. Funk RH, Hoper J, Dramm P, Hofer A (1998) Electronic light microscopy combined with spectrophotometry allows real-time analysis of structures at the subcellular level. *Physiol Meas* 19:225–233
13. Funk RH, Nagel F, Wonka F, Krinke HE, Gölfert F, Hofer A (1999) Effects of heat shock on the functional morphology of cell organelles observed by video-enhanced microscopy. *Anat Rec* 255:458–464
14. Geiger KD, Stoldt P, Schlote W, Derouiche A (2000) Ezrin immunoreactivity is associated with increasing malignancy of astrocytic tumors but is absent in oligodendrogliomas. *Am J Pathol* 157:1785–1793

15. Hotchkiss RS, Swanson PE, Freeman BD, Tinsley KW, Cobb JP, Matuschak GM, Buchman TG, Karl IE (1999) Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit Care Med* 27:1230–1251
16. Ince C, Sinaasappel M (1999) Microcirculatory oxygenation and shunting in sepsis and shock. *Crit Care Med* 27:793–800
17. International Consensus Conference in intensive care medicine (1999) Ventilator-associated lung injury in ARDS. *Intensive Care Med* 25:1444–1452
18. Jaross W, Neumeister V, Lattke P, Schuh D (1999) Determination of cholesterol in atherosclerotic plaques using near infrared diffuse reflection spectroscopy. *Atherosclerosis* 147:327–337
19. Khoury J, Langleben D (1998) Effects of endotoxin on lung pericytes in vitro. *Microvasc Res* 56:71–84
20. Koch T, Heller S (1996) Sepsis/SIRS: Pathomechanismen und therapeutische Ansätze. *Anesthesiol Intensivmed* 37: 386–403
21. Koch T, Geiger S, Ragaller MJR (2001) Monitoring of organ dysfunction in sepsis/systemic inflammatory response syndrome: Novel strategies. *J Am Soc Nephrol* (in press)
22. Kristal BS, Yu BP (1992) An emerging hypothesis: synergistic induction of aging by free radicals and Maillard reactions. *J Gerontol* 47:107–114
23. Litman P, Amieva MR, Furthmayr H (2000) Imaging of dynamic changes of the actin cytoskeleton in microextensions of live NIH3T3 cells with a GFP fusion of the F-actin binding domain of moesin. *BMC Cell Biol* 1:1
24. McNiven MA, Kim L, Krueger EW, Orth JD, Cao H, Wong TW (2000) Regulated interactions between dynamin and the actin-binding protein cactin modulate cell shape. *J Cell Biol* 151:187–198
25. Papathanassoglou EDE, Mynihan JA, Ackerman MH (2000) Does programmed cell death (apoptosis) play a role in the development of multiple organ dysfunction in critically ill patients? A review and theoretical framework. *Crit Care Med* 28:537–549
26. Ranieri VM, Giunta F, Suter PM, Slutsky AS (2000) Mechanical ventilation as a mediator of multisystem organ failure in acute respiratory distress syndrome. *JAMA* 284:43–44
27. Seebach J, Dieterich P, Luo F, Schillers H, Vestweber D, Oberleithner H, Galla HJ, Schnittler HJ (2000) Endothelial barrier function under laminar fluid shear stress. *Lab Invest* 80:1819–1831
28. Slutsky AS (1999) Lung injury caused by mechanical ventilation. *Chest* 116:9–15
29. Tremblay LN, Slutsky AS (1998) Ventilator-induced injury: from barotrauma to biotrauma. *Proc Assoc Am Physicians* 110:482–488
30. Villar J, Ribeiro S, Mullen JBM, Kuliszewski M, Post M, Slutsky AS (1994) Induction of the heat shock response reduces mortality rate and organ damage in a sepsis-induced acute lung injury model. *Crit Care Med* 22:914–921
31. Vlahakis NE, Schroeder MA, Limper AH, Hubmayr RD (1999) Stretch induces cytokine release by alveolar epithelial cell in vitro. *Am J Physiol* 277:167–172
32. Wang D, Donner DB, Warren RS (2000) Homeostatic modulation of cell surface KDR and Flt1 expression and expression of the vascular endothelial cell growth factor (VEGF) receptor mRNAs by VEGF. *J Biol Chem* 26; 275 (21):15905–15911
33. Zhang H, Ranieri VM, Slutsky AS (2000) Cellular effects of ventilator-induced lung injury. *Curr Opin Crit Care* 6:71–74