

Aus der
Chirurgischen Klinik und Poliklinik Großhadern
Direktor: Prof. Dr. K.-W. Jauch
(Ehemaliger Direktor: Prof. Dr. Dr. h. c. F. W. Schildberg)
und dem
Institut für Chirurgische Forschung
Direktor: Prof. Dr. A. Baethmann
(Ehemaliger Direktor: Prof. Dr. Dr. h. c. mult. K. Meißner)
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Frühe Ischämie- / Reperfusionsschäden in Fettlebern
und deren Protektion durch Zufuhr eines endogenen Antioxidans:
Glutathion**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Tobias Pfleiderer

aus
Freilassing

2003

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:

Prof. Dr. K.-W. Jauch

Mitberichterstatter:

Prof. Dr. B. F. Becker

Prof. Dr. A. L. Gerbes

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

PD Dr. med. R. Schauer

Dekan:

Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung:

06.11.2003

INHALTSVERZEICHNIS

I. Einleitung	1
1.1 Die Bedeutung des Ischämie- / Reperfusionsschadens in der Leberchirurgie	1
1.1.1 Ischämieschäden der Leber	2
1.1.2 Reperfusionsschäden der Leber	3
1.1.3 Die Bedeutung von reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS)	5
1.1.4 Glutathion: Metabolismus und antioxidative Mechanismen	8
1.2 Leberchirurgie bei vorgeschädigten (steatotischen) Lebern	11
II. Fragestellung	14
III. Material und Methoden	15
3.1 Tiermodell	15
3.1.1 Versuchstiere und Beurteilung des Verfettungsgrades	15
3.1.2 Tierhaltung	15
3.2 Präparation	16
3.2.1 Chirurgische Präparation und Narkose	16
3.2.2 Postischämische Behandlung mit Glutathion	19
3.3 Parameter und Messmethoden	20
3.3.1 Systemische Hämodynamik	20
3.3.2 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie (IVM): Beurteilung der hepatischen Mikrozirkulation	20
3.3.2.1 Beurteilung der sinusoidalen Perfusion und der Leukozyten-Adhärenz in normalen und verfetteten Lebern	21

3.3.2.2 Bestimmung der midzonalen Sinusoidweiten	24
3.3.2.3 Bestimmung der Funktion von Kupffer-Zellen (KC)	24
3.3.3 Bewertung der hepatozellulären Integrität	26
3.3.3.1 Leberenzyme	26
3.3.3.2 Lichtmikroskopische Untersuchungen	26
3.3.3.3 Elektronenmikroskopische Untersuchungen	27
3.3.4 Bestimmung der postischämischen Leberfunktion: Gallefluss	28
3.3.5 Bestimmung des Gesamt-Glutathion-Gehaltes, GSH und GSSG im Plasma	28
3.3.5.1 Bestimmung des Gesamt-Glutathion-Gehaltes	28
3.3.5.2 Bestimmung von Glutathiondisulfid (GSSG)	29
3.3.5.3 Bestimmung des reduzierten Glutathions (GSH)	30
3.3.6 Bestimmung des intrazellulären Gesamt-Glutathion-Gehaltes	30
3.4 Versuchsgruppen	31
3.5 Versuchsprotokoll	32
3.6 Statistische Analyse	34
IV. Ergebnisse	35
4.1 Charakterisierung des Modells der moderat verfetteten Rattenleber	35
4.1.1 Leberenzyme – Die Bestimmung der Alanin-Aminotransferase (ALT)	35
4.1.2 Ergebnisse der Lichtmikroskopie	36
4.1.3 Ergebnisse der Elektronenmikroskopie	39
4.2 Protektive Effekte von GSH in normalen und verfetteten Lebern	42
4.2.1 Hepatische Mikrozirkulation	42
4.2.1.1 Sinusoidale Perfusionsrate	42
4.2.1.2 Lobuläre Leukozyten-Adhärenz	46

4.2.1.3 Leukozyten-Adhärenz in postsinusoidalen Venolen (PSV)	48
4.2.1.3.1 Permanente Leukozyten-Adhärenz in PSV („Sticker“)	48
4.2.1.3.2 Temporäre Leukozyten-Adhärenz in PSV („Roller“)	50
4.2.1.3.3 Bestimmung des Verhältnisses von Stickern zu Rollern in PSV	52
4.2.1.4 Einfluss von I / R und GSH auf die Sinusoidweite	54
4.2.1.5 Postischämische Phagozytose-Aktivität der Kupffer-Zellen (KC)	56
4.3 Einfluss von GSH auf parenchymale und nicht-parenchymale Schäden normaler und verfetteter Lebern	58
4.3.1 Bestimmung der Alanin-Aminotransferase (ALT)	58
4.3.2 Ergebnisse der Elektronenmikroskopie	60
4.4 Einfluss von GSH auf die Leberfunktion: der Gallefluss	63
4.5 Antioxidativer Stress nach Ischämie / Reperfusion: Einfluss der intravenösen GSH-Therapie	68
4.6 Der intrazelluläre Gesamt-Glutathion-Gehalt	71
V. Diskussion	73
5.1 Modelle der Fettleberinduktion	74
5.2 Chirurgische Präparation	78
5.3 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie (IVM)	79
5.4 Aggravation von Ischämie-/Reperfusionsschäden in vorgeschädigten Lebern	81
5.4.1 Überblick über aktuelle Forschungsberichte	81
5.4.2 Charakterisierung des eigenen Modells der moderat verfetteten Rattenleber	85

5.4.2.1 Hepatozelluläre Integrität	85
5.4.2.2 Hepatozelluläre Funktion – Der Gallefluss	88
5.4.2.3 Ergebnisse der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie (IVM)	89
5.4.3 Die Bedeutung von ROS bei Ischämie / Reperfusion der Leber	97
5.4.3.1 Derzeitiger Forschungsstand	97
5.4.3.2 Die Bedeutung von ROS bei I / R in verfetteten Lebern	100
5.5 GSH-vermittelte Protektion nach Ischämie / Reperfusion in normalen und verfetteten Lebern	101
5.5.1 Prävention hepatischer IRS durch Glutathion	101
5.5.2 Zytoprotektion durch GSH in normalen und verfetteten Lebern	104
5.5.3 Einfluss von GSH auf die Mikrozirkulation normaler und verfetteter Lebern	106
5.5.4 Der Einfluss von GSH auf die intra- und extrazellulären GSH- und GSSG-Konzentrationen – Beurteilung des oxidativen Stresses	109
VI. Zusammenfassung	114
VII. Literaturverzeichnis	118
VIII. Abkürzungen	139
IX. Anerkennung und Dank	142
X. Lebenslauf	144

I. EINLEITUNG

1.1 DIE BEDEUTUNG DES ISCHÄMIE- / REPERFUSIONSSCHADENS IN DER LEBERCHIRURGIE

Ischämie- / Reperfusionsschäden (IRS) stellen pathophysiologische Veränderungen dar, die sich nach passagerer Unterbrechung der Blutzufuhr und darauffolgender Wiederdurchblutung sowohl am betroffenen Organ selbst – hier am Beispiel der Leber – als auch in Form von organfernen, systemischen Veränderungen – z. B. als tubuläre Nekrose der Niere (Selzner M, 2000a) – manifestieren können.

Hepatische IRS können bereits durch kardiopulmonale Erkrankungen, durch eine Verlegung der vaskulären Strombahn sowie durch verschiedene Schockformen als Folge einer Hypoperfusion bzw. Hypoxie indirekt hervorgerufen werden. Bei der Versorgung traumatischer Leberrupturen sowie bei Leberresektionen mit dem Ziel der Entfernung von Metastasen oder eines Primärtumors wird der arterielle und portale Blutzufuhr der Leber passager unterbrochen. Dieses sog. Pringle-Manöver (Pringle J, 1908) wird als Standardverfahren bei Leberresektionen zur Vermeidung von größeren Blutverlusten angesehen. Hepatische IRS entstehen bei diesem Verfahren direkt. Man spricht von einer sog. „warmen“ Ischämiephase. Lebern, die zum Zwecke einer orthotopen Lebertransplantation (Ltx) dem Spender entnommen und bis zur Implantation in einer Konservierungslösung aufbewahrt werden, müssen einer sog. „kalten“ Ischämiephase ausgesetzt werden.

Dabei wurde bereits frühzeitig erkannt, dass Ischämieschäden auf der einen und Reperfusionsschäden auf der anderen Seite als unterschiedliche und eigene Formen der Organschädigung anzusehen sind. Zwar sind Veränderungen der Zellen während der Ischämie Voraussetzung für die Entwicklung eines Reperfusionsschadens. Dennoch werden in der Reperfusion zusätzliche Schäden induziert (Flaherty JL, 1988).

1.1.1 Ischämieschäden der Leber

Die Durchführung des Pringle-Manövers bei Leberresektionen beinhaltet die temporäre Abklemmung der im Ligamentum hepatoduodenale verlaufenden Strukturen – Vena portae, Arteria hepatica propria, Ductus choledochus – und bewirkt neben der Vermeidung von größeren Blutverlusten während des operativen Eingriffs eine Ischämie der Leber. Dabei bewirkt eine Ischämiezeit von bis zu 60 Minuten keine signifikante Zunahme der postoperativen Leberdysfunktion (Feliciano DV, 1986). Der Mangel an Sauerstoff während der Ischämie führt zunächst dazu, dass die mitochondriale Atmungskette (Zytochrom-c-Oxidase-Komplex) in den Leberzellen unterbrochen wird und eine ausreichende oxidative Phosphorylierung zur ATP-Synthese nicht mehr gewährleistet werden kann. Die konsekutive ATP-Depletierung resultiert in einem Zusammenbruch der energieabhängigen Carriersysteme. Störungen der intrazellulären Ionen-Homöostase sind die Folge.

In isolierten Hepatozyten konnte während der Hypoxie ein Anstieg der zytosolischen Na^+ -, Ca^{2+} - und H^+ -Konzentrationen sowie ein Abfall der K^+ -Konzentration festgestellt werden (Brecht M, 1994). Der Anstieg der intrazellulären Na^+ -Konzentration ist dabei als Hauptfaktor für die Entstehung einer Zellschwellung anzusehen, welche die Funktion der Hepatozyten stark beeinträchtigen kann (Häussinger D, 1996). Durch eine erhöhte zytosolische Ca^{2+} -Konzentration während der Ischämie werden verschiedenste Endonukleasen, Phospholipasen (Chien KR, 1978) und Proteasen (Bronk SF, 1993) – wie z. B. Calpaine – aktiviert. Endonukleasen tragen zum Abbau von rRNS und tRNS bei und beeinträchtigen somit entscheidend die Proteinsynthese. Ca^{2+} -abhängige Phospholipasen führen zu einer Störung der Zellintegrität durch einen vermehrten Abbau von Phospholipiden in den Zellmembranen, während Ca^{2+} -abhängige Proteasen (Calpaine) eine wichtige Stellung bei apoptotischen Prozessen in der Zelle während Ischämie und Reperfusion der Leber einnehmen (Kohli V, 1999) und darüber hinaus zur Ablösung von sinusoidalen Endothelzellen von der perisinusoidalen Matrix beitragen können (Clavien PA, 1998).

1.1.2 Reperfusionsschäden der Leber

Mit Hilfe intravitalmikroskopischer Untersuchungen der Leber konnten postischämisch auf mikrozirkulatorischer Ebene zwei wesentliche Phänomene beobachtet werden, die hepatische Reperfusionsschäden charakterisieren:

Das sog. „no-reflow“-Phänomen beschreibt das Sistieren des Blutflusses in einzelnen Sinusoiden nach ausreichend langen Ischämie- und Reperusionsphasen (Menger MD, 1991; Vollmar B, 1994a). Das Ausmaß des sinusoidalen Perfusionsversagens ist dabei abhängig von der Dauer der Ischämiephase und führt infolge der Verlängerung hypoxischer Bedingungen während der Ischämie zu einer weiteren Verschlechterung der Gewebeoxygenierung und zu einem zunehmenden Verlust der hepatozellulären Integrität und Funktion (Menger MD, 1999). Unterschiedliche Pathomechanismen werden für die Entstehung des „no-reflow“-Phänomens verantwortlich gemacht: Zellschwellungen des sinusoidalen Endothels (Vollmar B, 1994a), intravaskuläre Hämokonzentration (Menger MD, 1988) oder eine Imbalance zwischen Vasokonstriktoren (z. B. Endothelin) und Vasodilatoren (z. B. Stickstoffmonoxid, NO), die bei Ischämie und Reperfusion aus verschiedenen, aktivierten Zellen sezerniert werden (Nakamura S, 1995; Clemens MG, 1997), sind maßgeblich an der Entstehung des „no-reflow“-Phänomens beteiligt. Dagegen behindern am Sinusendothel adhärente Leukozyten zwar den sinusoidalen Blutfluss und reduzieren dessen Geschwindigkeit. Sie müssen jedoch nicht zwingend mit einer Unterbrechung desselben assoziiert sein (Vollmar B, 1996).

Das sog. „reflow-paradox“ stellt das zweite Phänomen dar, das mittels Intravitalmikroskopie während der Reperfusion beobachtet wird (Menger MD, 1991). Hier kommt es in zuvor ischämischen Gewebearealen während der Wiederdurchblutung und konsekutiver Oxygenierung zu zusätzlichen Schäden, die in ihrer Gesamtheit als Ischämie- / Reperfusionsschäden (IRS) bezeichnet werden (Menger MD, 1999). Von Jaeschke et al. (Jaeschke H, 1988; Jaeschke H, 1991a; Jaeschke H, 1991b) wurden zwei zeitlich aufeinanderfolgende Phasen des hepatischen Reperfusionsschadens beschrieben, deren pathophysiologische Vorgänge gerade für das „reflow-paradox“-Phänomen von Bedeutung sind:

Frühe Reperfusionsschäden während der ersten sechs Stunden Reperfusion werden in erster Linie durch die Aktivierung von Kupffer-Zellen (KC) charakterisiert (Jaeschke H, 1991a). KC werden durch reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS), Komplement (Jaeschke H, 1993a), Spaltprodukte der Lipidperoxidation und durch andere proinflammatorische Zytokine aktiviert und damit zur Produktion und Freisetzung einer Vielzahl von Entzündungsmediatoren und parakrinen Substanzen angeregt. Als wesentlicher Mediator dieser frühen Leberschädigung wurden dabei ROS, wie z. B. Superoxidanion-Radikale ($O_2^{\cdot-}$) oder Wasserstoffperoxid (H_2O_2), identifiziert. KC wurden dabei als Hauptquelle dieser ROS in der frühen Reperusionsphase beschrieben (Jaeschke H, 1991a). Aber auch andere für IRS wichtige proinflammatorische Zytokine (z. B. $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-6$, $LT-B_4$ oder der Plättchen-aktivierende Faktor PAF) sowie proteolytische Enzyme werden durch KC sezerniert (Wanner GA, 1996). Diese ROS und Zytokine – unter ihnen an erster Stelle $TNF-\alpha$ – induzieren wiederum die Expression von Adhäsionsmolekülen an Endothelzellen und Neutrophilen (Martinez-Mier G, 2000) und führen zur Produktion und Freisetzung von „Lockstoffen“ für Leukozyten, sog. CXC-Chemokinen, wie z. B. $IL-8$ (Luster AD, 1998). Die Folge ist eine massive Rekrutierung von Leukozyten während der frühen Reperusionsphase, die dann das Ausmaß später Reperfusionsschäden maßgeblich mitbestimmen.

Leukozyten adhäreren dabei sowohl an venoläre als auch an sinusoidale Endothelzellen. Die Adhäsion am postsinusoidalen, venolären Endothel erfolgt in drei Schritten, die in intravitalmikroskopischen Untersuchungen differenziert werden konnten (Menger MD, 1992): Nach einer initialen lockeren Interaktion zwischen Endothel und Leukozyten („rolling“), kommt es zur Aktivierung und darauffolgenden, festen Bindung („sticking“) der Leukozyten sowie schließlich zu deren Emigration in das perivaskuläre Gewebe. „Rolling“ – definiert als Margination, Endothelkontakt und konsekutiv verminderter Fließgeschwindigkeit der Leukozyten gegenüber dem Zentralstrom – wird über Selektine (z. B. P-Selektin der Endothelzellen sowie L-Selektin der Leukozyten) vermittelt (Granger DN, 1994). Im Anschluss an die Aktivierung von Leukozyten und Endothelzellen durch verschiedene proinflammatorische Mediatoren (Springer TA, 1994) kommt es zu einer

permanenten Adhärenz („sticking“) von Leukozyten am postsinusoidalen, venolären Endothel, die über β_2 -Integrine der Leukozyten (z. B. LFA-1 und Mac-1) sowie über Adhäsionsmoleküle des venolären Endothels (z. B. ICAM-1) vermittelt wird (Jaeschke H, 1993b; Vollmar B, 1995). Die nun adhärenen Leukozyten verlassen unter Ausbildung von Pseudopodien und unter Umorganisation ihres Zytoskelettes sowie ihrer Membranfluidität das Gefäß und emigrieren schließlich in das umliegende Gewebe. Dieser Vorgang beinhaltet auch die Freisetzung von ROS und Proteasen (z. B. Elastase, Kollagenase, Heparanase, Kathepsin G) durch die aktivierten Leukozyten und führt konsekutiv zur Schädigung von Hepatozyten (Mavrier P, 1988). Im Gegensatz zur beschriebenen Adhärenz von Leukozyten am postsinusoidalen, venolären Endothel wird die Adhärenz an den Sinusoiden nicht durch Adhäsionsmoleküle mediiert. Es konnte gezeigt werden, dass sinusoidale Endothelzellen weder unter physiologischen Bedingungen noch nach Aktivierung P-Selektin an ihrer Zelloberfläche exprimieren (Steinhoff G, 1993). Für die sinusoidale Leukozytenadhärenz müssen daher andere Mechanismen verantwortlich sein, wie z. B. der physiologisch gewundene Aufbau der Sinusoide, Veränderungen hinsichtlich mikrovaskulärer Bedingungen sowie eine postischämische Schwellung von Hepatozyten und Endothelzellen (Komatsu H, 1990; Vollmar B, 1995).

1.1.3 Die Bedeutung von reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS)

ROS spielen bei der Genese früher und später Reperfusionsschäden eine entscheidende Rolle. Hinsichtlich ihres Produktionsortes müssen jedoch intrazelluläre von extrazellulären „ROS-Quellen“ unterschieden werden:

Aufgrund der intrazellulären ATP-Depletion fällt in Hepatozyten und Endothelzellen während der Ischämie vermehrt Hypoxanthin als Abbauprodukt energiereicher Phosphate an. Parallel dazu konvertieren proteolytische Enzyme das Enzym Xanthin-Dehydrogenase (XDH) zu Xanthin-Oxidase (XO) (Stirpe F, 1969), das während der Reperfusion unter Verbrauch von molekularem Sauerstoff das anfallende Hypoxanthin zu Urat oxidiert. Hierbei entstehen $O_2^{\cdot-}$ und H_2O_2 . In

Anwesenheit von Fe^{2+} - und Cu^+ -Ionen können dann aus diesen ROS die äußerst reaktiven und zytotoxischen Hydroxylradikale ($\text{HO}\cdot$) gebildet werden (Yu BP, 1994). Als weitere Quellen intrazellulärer ROS werden Entkopplungsvorgänge der mitochondrialen Atmungskette in Hepatozyten (Littauer A, 1992) sowie peroxisomale Vorgänge (Singh I, 1996) angenommen. Dennoch scheint eine intrazelluläre Produktion von ROS bei Ischämie / Reperfusion der Leber eine insgesamt eher untergeordnete Rolle zu spielen. Dies geht aus Untersuchungen hervor, die nach normothermer Ischämie / Reperfusion unveränderte hepatozelluläre Glutathiondisulfid (GSSG)-Gehalte zeigten (Metzger J, 1988). Bei einer vermehrten intrazellulären ROS-Produktion hätte eine Abnahme des wichtigsten endogenen Antioxidans von Zellen, Glutathion (GSH), erwartet werden müssen.

Für den extrazellulären, oxidativen Stress bei hepatischer Ischämie / Reperfusion werden im Wesentlichen drei Hauptfaktoren verantwortlich gemacht: In der frühen Reperfusionsphase wurden – wie bereits oben erwähnt – KC als die entscheidenden Produktionsstätten von ROS identifiziert. Dieser Befund wurde bei Ratten mit KC-depletierten Lebern nachgewiesen, in denen während der frühen Reperfusionsphase die plasmatischen GSSG-Konzentrationen als Parameter für den extrazellulären, oxidativen Stress drastisch reduziert werden konnten (Jaeschke H, 1991a). Kupfer-Zellen produzieren ROS durch Aktivierung des Enzyms NADPH-Oxidase, das aus inaktiven Untereinheiten sowohl an der Zellmembran als auch im Zytoplasma besteht und nach Stimulation der Zelle durch Translokation der zytoplasmatischen Komponente an die der Zellmembran aktiviert wird (Lentsch A, 2000). Auch die am späteren Reperfusionsschaden beteiligten PMN besitzen dieses Enzym und setzen dadurch ebenfalls $\text{O}_2\cdot^-$ frei. Darüber hinaus sind PMN in der Lage, mit Hilfe des Enzyms Myeloperoxidase (MPO) hypohalide Säuren – wie HOCl – und aus diesen wiederum sog. Chloramine – NH_2Cl und TauNHCl – zu bilden. Gerade Letzteren konnten ausgeprägte hepatotoxische Eigenschaften zugeordnet werden (Bilzer M, 1991). Neben KC und PMN wird auch die Rolle von hepatozellulär sezernierter XO bei der Genese des extrazellulären, oxidativen Stresses diskutiert und neben $\text{TNF-}\alpha$ für „Fernwirkungen“ oxidativer Schäden (sog. „remote organ injury“) verantwortlich gemacht (Saugstad OD, 1988).

ROS können direkte und indirekte Mechanismen der Zellschädigung induzieren. Direkte, ROS-vermittelte Schäden beinhalten die Proteinoxidation, Lipidperoxidation sowie DNA-Schäden (Pardini RS, 1995). Diese direkten Formen der Zellschädigung scheinen allerdings erst bei extrem hohen ROS-Konzentrationen aufzutreten, wie sie bei Ischämie / Reperfusion der Leber in der Regel nicht erreicht werden. Dies wird durch eine nur geringe Bildung von Lipidperoxidationsprodukten bestätigt (Mathews WR, 1994).

Von größerer Bedeutung des durch ROS mediierten Reperfusionsschadens dürften indirekte Mechanismen sein: In verschiedenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass ROS die Sekretion von PAF (Zhou W, 1992), TNF- α und Interleukinen (Le Moine O, 1997) aus Endothelzellen und Monozyten aktivieren kann. Darüber hinaus konnte eine durch ROS induzierte Expression von Adhäsionsmolekülen, z. B. von GMP-140 (Patel KD, 1991) oder ICAM-1 (Fan C, 1999) an Endothelzellen, sowie eine Induktion der Chemokin-Produktion, insbesondere von CINC/gro (Konishi K, 1993; Ohtsuka T, 1996) beobachtet werden. Auch apoptotische Vorgänge scheinen durch ROS über Calpain-Aktivierung initiiert zu werden (Miyoshi H, 1996). Für einen Großteil dieser Mechanismen wird die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 durch intra- und extrazellulär entstandene ROS verantwortlich gemacht (Palmer HJ, 1997; Zwacka RM, 1998).

An das im Zytoplasma vorhandene NF- κ B sind inhibitorische Proteine der I κ B-Familie gebunden und verhindern so eine Translokation des Transkriptionsfaktors in den Nucleus. Zellaktivierung, z. B. durch ROS oder TNF- α , führt zu einer Phosphorylierung der I κ B-Proteine und deren Dissoziation vom NF- κ B-Komplex mit konsekutiver, nucleärer Translokation desselben und Aktivierung der Transkription von bestimmten Genen (Fan C, 1999). Hierzu zählen Gene verschiedenster proinflammatorischer Zytokine (z. B. PAF, TNF- α , Interleukine), CXC-Chemokine (IL-8-Familie) und Adhäsionsmoleküle. An dieser Stelle muss aber auch betont werden, dass der Transkriptionsfaktor NF- κ B hinsichtlich der exprimierten Gene eine duale Stellung einnimmt: Auf der einen Seite ist er zur Transkription der eben geschilderten proinflammatorischen Mediatoren befähigt, auf der anderen Seite wurde NF- κ B bei

Ltx-Modellen als wichtiger Mediator der Leberregeneration durch antiapoptotische Effekte beschrieben (Bradham CA, 1999).

Auch der Transkriptionsfaktor AP-1 wird u. a. durch ROS beeinflusst (Lakshminarayanan V, 1998). Hier kommt es durch eine kaskadenartige Phosphorylierung von bestimmten Kinasen (MEKK1, JNK, JunD) letztendlich zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1. Dies kann zum Einen wiederum in einer proinflammatorischen Antwort mit der Förderung von apoptotischen Prozessen (Colotta F, 1992) und einer herabgesetzten Zellproliferation resultieren; zum Anderen wurden im Zuge einer erhöhten AP-1-Aktivität auch protektive sowie regenerative Vorgänge an der Leber beobachtet (Westwick JK, 1995; Schlossberg H, 1996).

ROS stellen somit wichtige Signalmoleküle dar, die bei der Genese des hepatischen IRS für eine Vielzahl der zu beobachtenden Schäden verantwortlich sind. Die Entfernung dieser ROS ist daher Ziel eines kausalthérapeutischen Ansatzes und kann durch Zufuhr des endogenen Antioxidans Glutathion (GSH) erreicht werden.

1.1.4 Glutathion: Metabolismus und antioxidative Mechanismen

Die hepatozelluläre Synthese des Tripeptids γ -Glutamyl-Cysteinyl-Glycin bzw. Glutathion (GSH; s. Abb. 1.1) wird durch die Verfügbarkeit von Cystein limitiert. Hepatozyten besitzen jedoch zusätzlich die Fähigkeit, mittels Transsulfurierung Cystein aus Methionin zu synthetisieren (DeLeve LD, 1998). Cystein wird größtenteils zur Synthese von GSH verwendet, während ein geringerer Anteil in das Plasma sezerniert und dort zu Cystin bis zur Einstellung eines Gleichgewichtes oxidiert wird. Sowohl Cystein als auch Cystin stehen dann für die zelluläre GSH-Synthese zur Verfügung (Miura K, 1992). Hierdurch entstehen hepatozelluläre GSH-Konzentrationen von ca. 50 nmol / 10^6 Zellen, während sinusoidale Endothelzellen (ca. 0,5 nmol GSH / 10^6 Zellen) und Kupfer-Zellen (ca. 3 nmol GSH / 10^6 Zellen) wesentlich geringere intrazelluläre GSH-Konzentrationen aufweisen (DeLeve LD, 1998).

GSH-Konzentration im millimolaren Bereich erzielt werden (Garcia-Ruiz C, 1992). GSH ist als Cosubstrat der GSH-Peroxidase zur Reduktion des intrazellulär entstehenden H_2O_2 befähigt. Dabei entsteht aus zwei Molekülen reduzierten Glutathions (2 GSH) ein Molekül oxidiertes Glutathion (GSSG), das ebenfalls über Transportsysteme in die Galle und den Sinusoidalraum gelangt oder mit Hilfe der NADPH/ H^+ -abhängigen GSH-Reduktase wieder zu GSH reduziert wird.

Extrazellulär ist die Aktivität der GSH-Peroxidase sehr gering (Halliwell B, 1986 und 1990). Hier stehen andere antioxidative Mechanismen im Vordergrund, deren Effektivität jedoch stark von der niedrigen, extrazellulären GSH-Konzentration limitiert wird: Spontane, d. h. nicht-enzymatische Reaktionen des GSH mit H_2O_2 (Liu P, 1994), O_2^- , (Winterbourn CC, 1994), HOCl und Chloraminen (Bilzer M, 1991) spielen hier eine entscheidende Rolle. Dabei scheinen Chloramine durch GSH eher intrazellulär entgiftet zu werden, während der durch HOCl medierte Schaden durch GSH extrazellulär abgewendet wird (Bilzer M, 1991). Zusätzlich induziert GSH indirekt die hepatische GSH-Synthese über eine gesteigerte, renale Cystein-Produktion (Aebi S, 1992).

Zusammenfassend kann die geringe extrazelluläre GSH-Konzentration und die damit verbundene geringe antioxidative Kapazität im sinusoidalen Raum als wesentliches Kriterium bei der Prävention ROS-verursacher, hepatischer IRS angesehen werden. Unterschiedlichste therapeutische Modelle befassten sich daher mit der exogenen Zufuhr verschiedener Antioxidantien, wie z. B. Vitamin E, Desferrioxamin, SOD und Katalase, oder sog. GSH-Vorläufer, wie GSH-Ester und N-Acetylcystein (NAC) (Nagel E, 1997; Land W, 1994; Drugas GT, 1991; Yabe H, 1999; Kondo S, 1996; Demir S, 1998; Jaeschke H, 1991b). Diesen Modellen sind jedoch meist aufgrund drastischer Nebenwirkungen (GSH-Ester) oder aufgrund einer vorausgesetzten, intakten GSH-Synthese (GSH-Vorläufer) gerade im Falle eines hepatischen IRS Grenzen gesetzt. Darüber hinaus sind die hohen Kosten sowie die z. T. fehlende Verfügbarkeit der angesprochenen Antioxidantien nachteilig aufzufassen. Vor diesem Hintergrund ist eine therapeutische, intravenöse Zufuhr des (endogenen) GSH zu befürworten, zumal eine 200-fache Erhöhung der physiologischen, extrazellulären GSH-Konzentration keine toxischen Nebenwirkungen erzielte (Aebi S, 1991).

1.2 LEBERCHIRURGIE BEI VORGESCHÄDIGTEN (STEATOTISCHEN) LEBERN

Histopathologisch wird eine Leberzellverfettung, bei der weniger als 50 Prozent aller Hepatozyten betroffen sind, von einer Fettleber unterschieden, die durch eine mehr als 50prozentige Verfettung der Hepatozyten charakterisiert ist. D'Alessandro et al. schlugen eine differenziertere Einteilung der hepatozellulären Fettinfiltration in drei Schweregrade vor (D'Alessandro A, 1991) und definierten eine Verfettung von bis zu einem Drittel aller Hepatozyten als „leicht“, während eine Steatose von einschließlich einem Drittel bis zu zwei Dritteln des Leberparenchyms als „moderat“ und darüber hinaus als „schwer“ bezeichnet wurde. Die derzeit gebräuchliche Einteilung (Adam R, 1991; Cheng Y, 2001) orientiert sich an dieser Differenzierung und unterscheidet zwischen:

- leichter ($\leq 30\%$)
- moderater ($\leq 60\%$) und
- schwerer ($> 60\%$) Leberzellverfettung.

Ursächlich sind an der Entstehung einer Leberzellverfettung verschiedene Faktoren beteiligt: Vor allem Alkoholabusus, Diabetes mellitus und Adipositas, aber auch Alter sowie die Einnahme von bestimmten Medikamenten spielen hier eine entscheidende Rolle. Die anhand von Autopsien festgestellte Inzidenz einer solchen Fettinfiltration beträgt zwischen 6 und 11 Prozent (Hilden M, 1977; Underwood G, 1984). Hierbei konnte festgestellt werden, dass eine Verfettung (Steatose) der Leber mit einer erhöhten Mortalität und Komplikationsrate nach Resektion und Transplantation assoziiert ist, für die vor allem postoperativ auftretende, schwere Leberdysfunktionen bis hin zum Leberversagen verantwortlich sind. So beträgt die Mortalität nach Leberresektion im Falle moderater und schwerer Leberzellverfettung 14 Prozent (Behrns KE, 1998). Resektionen von Lebern ohne Fettinfiltration besitzen dagegen eine Mortalität von weniger als 2 Prozent (Fong Y, 1997; Selzner M, 1999). Darüber hinaus sind Lebern mit einer mehr als 30prozentigen Verfettung nicht für eine Ltx geeignet, da das Risiko eines primären Transplantatversagens drastisch zunimmt (Todo S, 1989; D'Alessandro A, 1991; Markin RS, 1993; Urena MA, 1999). Die Folge ist das Verwerfen von ca. 25 Prozent der angebotenen Spenderorgane.

Für die gefürchteten Komplikationen nach Resektion und Transplantation von Fettlebern werden besonders ausgeprägte IRS verantwortlich gemacht. In diesem Zusammenhang konnten bereits diverse pathophysiologische Unterschiede zwischen verfetteten und normalen Lebern identifiziert werden:

Massive Fetteinlagerungen führen zur Hepatozytenschwellung, zur Störung der sinusoidalen Mikroarchitektur und zu einer damit möglicherweise einhergehenden Verringerung des sinusoidalen Durchmessers (Ohhara K, 1989; Teramoto K, 1993a). Die Folge könnte dann eine Verlangsamung des sinusoidalen Blutflusses sowie eine insuffiziente Sauerstoffversorgung des Gewebes sein (Hayashi M, 1993). Außerdem konnte beim Transplantatversagen nach Ltx verfetteter Lebern mittels lichtmikroskopischer Untersuchungen eine direkte Verlegungen der Sinusoide durch „Fettpartikel“ nachgewiesen werden, die aus rupturierten Hepatozyten in den extrazellulären Raum eingeschwemmt worden waren (Todo S, 1989).

Vermutlich spielt die Freisetzung von ROS eine wesentliche Rolle bei der erhöhten Vulnerabilität steatotischer Lebern nach Ischämie / Reperfusion. Hinweise hierfür liefern eine Zunahme der Lipidperoxidation in fettinfiltrierten Lebern (D'Alessandro, 1991; Koneru B, 1995) sowie ein Anstieg von freien Fettsäuren, die im Verlauf der peroxisomalen β -Oxidation zur Quelle reaktiver Sauerstoff-Spezies (ROS) werden können (Osmundsen H, 1991). Eine häufig in steatotischen Lebern nachweisbare Erhöhung des intrazellulären Eisengehaltes wird für eine vermehrte, eisenabhängige Bildung reaktiver HO^\cdot verantwortlich gemacht (Day CP, 1998a). Darüber hinaus legen tierexperimentelle Studien eine erhöhte Anzahl und Aktivität von KC in diesen Lebern nahe (Teramoto K, 1993a), die ebenfalls zu einer Verstärkung des oxidativen Stresses nach Ischämie / Reperfusion beitragen können. Gao et al. erwähnen in einem Transplantationsmodell mit steatotischen Rattenlebern drei verschiedene ROS-Spezies, die unter Verwendung eines sog. „spin traps“ durch elektronenresonanzspektroskopische Untersuchungen identifiziert werden konnten. Während die absolute Menge dieser drei ROS-Spezies in normalen Kontrollebern nach Transplantation effektiv durch SOD / Katalase gesenkt werden konnte, erwiesen sich die ROS in steatotischen Lebern als resistent gegenüber dieser

antioxidativen Therapie (Gao W, 1995). Eine Zunahme von ROS beeinflusst auch ROS-abhängige Signalwege und aktiviert die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1. So konnte in alkoholisch induzierten Fettlebern eine erhöhte Aktivität von NF- κ B und eine konsekutive Steigerung der Expression des Chemokins CINC festgestellt werden (Yamada S, 2000). Neben der verstärkten Bildung von ROS in Fettlebern können auch limitierte, antioxidative Mechanismen IRS verstärken: Hierfür könnten z. B. herabgesetzte intra- und extrazelluläre GSH-Konzentrationen in steatotischen Lebern sprechen (Nakano H, 1998; Soltys K, 2001).

Aufgrund der Beeinträchtigung mitochondrialer Oxidation in steatotischen Lebern kann ATP unter pathophysiologischen Bedingungen nicht adäquat zur Verfügung gestellt werden (Fromenty B, 1997a und b). Eine unmittelbare Folge dieses hepatozellulären ATP-Mangels ist die Reduktion der energieabhängigen, apoptotischen Form des Zelltodes sowie eine Zunahme und Dominanz der energieunabhängigen, nekrotischen Form nach Ischämie / Reperfusion (Selzner M, 2000a). Darüber hinaus scheinen in Fettlebern regenerative Vorgänge nach Ischämie / Reperfusion erst verspätet einzusetzen (Selzner M, 2000b).

Angesichts des hohen Anteils an steatotischen Lebern bei Patienten mit Leberresektion und –transplantation (Hornboll P, 1982; D’Alessandro A, 1991) sowie der essentiellen Bedeutung von ROS an der Genese von IRS in Fettlebern müssen adäquate, therapeutische Strategien entwickelt werden. In diesem Zusammenhang besitzt GSH als endogenes Antioxidans ideale Eigenschaften: Seine Pharmakokinetik beim Menschen ist annähernd bekannt und wird bei intravenöser Applikation mit einer bis zu 200fachen Steigerung seiner Plasmakonzentration ohne Nebenwirkungen toleriert (Aebi S, 1991).

Es erscheint zudem sinnvoll, IRS zunächst in moderat verfetteten Lebern zu charakterisieren, da bisher keine präventiven Strategien zur Reduktion von hepatischen IRS etabliert sind. Ein besseres Verständnis des IRS in moderat verfetteten Lebern könnte die Entwicklung protektiver Interventionen auch bei höherem Verfettungsgrad ermöglichen.

II. FRAGESTELLUNG

Vor dem Hintergrund einer signifikant höheren Morbidität und Mortalität bei Leberresektionen an vorgeschädigten (steatotischen) Lebern sollten in der hier vorliegenden, experimentellen Arbeit folgende Fragen beantwortet werden:

1. Sind die beobachteten Reperfusionsschäden nach warmer Ischämie in verfetteten Lebern stärker als in normalen Lebern?
2. Welche Rolle spielen Mikrozirkulationsstörungen der Leber bei IRS in verfetteten Lebern?
3. Welche Rolle spielen ROS bei der Genese von IRS in steatotischen Lebern?
4. Können IRS in steatotischen Lebern durch intravenöse Zufuhr von Glutathion (GSH) reduziert werden?

III. MATERIAL UND METHODEN

Die im Folgenden vorgestellten Untersuchungen wurden in den Jahren 2000 und 2001 mit Zustimmung der zuständigen Behörden der Landesregierung von Oberbayern am Institut für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt (AZ: 211-2531-43/2000).

3.1 TIERMODELL

3.1.1 Versuchstiere und Beurteilung des Verfettungsgrades

Als Versuchstiere dienten 23 homozygote Zucker-fat-Ratten (ZF) von $223,1 \pm 5,1\text{g}$ sowie 21 heterozygote Zucker-lean-Ratten (ZL) von $212,4 \pm 4,8\text{g}$. Homozygote Zucker-Ratten besitzen defekte, hypothalamische Leptinrezeptoren (Phillips MS, 1996). Eine daraus resultierende ungehemmte und übermäßige Nahrungsaufnahme sowie eine Abnahme des Energieverbrauchs führen bei diesen Ratten zu einer kontinuierlichen Gewichtszunahme und konsekutiv zur Ausbildung einer Fettleber. Heterozygote Zucker-Ratten weisen dagegen intakte Leptinrezeptoren auf, entgehen damit der Ausbildung einer Fettleber und dienten somit als Kontrollen mit normalen Lebern. Das Ausmaß der Leberzellverfettung homozygoter Zucker-Ratten und deren Zuordnung in das Modell der moderat verfetteten Leber (30 – 60 % Leberzellverfettung) erfolgte anhand lichtmikroskopischer Befunde. Die Tiere wiesen alle ein männliches Geschlecht auf und stammten aus der Versuchstierhaltung von Charles River GmbH Sulzfeld, Deutschland.

3.1.2 Tierhaltung

Die Tierhaltung erfolgte in Doppelkäfigen bei zwölfstündigem Hell-Dunkel-Zyklus und freiem Zugang zu Wasser und Futter. Die Raumtemperatur lag autoreguliert bei 21°

C, die Luftfeuchtigkeit bei 60 ± 5 %. Das Futter (ssnif rat diet; ssnif Spezialdiäten; Soest) enthielt folgende Inhaltsstoffe: 19,0 % Rohproteine, 6,7 % Rohasche, 5,2 % Rohfaser, 3,0 % Rohfett, 1,1 % Calcium, 1,0 % Lysin, 0,8 % Phosphor, 0,3 % Methionin, 0,25 % Natrium und 0,2 % Magnesium. Darüber hinaus waren dem Futter pro Kilogramm folgende Zusatzstoffe beigemischt: 18000 I. E. Vitamin A, 1280 I. E. Vitamin D₃ und 120 mg Vitamin E.

3.2 PRÄPARATION

3.2.1 Chirurgische Präparation und Narkose

Nach einer 12- bis 15stündigen Nahrungskarenz mit freiem Zugang zu Wasser erfolgte die Narkotisierung der Tiere in einem durchsichtigen Glas-Äthertopf (Äther für Narkose; Fa. Hoechst; Frankfurt) und unter ständiger Kontrolle ihrer Vitalfunktionen (Atmungsverhalten, Bewegungsmuster). Um Einflüsse circadianer Rhythmen auf die Aussagekraft der einzelnen Versuche zu minimieren, wurde der Versuchsbeginn zwischen 7.00 und 10.00 Uhr des jeweiligen Tages festgesetzt. Im Anschluss an die Rasur des Bauchfells sowie des Fells am Hals und einer nachfolgenden, alkoholischen Hautdesinfektion wurden die Tiere in eine tiefe Äthernarkose versetzt.

Die Operation erfolgte unter sauberen, jedoch nicht sterilen Bedingungen sowie unter Verwendung eines Operationsmikroskops (M650; Fa. Wild; Heerbrugg; Schweiz). Die Tiere wurden in Rückenlage auf einer speziell entwickelten Operationsplatte mit integriertem Heizteil (Fa. Effenberger; München) gelagert und über eigens angefertigte Haltemagneten atraumatisch an den vier Extremitäten fixiert. Zur kontinuierlichen Messung der Körperkerntemperatur wurde rektal eine Thermosonde eingeführt, die an das Wärmeaggregat der Heizplatte angeschlossen war. Durch einen Rückkoppelungs-Steuermechanismus konnte so während der Operation eine konstante Körperkerntemperatur zwischen $36,5^{\circ}$ C und $37,5^{\circ}$ C gewährleistet werden. Die Narkoseführung erfolgte im offenen System unter Verwendung einer

Atemmaske, die mit einer äthergetränkten Kompresse bestückt war und die dem Kopf des Versuchstieres vorgelagert wurde. Auf der Operationsplatte lag eine Sauerstoffleitung bereit, über die im Bedarfsfalle reiner Sauerstoff verabreicht werden konnte. Dadurch konnte bei Narkosezwischenfällen mit Atemstillstand eine rasche, arterielle Sauerstoffaufsättigung erzielt werden.

Zur Applikation von Pharmaka (Glutathion) sowie der Farbstoffe Na-Fluoreszein und Rhodamin 6G wurde ein Katheter aus Polyethylen (PE 50; Außen- / Innendurchmesser: 0,96 / 0,58 mm; Portex; Hythe; England) in die linke Vena jugularis externa gelegt. Ein zweiter Polyethylenkatheter (PE 50; Außen- / Innendurchmesser: 0,96 / 0,58 mm; Portex; Hythe; England), der in die linke Arteria carotis communis inseriert wurde, ermöglichte eine kontinuierliche Messung des arteriellen Mitteldruckes (MAP) und der Herzfrequenz (HR) sowie die Injektion von fluoreszierenden Latexpartikeln. Darüber hinaus diente dieser arterielle Katheter der Entnahme von Blutproben sowie der kontinuierlichen Infusion von steriler Vollelektrolytlösung (Tutofusin®), die mit einer Geschwindigkeit von 4,0 ml / h appliziert wurde. Auf diese Weise konnten laparotomiebedingte Flüssigkeitsverluste substituiert werden.

Es folgte eine transversale Laparotomie. Das Abdomen wurde mittels zweier Haken offengehalten. Im Anschluss wurden die Haltebänder der Leber zum Zwerchfell, zur Abdominalwand und zum Magen gelöst. Zur Ableitung von Galle und deren quantitativer Bestimmung wurde der Ductus choledochus katheterisiert. Auch hier wurde ein Polyethylenkatheter verwendet (PE 50; Außen- / Innendurchmesser: 0,80 / 0,40 mm; Portex; Hythe; England). Zum Schutz vor Austrocknung wurden die übrigen abdominalen Organe einschließlich der rechten Lebersegmente mit Cuprophanfolie abgedeckt (im Anschluss an die Präparation wurde auch der linke Leberlappen mit dieser Folie bedeckt.). Ungeschützte Organoberflächen wurden immer wieder mit geringen Mengen körperwarmer, isotoner Vollelektrolytlösung benetzt. Um später eine Ischämie nur der linken sowie der links-medianen Lebersegmente induzieren zu können, wurden die entsprechenden Arterien- und Pfortaderäste freipräpariert. Ein regelhaft vorkommender, vom Ösophagus zum linken Leberlappen führender,

arterieller Ast wurde koaguliert. Mit dieser Technik wurden lediglich zwei Leberlappen einer Ischämie unterworfen, so dass eine portale Hypertension mit Kongestion im mesenterialen Strombett und eine daraus resultierende, systemische Hypertension vermieden werden konnte. Mittels mikrovaskulärer Gefäßclips nach Biemer (Aeskulap; Tuttlingen; Deutschland) wurden die freipräparierten Gefäße ohne Einbeziehung der Gallengänge temporär okkludiert. Eine Ischämie des linken sowie des links-medianen Leberlappens war die Folge.

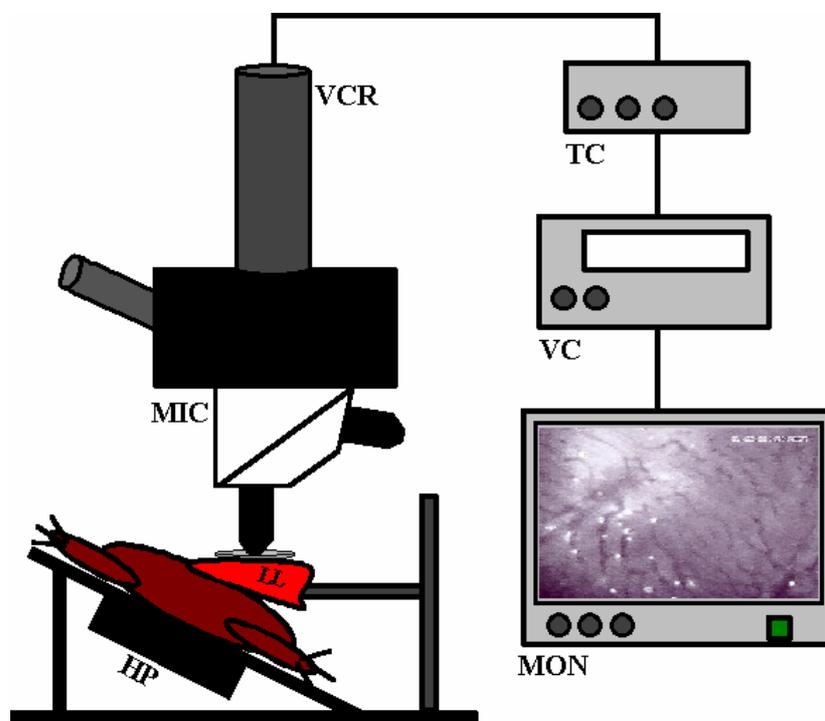


Abb. 3.1: Schematische Darstellung der intravitalen Mikroskopie: Die Unterfläche des ausgelagerten, linken Leberlappens (LL) wird mit einem Deckglas bedeckt und mikroskopiert (MIC). Eine Videokamera (VCR) sendet die aufgenommenen Bilder an den Videorecorder (VC) und zur direkten Beurteilung an einen Monitor (MON). Der Videozeitgenerator (TC) ermöglicht die Einblendung von Datum und Uhrzeit.

Zur intravitalen Fluoreszenzmikroskopie (s. Abb. 3.1) wurde der linke Leberlappen (LL) auf einer speziell dafür konstruierten Haltevorrichtung ausgeklappt und mit einem

Deckglas (24 mm x 32 mm) zum Zwecke der Mikroskopie und zum Schutz vor der Einwirkung des atmosphärischen Sauerstoffs abgedeckt. Die Haltevorrichtung selbst besaß eine 4 x 5 cm große, rechteckige und schaufelartige Grundplatte, der eine 0,5 – 1 cm dicke Schicht aus Modelliermasse aufgelagert war. Durch diese Modelliermasse konnte die individuelle Anatomie des ausgelagerten, linken Leberlappens nachgeahmt werden und so eine mechanische Obstruktion der afferenten und efferenten Gefäße verhindert werden. Die Grundplatte wiederum war an einem feineinstellbaren Schwenkarm befestigt. Außerdem wies die Haltevorrichtung eine magnetische Basis auf, durch die sie auf der Operationsplatte fest fixiert werden konnte.

Die geschilderte Präparation und Vorbereitung ermöglichten die Beurteilung der hepatischen Mikrozirkulation mittels der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie in vivo (Menger MD, 1991).

3.2.2 Postischämische Behandlung mit Glutathion

Die Applikation von Glutathion (Tationil 600®; Boehringer Mannheim / Italien) erfolgte intravenös über den in der Vena jugularis externa platzierten Katheter. Aufgrund der äußerst geringen Halbwertszeit des Antioxidans GSH und der Spontanoxidation zu GSSG wurde darauf geachtet, dass die Herstellung der Glutathionlösung mit steriler 0,9 %-iger NaCl-Lösung zur jeweils gleichen Zeit während des Versuchsablaufes erfolgte (60 Minuten vor Beginn der Glutathion-Infusion). Zur kontinuierlichen, intravenösen Applikation des Glutathions wurde ein Perfusor verwendet (SP 110i Perfusor; Astonbury Farm Business Centre; Aston; SG2 7EG England). Die zugeführte Menge an Glutathion im Perfusat betrug dabei 100 µmol / h / kg und orientierte sich diesbezüglich an Vorversuchen der eigenen Forschergruppe (Schauer RJ, 2000a), die eine gute Hepatoprotektion bei Ischämie / Reperfusion in normalen Lebern zeigen konnten. Die Applikation erfolgte 20 Minuten vor Beginn der Reperfusion kontinuierlich bis zum Versuchsende, d. h. 120 Minuten nach Reperfusionseintritt.

3.3 PARAMETER UND MESSMETHODEN

3.3.1 Systemische Hämodynamik

Über druckstabile Katheter wurde der arterielle Mitteldruck (MAP) auf einen Druckwandler (Typ P23 ID; Statham Instruments Inc.; Oxnard; California; USA) übertragen und von einem nachgeschalteten Elektromanometer (Press. Ampl. 863 E154E; Siemens Medizinische Technik; München) digital angezeigt. Diese Druckwerte wurden in Abständen von 5 Minuten in das Versuchsprotokoll übertragen.

3.3.2 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie (IVM): Beurteilung der hepatischen Mikrozirkulation

Die IVM wurde gemäß dem standardisierten Versuchsprotokoll 30 Minuten nach Beginn der Reperfusion durchgeführt.

Dabei erfolgte die Mikroskopie der Unterseite des ausgelagerten, linken Leberlappens unter Zuhilfenahme eines Leitz-Orthoplan-Fluoreszenzmikroskopes (Leitz; Wetzlar) nach der Epi-Illuminationstechnik (s. Abb. 3.1). Zur negativen Kontrastverstärkung bei der Beurteilung der sinusoidalen Perfusion der Leber erhielten die Tiere ca. 20 Minuten vor Beginn der Mikroskopie Natrium-Fluoreszein (1,0 $\mu\text{mol} / \text{kg}$; Merck AG; Darmstadt; Deutschland) über den intravenösen Polyethylenkatheter. Zeitgleich und ebenfalls intravenös erfolgte zur Darstellung von Leukozyten in den einzelnen Leberlobuli und in den postsinusoidalen Venolen die Injektion von Rhodamin 6G (0,1 $\mu\text{mol} / \text{kg}$; Merck AG; Darmstadt; Germany). Die Darstellung des mikrovaskulären Strombetts wurde mittels einer 100-Watt-Quecksilber-Hochdrucklampe, eines Ploem-Opak-Illuminators und mittels eines Filterblocks $I_{2/3}$ (Anregung: 450 – 490 nm; Emission: > 515 nm; Leitz; Wetzlar) ermöglicht. Nach Einblendung eines Videozeitgenerators (VTG 33; For. A Company Ltd.; Tokio; Japan) wurden die intravitalmikroskopisch gewonnenen Bilder mittels einer CCD-Kamera (charge coupled device camera; FK 6990; Prospective

Measurements Inc.; San Diego; CA; USA) auf Videoband (S-VHS Panasonic AG 7330; Matsushita Electric Ind.; Tokio; Japan) aufgezeichnet. Zur Erstellung von Übersichtsaufnahmen wurde als Objektiv ein Leitz Fluotar mit der Vergrößerung 10 und der numerischen Apertur 0,30 verwendet. Für die Beurteilung der sinusoidalen Perfusion und der Leukozyten-Adhärenz diente ein Wasser-Immersionsobjektiv Fluotar mit der Vergrößerung 25 und der numerischen Apertur 0,60. Unter Verwendung dieser Objektive konnten auf einem 330mm-Monitor (PVM 1442 QM; Sony; München) eine 280- bzw. 700fache Vergrößerung erreicht werden.

3.3.2.1 Beurteilung der sinusoidalen Perfusion und der Leukozyten-Adhärenz in normalen und verfetteten Lebern

Sinusoidale Perfusion (s. Abb. 3.2) und lobuläre Leukozyten-Adhärenz (s. Abb. 3.3) wurden bewertet, indem 10 zufällig ausgewählte Leberazini zum jeweiligen Messpunkt für jeweils 20 Sekunden aufgezeichnet wurden. Zur Beurteilung der venolären Leukozyten-Adhärenz erfolgte anschließend die Aufzeichnung von 10 postsinusoidalen Venolen (PSV) (s. Abb. 3.4). Die eigentliche Auswertung erfolgte offline zu einem späteren Zeitpunkt - abgekoppelt von der Versuchsdurchführung - an Videoeinzelbildern.

Zur Bewertung der sinusoidalen Perfusion wurde zunächst innerhalb des jeweiligen Azinus die Gesamtzahl der Sinusoide bestimmt. Danach erfolgte die prozentuale Bestimmung der nicht-perfundierten Sinusoide innerhalb des Azinus. Darüber hinaus wurde die sinusoidale Perfusion entsprechend der zonalen Gliederung des Leberazinus jeweils periportal (pp), midzonal (mz) und perizentral (pz) ausgewertet (s. Abb. 3.2).

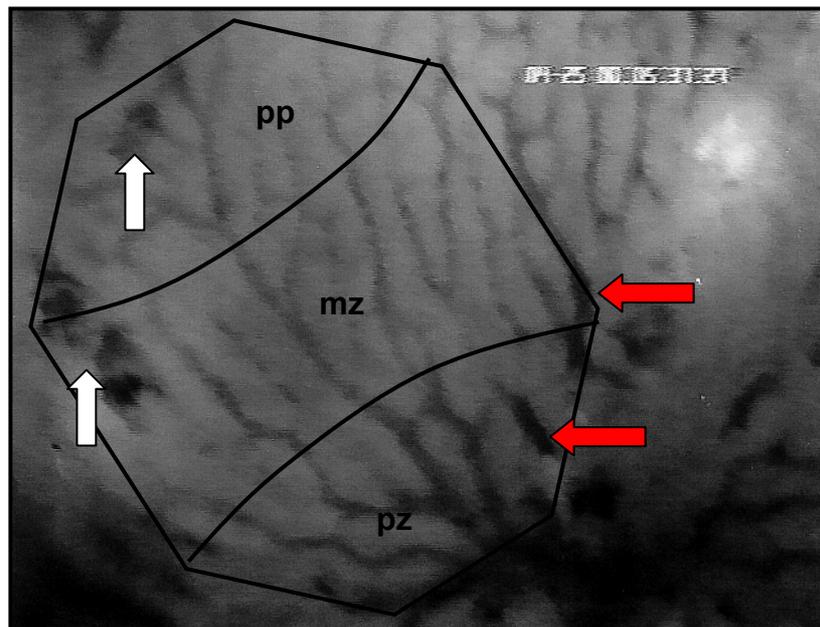


Abb. 3.2: *Intravitalmikroskopische Darstellung der sinusoidalen Perfusion mit Verstärkung des Negativkontrastes durch Natrium-Fluoreszein (1,0 $\mu\text{mol} / \text{kg}$). Der abgebildete Leberazinus ist schematisch in seine periportale (pp), midzonale (mz) und perizentrale (pz) Zone unterteilt.*

Periportal und midzonal sind deutliche Veränderungen der parenchymalen und nicht-parenchymalen Mikroarchitektur als Zeichen des IRS zu erkennen (weißer Pfeil), darüber hinaus zwei nicht mehr perfundierte Sinusoide = „no-reflow“ (rote Pfeile).

Leukozyten, die am sinusoidalen Endothel mindestens 20 Sekunden adhären waren, wurden als permanent adhären angesprochen („Sticker“) und wiederum in den drei verschiedenen, azinären Zonen quantitativ bestimmt (s. Abb. 3.3).

Dieselben Einschlusskriterien für die Definition permanent adhärenter Leukozyten in Sinusoiden wurden auch zur Quantifizierung der Leukozyten-Adhärenz in den postsinusoidalen Venolen (PSV) herangezogen („Sticking“ am postsinusoidalen Endothel länger als 20 Sekunden). Diese Gesamtzahl wurde in einem definierten Segment anschließend auf die Endotheloberfläche bezogen (Sticker / mm^2), die aus der Länge und dem Durchmesser des betrachteten Venolenabschnitts berechnet

wurde. Die Messungen erfolgten dabei mithilfe des computergestützten Cap-Image-Systems (Version 5.03; ©1995 C. Zeintl). Weiterhin wurden an PSV temporär adhärenente Leukozyten („Roller“) gezählt, die während der Beobachtungszeit von 20 Sekunden nur vorübergehend am postsinusoidalen Endothel adhärenent waren. Die Anzahl wurde ebenfalls auf die Endotheloberfläche der postkapillären Venole bezogen (Roller / mm²).

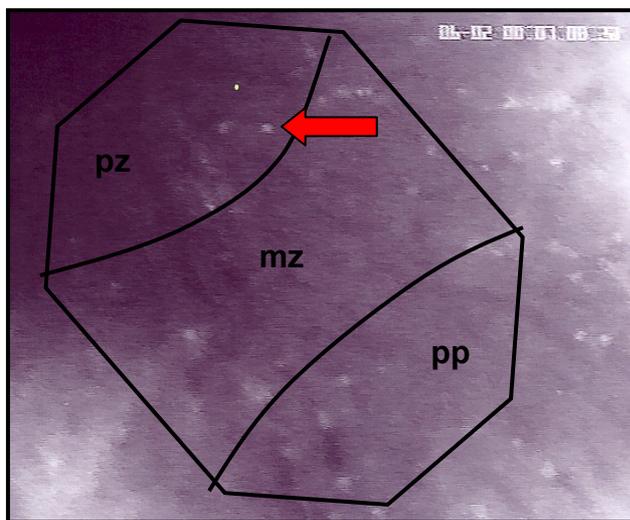


Abb. 3.3: *Intravitalmikroskopische Darstellung der sinusoidalen Leukozyten-Adhärenz innerhalb eines Leberazinus. Die Leukozyten wurden mit Rhodamin 6G (0,1 µmol / kg) angefärbt und galten ab einer Adhärenzzeit von 20 Sekunden als am sinusoidalen Endothel „permanent“ adhärenent (roter Pfeil).*

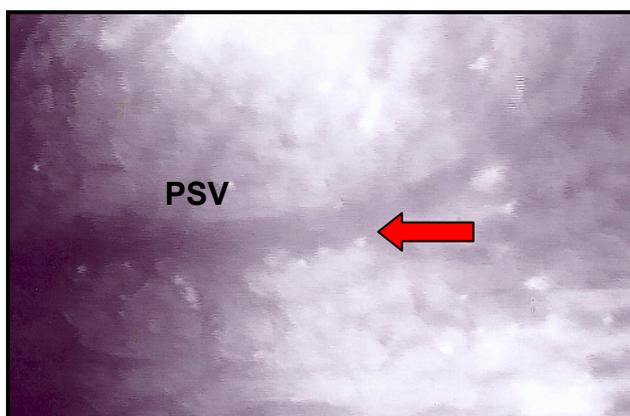


Abb. 3.4: *Intravitalmikroskopische Darstellung der Leukozyten-Adhärenz einer postsinusoidalen Venole (PSV). Permanent adhärenente Leukozyten (>20 Sekunden) wurden von temporär adhärenenten (<20 Sekunden) unterschieden. Der rote Pfeil verweist auf einen „Sticker“.*

3.3.2.2 Bestimmung der midzonalen Sinusoidweiten

Zur Bewertung von möglichen Endothelschwellungen in den Sinusoiden erfolgte eine Messung der mittleren Sinusoidweite in den midzonalen Segmenten der jeweiligen Azini. Für diese Bestimmung wurden nur solche Sinusoide herangezogen, die im gesamten midzonalen Bereich eindeutig darstellbar und perfundiert waren. Auf diese Weise sollten Verzerrungen infolge unterschiedlicher, mikroskopischer Schnittrichtungen aus der Bewertung eliminiert werden. Die im μm -Bereich liegenden Messungen erfolgten computergestützt ebenfalls unter Verwendung des Cap-Image-Systems (Version 5.03; ©1995 C. Zeintl).

3.3.2.3 Bestimmung der Funktion von Kupffer-Zellen (KC)

3.3.2.3.1 Intraarterielle Applikation von fluoreszierenden Latexpartikeln

Hinsichtlich der Bewertung der Phagozytose-Aktivität von Kupffer-Zellen (KC) erfolgte die Injektion eines einmaligen Bolus von fluoreszierenden Latexpartikeln (Polysciences Inc.; Warrington; PA; USA) über den Verweilkatheter in die linke Arteria carotis communis. Die Applikation der Latexpartikel, deren Durchmesser $1,1 \mu\text{m}$ beträgt, wurde in einer Konzentration von $3 \times 10^8 / \text{kg KG}$ in $1,0 \text{ ml}$ steriler, $0,9\%$ iger NaCl-Lösung durchgeführt. Diese Dosierung entspricht bei einem angenommenen Körpergewicht eines Versuchstieres von 200 g einer Absolutzahl von ca. 60 Millionen Latexpartikeln. Diese konnten dann aufgrund ihrer Fluoreszenz mittels der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie und unter Verwendung eines Filterblocks $I_{2/3}$ (Anregung: $450 - 490 \text{ nm}$; Emission: $> 515 \text{ nm}$; Leitz; Wetzlar) auf dem Bildschirm visualisiert werden. Auf diese Weise war eine Beurteilung der Phagozytose-Aktivität hepatischer Kupffer-Zellen (KC) möglich (Post S, 1992; Vollmar B, 1994b).

3.3.2.3.2 Messung der Phagozytose-Aktivität von Kupffer-Zellen

Aufgrund ihrer Größe werden die injizierten, fluoreszierenden Latexpartikel überwiegend von Kupffer-Zellen aufgenommen bzw. sind an diese adhären (Praaning – Van Dalen DP, 1982; Dan C, 1985). Daher ist mit dieser Methode eine Analyse der Phagozytose-Aktivität von Kupffer-Zellen (KC) möglich. Zur Quantifizierung wurde 5 Minuten nach Injektion der Partikel in 10 – 15 zufällig ausgewählten Azini für jeweils 10 Sekunden die Anzahl der freifließenden, d. h. nicht-adhären (nicht-phagozytierten) Latexpartikel in Prozent aller im Gesichtsfeld sichtbarer Latexpartikel bestimmt (s. Abb. 3.5). Da Kupffer-Zellen (KC) Eigenschaften histiozytär umgewandelter Endothelzellen aufweisen, werden diese nun als phagozytierende Makrophagen markiert.

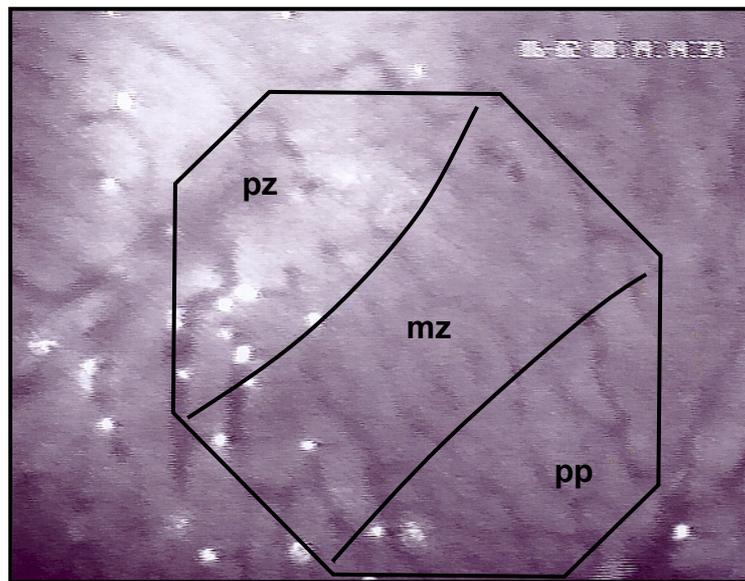


Abb. 3.5: *Intravitalmikroskopische Darstellung der Phagozytose-Aktivität von Kupffer-Zellen (KC) nach intraarterieller Injektion von Latexpartikeln (3×10^8 / kg KG). Phagozytierte Latexpartikel markieren funktionell aktive KC. Daher wird die Anzahl der adhären Latexpartikel pro Leberazinus bestimmt und auf die Gesamtzahl aller sichtbaren (unbewegliche und bewegliche) Latexpartikel im Untersuchungsfeld bezogen (pz = perizentrale; mz = midzonale; pp = periportale Zone des Leberazinus).*

3.3.3 Bewertung der hepatozellulären Integrität

3.3.3.1 Leberenzyme

Zur Beurteilung des hepatozellulären Schadens diente die Bestimmung der Aktivität (U / l) des leberspezifischen Enzyms Alanin-Aminotransferase (ALT). Die zu diesem Zwecke verwendeten, arteriellen Blutproben wurden am Ende der zweistündigen Reperfusionphase gewonnen und dabei in EDTA-beschichteten Probengefäßen gesammelt. Anschließend wurden die Blutproben bei 4° C und 3000 Umdrehungen pro Minute für 10 Minuten zentrifugiert (Rotanta/K; Hettich; Tuttlingen). Das so gewonnene EDTA-Plasma wurde dann bis zum Zeitpunkt der Bestimmung bei -80° C eingefroren. Die Enzymaktivitäten wurden spektrophotometrisch (Eppendorf PCP 6121; Eppendorf / Gerätebau Netheler + Hinz; München) entsprechend der „optimierten Standardmethode“ der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie (Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie 1970, 1972) bei einer Wellenlänge von 334 nm gemessen.

3.3.3.2 Lichtmikroskopische Untersuchungen

Am Versuchsende nach 60 Minuten Ischämie und 120 Minuten Reperfusion wurden zur histologischen Untersuchung Gewebeproben aus dem ischämischen, linken Leberlappen entnommen und unmittelbar nach Entnahme in 10%iger Formalinlösung fixiert. Anschließend wurden die Gewebeproben für 30 Minuten fließend entwässert und für 12 Stunden in Ethanol (70 %) eingelagert. Danach wurden diese mittels aufsteigender Ethanol-Reihe wieder entwässert und für 4 Stunden in den Intermedien Methylbenzoat und Benzol inkubiert.

Die Einbettung der Proben erfolgte nach 24stündiger Einlage in Paraffin ebenfalls in Paraffin. Es folgte die Herstellung von 3 µm dünnen Schnitten am Schlittenmikrotom (Mod Hn 40, Fa. Reichert-Jung / Leica, München), die dann mit Hämatoxylin-Eosin (Fa. Merck, Darmstadt) gefärbt und auf einem Objektträger zur

Mikroskopie fixiert wurden. Die Begutachtung erfolgte durch einen unabhängigen Pathologen ohne Kenntnis über die Zuordnung der Präparate zu den einzelnen Versuchsgruppen.

3.3.3.3 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Mittels elektronenmikroskopischer Untersuchungsmethoden erfolgte die Darstellung von ultrastrukturellen Veränderungen nach insgesamt 60 Minuten Ischämie und 120 Minuten Reperfusion.

Die zu diesem Zweck notwendige Vorbehandlung des Lebergewebes mit Karnovsky-Puffer (10 ml enthalten: 2 ml Glutaraldehyd 25 %, 5 ml Paraformaldehyd 4 %, 3ml Sörensenpuffer) erforderte zunächst die Platzierung eines zusätzlichen Katheters (PE 50; Außen- / Innendurchmesser: 0,96 / 0,58 mm; Portex; Hythe; England) in die Aorta abdominalis am Ende des Versuches. Parallel dazu wurde diese oberhalb des Truncus coeliacus abgeklemmt. Auf diese Weise war es möglich, das Lebergewebe retrograd über die Aorta zunächst mit steriler NaCl-Lösung zu spülen und anschließend eine Perfusionsfixierung mit 10 ml Karnovsky-Puffer durchzuführen. Zur Volumenentlastung der Leber wurde die Vena portae inzidiert. Darüber hinaus wurde der Karnovsky-Puffer mittels Perfusor kontrolliert bei 70 mmHg und kontinuierlich zugeführt (Frenzel H, 1976), um mögliche Perfusionsartefakte zu verhindern. Aus dem linken Leberlappen wurden dann ca. 1 x 1 x 3 mm große Gewebeproben entnommen und bis zur elektronenmikroskopischen Untersuchung gekühlt in Karnovsky-Puffer aufbewahrt.

Die Einbettung der zu analysierenden Gewebeproben erfolgte dann nach Osmierung und Dehydrierung in Araldit-Harz. Nach einer Aushärtung über 24 Stunden bei 60° C wurden 70nm-Ultradünnschnitte (Ultracut; Reichert-Jung / Leica; München) angefertigt. Die Kontrastierung der Ultradünnschnitte wurde mit Bleicitrat und Uranylacetat durchgeführt, an die sich die eigentliche elektronenmikroskopische (EM 900; Zeiss; Oberkochen) Untersuchung bei 80 kV anschloss (Vollmar B, 1994c).

3.3.4 Bestimmung der postischämischen Leberfunktion: Gallefluss

Zur kontinuierlichen Ableitung der Galle erfolgte nach Laparotomie die Platzierung eines Verweilkatheters (PE 50; Außen- / Innendurchmesser: 0,80 / 0,40 mm; Portex; Hythe; England) in den Ductus choledochus. Der Gallefluss wurde als Parameter der hepatozellulären Exkretionsfunktion herangezogen. Zu diesem Zweck wurde die gewonnene Galle in 30minütigen Abständen während der 60minütigen Ischämie- (G1 und G2) als auch der 120minütigen Reperfusionphase (G3 bis G6) gesammelt. Als Referenzwert („base-line“ = G0) wurde bereits vor Beginn der Ischämie der Gallefluss ($\mu\text{l} / \text{g} / \text{min}$) bestimmt. Dieser Wert diente dann als Referenzwert (100 %), auf den sämtliche ermittelte Gallenmengen (G1 bis G6) bezogen und als prozentuale Abweichung angegeben wurden.

3.3.5 Bestimmung des Gesamt-Glutathion-Gehaltes, GSH und GSSG im Plasma

Die Bestimmung der plasmatischen GSH- und GSSG-Konzentrationen erfolgte vor Induktion der Ischämie (Referenzwert) sowie 15, 30, 60 und 120 Minuten nach Beginn der Reperfusionphase. Zu diesem Zwecke wurden über den arteriellen Katheter Blutproben (je 500 μl) entnommen.

3.3.5.1 Bestimmung des Gesamt-Glutathion-Gehaltes

Durch einen kinetischen Test (Tietze F, 1969) wurde die Summe des oxidierten (GSSG) und reduzierten Glutathions (GSH) bestimmt. Dieser basiert auf folgender Reaktion:



Bei 405 nm wurde die Geschwindigkeit der Extinktionszunahme während der nicht-enzymatischen, durch GSH bedingten Reduktion von 5,5'-Dithiobisnitrobenzoesäure (DTNB) aufgezeichnet. Die Glutathion-Reduktase (GR) reduzierte enzymatisch das bei dieser Reaktion entstandene GSSG, so dass die Reaktionsgeschwindigkeit der ersten Reaktion, der DTNB-Reaktion, konstant blieb. Hierfür wurde folgender Testansatz befolgt:

800 µl Phosphat-Puffer	(pH 7,4)
50 µl NADPH	(5 mM)
50 µl DTNB	(1 mM)
50 µl Plasma	
20 µl Glutathion-Reduktase	(24 U / ml)
50 µl GSH-Standard	(4 µM)

Dem Testansatz wurden 5 Minuten nach Beginn 50 µl GSH-Standard (4 µM) zugeführt, um Testhemmungen ausschließen zu können.

3.3.5.2 Bestimmung von Glutathiondisulfid (GSSG)

Im Blutplasma beträgt das Verhältnis GSH / GSSG zehn zu eins (Akerboom TP, 1981). Zur Vermeidung einer spontanen GSH-Autoxidation zu GSSG entlang des Konzentrationsgradienten müssen deshalb bei der Bestimmung der hepatischen GSSG-Freisetzung entsprechende Maßnahmen getroffen werden: Zu diesem Zweck wurde die von Lauterburg beschriebene Methode der GSH-Konjugation mit N-Ethylmaleimid (NEM) verwendet (Lauterburg BH, 1984a). 200 µl Blut wurde unmittelbar nach der Abnahme mit 200 µl NEM-Lösung (10 mM) versetzt. GSH wurde durch die spontane Reaktion von GSH und NEM zu einem Glutathionkonjugat gebunden und so eine GSH-Autoxidation zu GSSG verhindert. Es folgte die Elimination von überschüssigem NEM durch Trennung über Sep-Pak-C₁₈-Kartuschen (Waters; Framingham; MA; USA). Hierzu wurden die Sep-Pak-C₁₈-Kartuschen mit 10 ml absolutem Methanol und 10 ml Aqua bidest. konditioniert. Anschließend erfolgte

die Auftragung von 200 µl NEM-Plasma, das mit 1,0 ml Phosphat/EDTA-Puffer (pH 7,4) eluiert wurde. Die GSSG-Konzentration der NEM-freien Eluate wurde mit dem unter 3.3.5.1 beschriebenen, kinetischen Test ermittelt. Die GSSG-Wiederfindung betrug 90%.

3.3.5.3 Bestimmung des reduzierten Glutathions (GSH)

Aus der Differenz von Gesamt-Glutathion und Glutathiondisulfid-Konzentration wurde die GSH-Konzentration (µM) berechnet.

3.3.6 Bestimmung des intrazellulären Gesamt-Glutathion-Gehaltes

Zusätzlich zur Bestimmung von GSH und GSSG im Plasma erfolgte die Messung des Gesamt-Glutathion-Gehaltes im Lebergewebe, das unmittelbar am Ende der 120minütigen Reperfusionsphase zu diesem Zwecke in kleineren Stücken (ca. 5 x 5 x 5 mm groß) in Stickstoff fixiert und danach bei -80° C gelagert wurde. Zum Zeitpunkt der Bestimmung des Gesamt-Glutathion-Gehaltes wurde das Lebergewebe unter flüssigem Stickstoff pulverisiert und mit Perchlorsäure (1.0 M) im Verhältnis 3 ml / g Lebergewebe versetzt. Die Säureextrakte wurden 5 Minuten bei 5000 x g zentrifugiert (4° C), der proteinfreie Überstand in Phosphat-Puffer (pH 7,4) im Verhältnis 1:1000 verdünnt. 50 µl dieser Verdünnungen wurden anschließend im kinetischen Test zur GSH-Bestimmung (s. 3.3.5.1) eingesetzt. Um dabei ischämisches mit nicht-ischämischem Lebergewebe vergleichen zu können, wurden Proben sowohl aus dem linken, ischämischen (LL) als auch solche aus dem rechten, nicht-ischämischen Leberlappen (LR) entnommen (s. 4.6).

3.4 VERSUCHSGRUPPEN

Ziele dieser Arbeit waren die Charakterisierung von IRS in Fettlebern im Vergleich zu normalen Lebern sowie die Beurteilung der Effizienz einer antioxidativen Therapie mit GSH in den steatotischen Lebern. Daher erfolgten Versuche mit homozygoten, Fettlebern entwickelnden (Gruppe I) sowie mit heterozygoten, keine Fettlebern entwickelnden Zucker-Ratten (Gruppe II). Experimente in Gruppe I wurden mit insgesamt 23 homozygoten Zucker-Ratten, sog. „Zucker-fat-Ratten“ (ZF) durchgeführt, die aufgrund von defekten, hypothalamischen Leptinrezeptoren mit zunehmendem Alter eine fettinfiltrierte Leber entwickeln. Die in dieser Gruppe gewonnenen Parameter konnten somit auf steatotische Lebern bezogen werden. Experimente in Gruppe II erfolgten dagegen unter Verwendung von insgesamt 21 heterozygoten Zucker-Ratten, sog. „Zucker-lean-Ratten“ (ZL), die aufgrund ihres heterozygoten Phänotyps intakte, zerebrale Leptinrezeptoren aufweisen und somit der Entwicklung einer steatotischen Leber entgehen. Anhand dieser Gruppe konnten Parameter normaler Lebern beurteilt werden.

Gruppe I und Gruppe II wurden in je 3 Untergruppen aufgeteilt, so dass für die Beantwortung oben genannter Fragen insgesamt 6 Versuchsgruppen untersucht wurden. Die 3 Untergruppen sind wie folgt charakterisiert:

Gruppe A („Sham-Gruppe“; SH) wurde einer „Scheinoperation“ unterzogen, d. h. es wurde mit Ausnahme der Ischämisierung der linken und links-medianen Leberlappen dieselbe Präparation mit demselben zeitlichen Ablauf wie bei den anderen Versuchsgruppen durchgeführt. Auf diese Weise sollten Effekte der chirurgischen Präparation und Narkose auf die einzelnen Messparameter herausgefiltert und die „base-line“-Werte bestimmt werden. Für die Gruppe A (SH) wurden sowohl in Gruppe I (ZF) als auch in Gruppe II (ZL) 6 Tiere verwendet (s. Abb. 3.6).

Bei Gruppe B handelte es sich um die „Kontrollgruppen“ (KO). Tiere dieser Gruppe wurden einer partiellen Leberischämie von 60 Minuten und einer Reperfusion von 120 Minuten unterzogen. Die Anzahl der Versuchstiere dieser Gruppe B (KO) betrug in Gruppe I (ZF) 10, in Gruppe II (ZL) 9 (s. Abb. 3.6).

Versuchstiere der Gruppe C (GSH) wurden 20 Minuten vor Beginn der Reperfusion (nach 60 Minuten Ischämie) bis zum Ende des Versuches zusätzlich mit Glutathion (100 µmol / h / kg KG) i. v. behandelt. Hierfür wurden in Gruppe I (ZF) 7, in Gruppe II (ZL) 6 Tiere verwendet (s. Abb. 3.6).

Gruppen-nummer	Gruppen-bezeichnung	Anzahl (n)	Glutathion (µmol / h / kg)	Ischämie (min)	Reperfusion (min)
I A	ZF – SH	6	-	-	-
I B	ZF – KO	10	-	60	120
I C	ZF – GSH	7	100	60	120
II A	ZL – SH	6	-	-	-
II B	ZL – KO	9	-	60	120
II C	ZL – GSH	6	100	60	120

Abb. 3.6: Überblick über die einzelnen Versuchsgruppen; ZF = Zucker-fat-Ratten; ZL = Zucker-lean-Ratten; SH = Sham-Gruppe; KO = Kontrollgruppe; GSH = mit Glutathion (100 µmol / h / kg KG) vorbehandelte Gruppe.

3.5 VERSUCHSPROTOKOLL

Sämtliche Versuchsgruppen wurden einem ähnlichen, experimentellen Protokoll unterzogen (s. Abb. 3.7): Im Anschluss an die chirurgische Präparation wurde der linke und links-mediane Leberlappen (ca. 60 % der Lebermasse) einer 60minütigen, normothermen Ischämiephase unterzogen. Die Ischämiedauer wurde aufgrund von vorliegenden Ergebnissen sowohl aus der eigenen (Schauer RJ, 2000a) als auch aus anderen Forschungsgruppen (Peralta C, 1999) gewählt, da hierbei mit relevanten hepatozellulären Schäden zu rechnen war. 30 Minuten nach Beginn der insgesamt 120minütigen Reperfusionphase erfolgte die intravitale Fluoreszenzmikroskopie (IVM) für ca. 30 Minuten. Sie diente der Quantifizierung von hepatischen Mikrozirkulationsstörungen, einschließlich der Bestimmung der

Sinusoidweiten sowie – nach intraarterieller Applikation von fluoreszierenden Latexpartikeln – der Analyse der Phagozytose-Aktivität von Kupffer-Zellen (KC). Die Gallekollektoren wurden vor („Nullwert“) und während der Ischämie- als auch in der Reperfusionphase alle 30 Minuten ausgetauscht und die gewonnene Galle bestimmt. Blutproben zur Messung der plasmatischen GSH- und GSSG-Konzentrationen wurden ebenfalls vor Beginn der Ischämiephase („Nullwert“) sowie 15, 30, 60 und 120 Minuten nach Beginn der Reperfusion entnommen. Nach Ablauf der 120 Minuten Reperfusion wurden die Versuche durch die Entnahme der Leber für licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen sowie für GSH- bzw. GSSG-Bestimmungen im Lebergewebe beendet. Aus der am Ende der 120minütigen Reperfusionphase durchgeführten Blutentnahme wurden u. a. die Leberenzyme bestimmt. Dieser Versuchsablauf entspricht dem Protokoll der Kontrollgruppen (KO), d. h. der Versuchsgruppen IB und IIB.

Tiere, die einer Behandlung mit Glutathion unterzogen wurden, erhielten 20 Minuten vor Beginn der Reperfusionphase bis zum Versuchsende GSH in einer Konzentration von 100 $\mu\text{mol} / \text{h} / \text{kg}$ KG kontinuierlich als intravenöse Infusion. Der Rest des experimentellen Protokolls der GSH-Gruppen (Gruppe IC und IIC) entsprach dem der Kontrollgruppen (s. Abb. 3.7).

Sham-Tiere (Gruppe IA und IIA) wurden keiner Ischämie- und Reperfusionphase unterzogen. Blut- und Galleproben sowie Lebergewebe wurden jedoch zu denselben Zeitpunkten wie in den KO- bzw. GSH-Gruppen gewonnen, d. h. die Dauer der Versuche in den SH-Gruppen war mit der der anderen Gruppen vergleichbar.

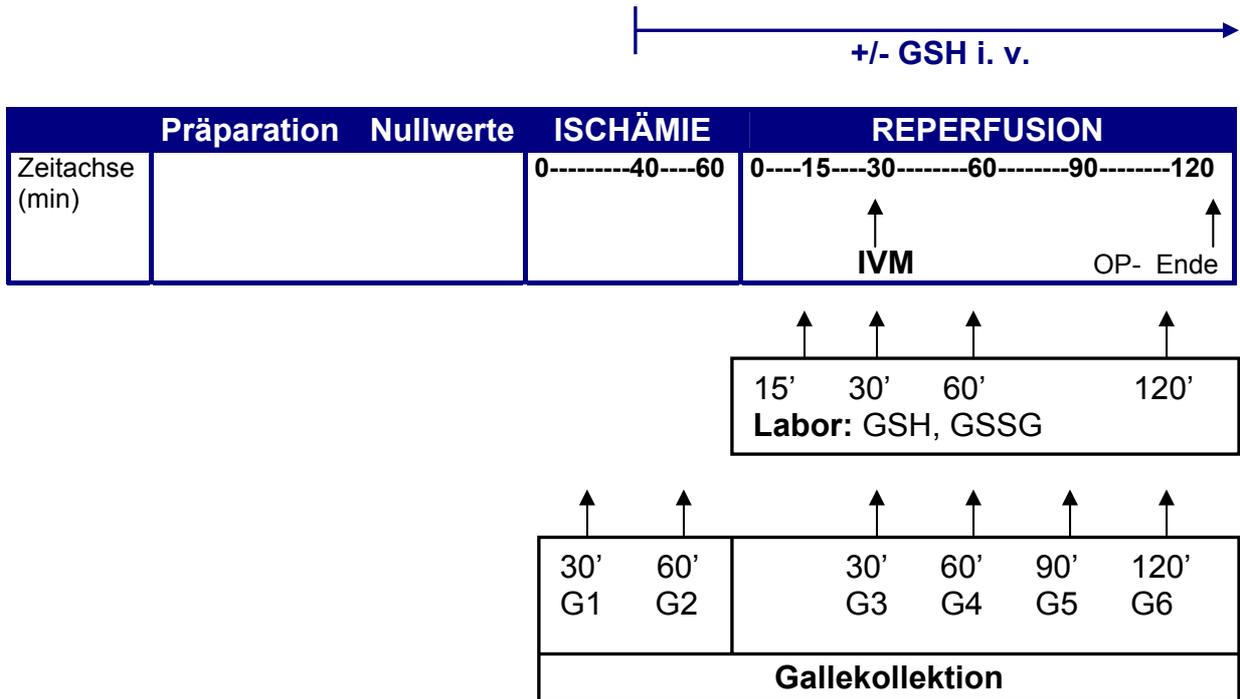


Abb. 3.7: *Versuchsprotokoll: Die „Nullwerte“ beinhalten GSH- und GSSG-Messungen sowie eine Gallekollection (G0) als „base-line“-Werte. Die folgenden GSH- und GSSG-Messungen wurden durch art. Blutentnahme 15, 30, 60 sowie 120 Minuten nach Beginn der Reperfusion durchgeführt. Die Gallekollection erfolgte während der Ischämie (30 und 60 Minuten) sowie während der Reperfusion (30, 60, 90 und 120 Minuten). GSH = Die Glutathion-Injektion erfolgte in den Gruppen IC und IIC 20 Minuten vor Beginn der Reperfusion bis zum Versuchsende.*

3.6 STATISTISCHE ANALYSE

Sämtliche Ergebnisse sind als Mittelwerte (mean) ± Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Die Berechnung des Signifikanzniveaus sowie die graphische Darstellung erfolgte mit Hilfe des kommerziell erhältlichen Statistik-Programms SigmaStat bzw. SigmaPlot (Jandel Corp.; San Rafael; CA; USA).

Mittelwerte zwischen 2 Gruppen wurden mit dem Student's t-Test und dem Whitney U-Test verglichen. Bei Vergleichen von mehr als 2 Gruppen wurde die „one-way ANOVA“ – Varianzanalyse angewendet. Ein p-Wert kleiner 0,05 wurde als statistisch signifikant angenommen.

IV. ERGEBNISSE

4.1 CHARAKTERISIERUNG DES MODELLS DER MODERAT VERFETTETEN RATTENLEBER

In der Einleitung (s. 1.2) wurde bereits darauf hingewiesen, dass steatotische Lebern im Vergleich zu gesunden Lebern eine gesteigerte Vulnerabilität gegenüber IRS aufweisen. Dies konnte durch die hier vorliegenden Versuche bestätigt werden.

4.1.1 Leberenzyme – Die Bestimmung der Alanin-Aminotransferase (ALT)

Die plasmatische Aktivität (U / l) der leberspezifischen Transaminase ALT wurde nach 120minütiger Reperfusion bestimmt (s. 3.3.3.1). Versuchstiere, die keiner Ischämie / Reperfusion, sondern lediglich einer Laparotomie unterzogen wurden (Scheinoperation), wiesen in der steatotischen Gruppe (ZF-SH) keine unterschiedlichen ALT-Aktivitäten gegenüber der nicht-steatotischen Gruppe (ZL-SH) auf (ZF-SH: $45,2 \pm 7,4$ U / l; ZL-SH: $38,0 \pm 4,7$ U / l).

Dagegen führte eine 60minütige Ischämie mit anschließender 120minütiger Reperfusion sowohl in steatotischen (ZF-KO), als auch in normalen (ZL-KO) Lebern zu einem signifikanten Anstieg der ALT-Aktivitäten gegenüber scheinoperierten Tieren (s. Abb. 4.1).

Der direkte Vergleich verfetteter mit nicht-steatotischen Lebern belegte dabei eindrücklich, dass bei einem vergleichbaren I/R-Trauma wesentlich größere Leberzellschäden in verfetteten Lebern auftreten; so konnte in der ZF-KO-Gruppe eine plasmatische ALT-Aktivität von $826,4 \pm 240,2$ U / l ermittelt werden, während die ALT-Aktivität in der ZL-KO-Gruppe lediglich $210,4 \pm 51,2$ U / l betrug ($p < 0,05$).

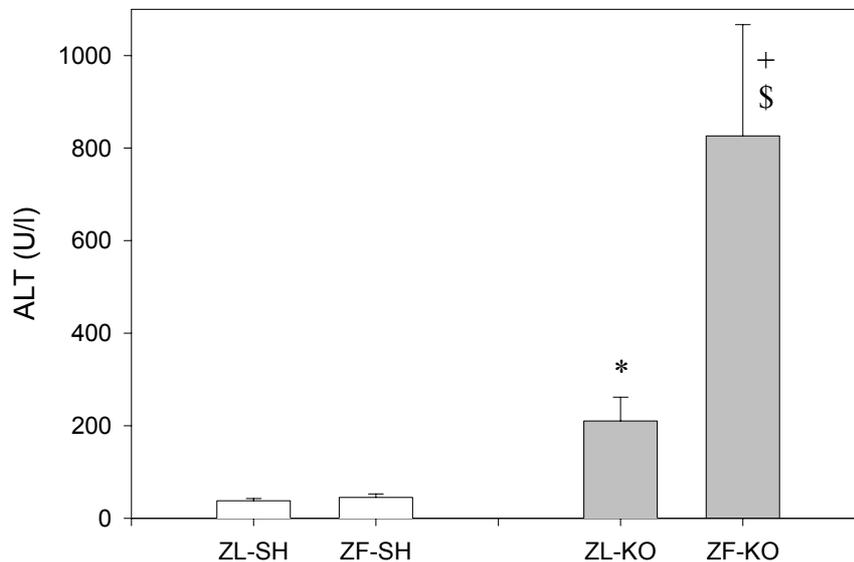


Abb. 4.1: *Plasmatische ALT-Aktivitäten: Ischämie / Reperfusion führte sowohl in steatotischen (ZF-KO) als auch in normalen Lebern (ZL-KO) zu einem signifikanten Anstieg der ALT-Aktivitäten gegenüber scheinoperierten Tieren (ZL-SH bzw. ZF-SH). Dieser Anstieg war in steatotischen Lebern (ZF-KO) deutlich höher ausgeprägt als in normalen Lebern (ZL-KO).*

*MW ± SEM; n = je 6; +p<0.01 vs. ZF-SH; *p<0.05 vs. ZL-SH; \$p<0.05 vs. ZL-KO.*

4.1.2 Ergebnisse der Lichtmikroskopie

Wie unter 3.1.1 erläutert, war es das Ziel dieser Arbeit, Lebern homozygoter Zucker-Ratten mit einem Verfettungsgrad von maximal 60 % zu untersuchen und diese mit normalen Lebern heterozygoter Zucker-Ratten zu vergleichen. Abb. 4.2 zeigt das histologische Bild normaler (a) und verfetteter Lebern (b) von Kontrolltieren. Hepatozyten verfetteter Lebern wiesen gegenüber normalen Lebern mikrovesikuläre Fetteinschlüsse auf. Relevante Unterschiede nach I / R (Kontrolltiere) zwischen normalen und verfetteten Lebern konnten jedoch nicht beobachtet werden und waren angesichts der kurzen Reperfuisionszeit von 120 Minuten auch nicht zu erwarten.

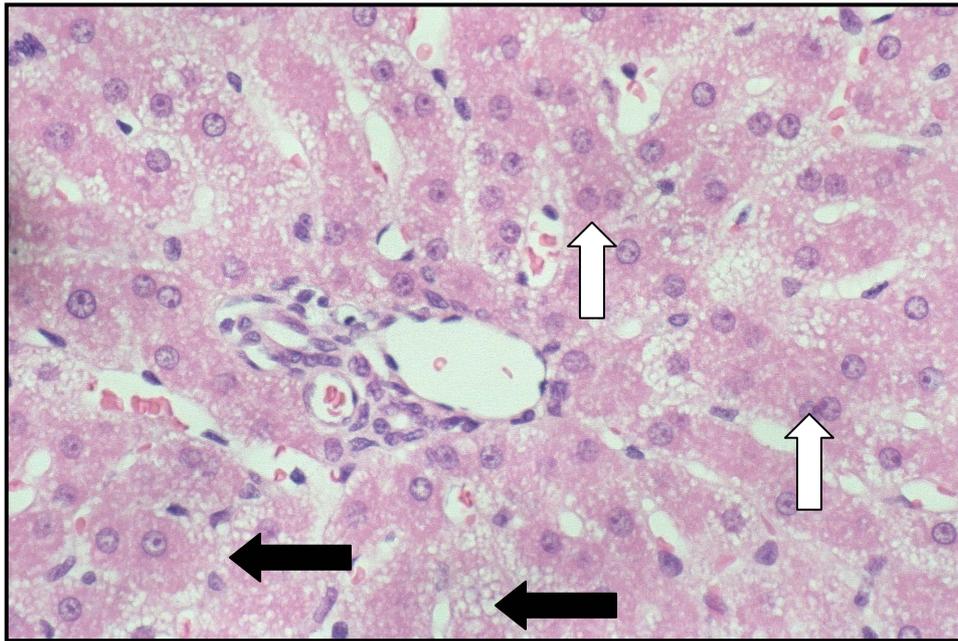


Abb. 4.2.a

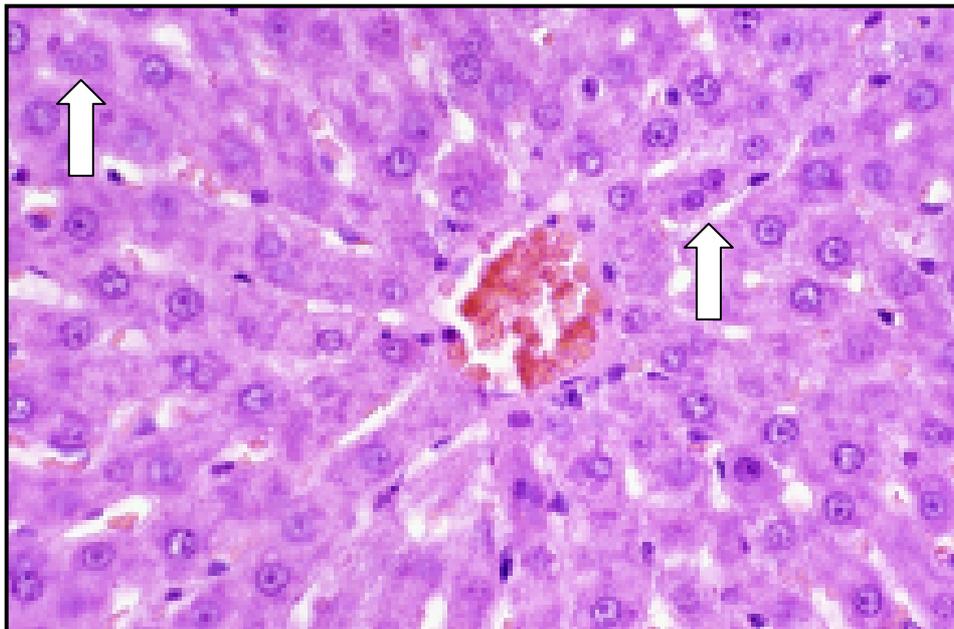


Abb. 4. 2.b

Abb. 4.2a, b: Lichtmikroskopische Aufnahmen (HE-Färbung) einer verfetteten (a) und einer normalen Leber (b) von Kontrolltieren nach Ischämie / Reperfusion. Relevante Unterschiede konnten nicht beobachtet werden. Zu sehen sind mikrovesikuläre Fetteinschlüsse in den Hepatozyten der verfetteten Leber (schwarzer Pfeil) sowie einige Zellen mit zwei Zellkernen als Regenerationszeichen (weißer Pfeil) in normalen und verfetteten Lebern.

4.1.3 Ergebnisse der Elektronenmikroskopie

Entsprechend dem unter 3.3.3.2 beschriebenen Verfahren wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen des linken Leberlappens angefertigt, um morphologische Unterschiede zwischen steatotischen und normalen Lebern auf ultrastruktureller Ebene vergleichen zu können.

Bei Betrachtung normaler Lebern fiel nach Ischämie / Reperfusion (ZL-KO) eine deutliche Vakuolisierung sowie eine Zunahme der Peroxisomenzahl auf (s. Abb. 4.3.b). Diese Veränderungen konnten in normalen Lebern scheinoperierter Tiere (ZL-SH) nicht beobachtet werden (s. Abb. 4.3.a).

Ischämie / Reperfusion manifestierte sich dagegen in den verfetteten Lebern nicht mit einer Vakuolenbildung wie in normalen Lebern, sondern mit einer deutlich ausgeprägteren Schwellung des sinusoidalen Endothels (ZF-KO; s. Abb. 4.3.d, Abb. 4.13.c) gegenüber normalen Lebern. Darüber hinaus konnte in dieser Gruppe ebenfalls eine deutliche Zunahme der Peroxisomenzahl festgestellt werden. Diese morphologischen Veränderungen nach Ischämie / Reperfusion konnten in verfetteten Lebern scheinoperierter Tiere (ZF-SH) nicht festgestellt werden (s. Abb. 4.3.c).

Abb. 4.3.a:

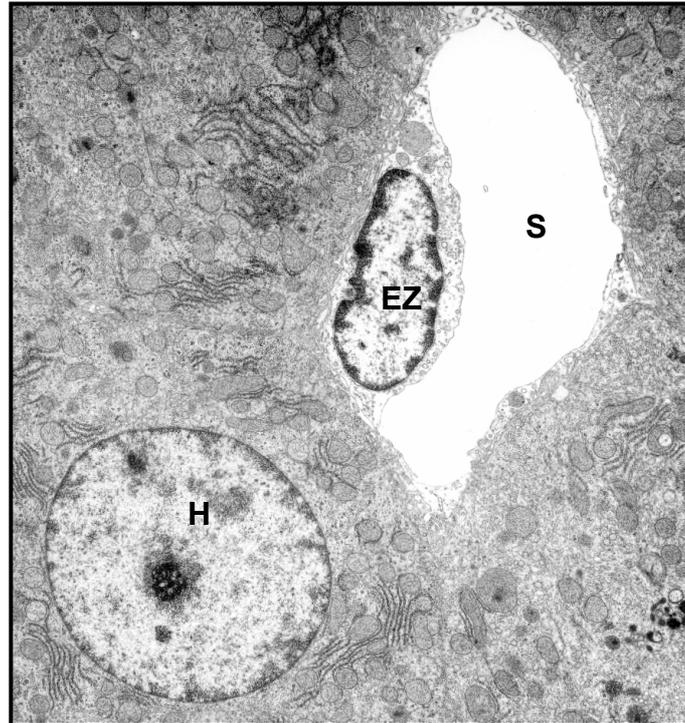


Abb. 4.3.b:

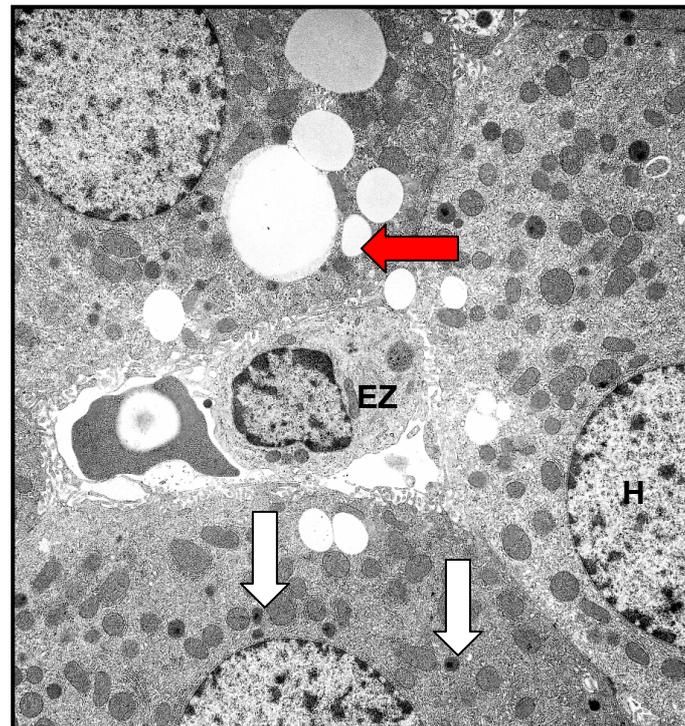


Abb. 4.3.a und b: Elektronenmikroskopische Aufnahmen normaler Lebern scheinoperierter Tiere (a) sowie nach I / R (b): Zu sehen sind eine deutliche Vakuolisierung (roter Pfeil) sowie eine Zunahme der Peroxisomenzahl (weißer Pfeil) nach Ischämie / Reperfusion. Diese morphologischen Veränderungen konnten in normalen Lebern scheinoperierter Tiere nicht beobachtet werden. H = Hepatozyt; EZ = Endothelzelle; S = Sinusoid.

Abb. 4.3.c:

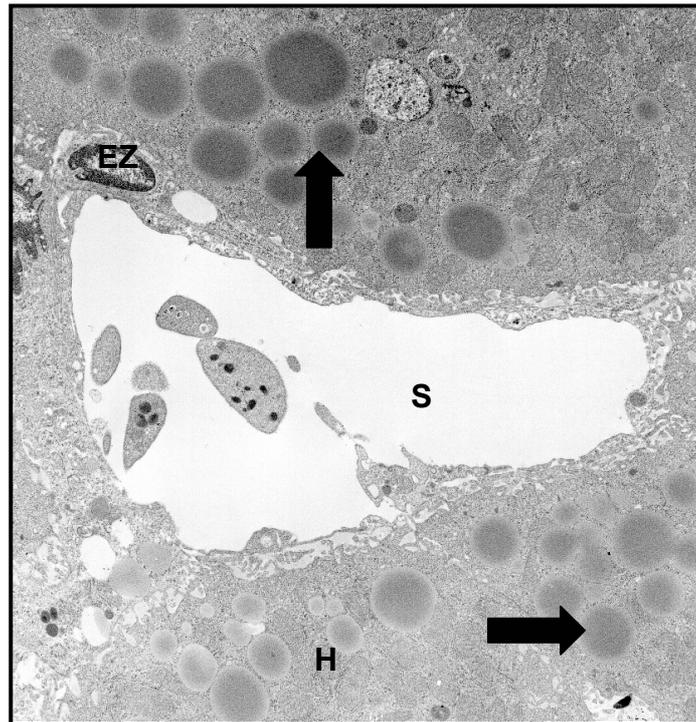


Abb. 4.3.d:

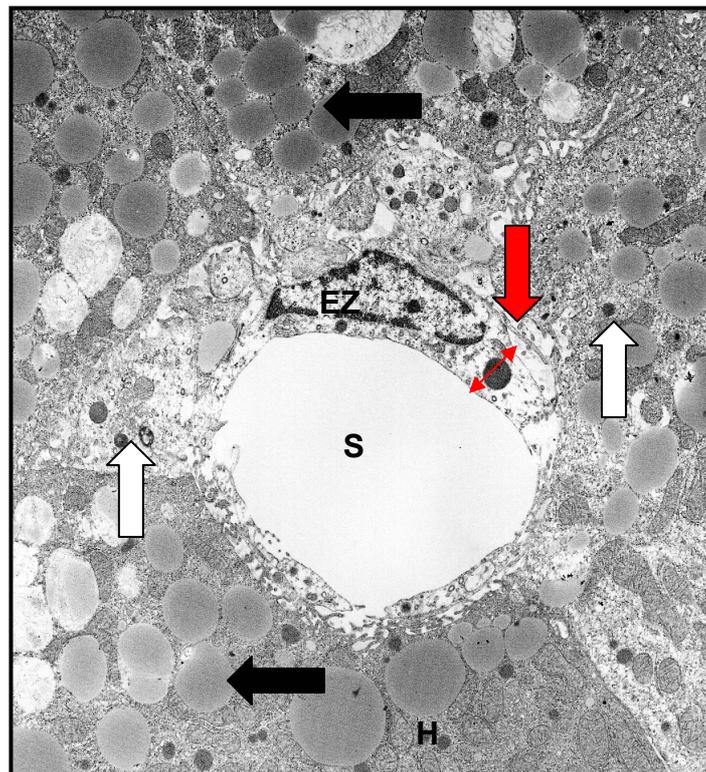


Abb. 4.3.c und d: Elektronenmikroskopische Aufnahmen verfetteter Lebern scheinoperierter Tiere (c) sowie nach I / R (d): Zu sehen sind eine deutliche Endothelzellschwellung (roter Pfeil) sowie eine Zunahme der Peroxisomenzahl (weißer Pfeil) nach I / R, nicht jedoch in scheinoperierten Tieren. Zu erkennen ist darüber hinaus die mikrovesikuläre Verfettung der Hepatozyten in beiden Aufnahmen (schwarzer Pfeil). H = Hepatozyt; EZ = Endothelzelle; S = Sinusoid.

Somit zeigten die Lebern der in dieser Arbeit verwendeten homozygoten Zucker-Ratten sowohl morphologische als auch funktionelle Veränderungen gegenüber nicht- verfetteten Kontrolltieren.

Da mit diesem Modell eine erhöhte Vulnerabilität steatotischer Lebern gegenüber Ischämie / Reperfusion nachweisbar war, stellte sich nun die Frage, inwieweit eine antioxidative Therapie mit GSH in homozygoten Zucker-Ratten wirksam ist.

4.2 PROTEKTIVE EFFEKTE VON GSH IN NORMALEN UND VERFETTETEN LEBERN

4.2.1 Hepatische Mikrozirkulation

30 Minuten nach Beginn der Reperfusionsphase erfolgte die intravitalmikroskopische Untersuchung des ausgelagerten, linken Leberlappens für ca. 30 Minuten (s. 3.5). Dadurch sollte zunächst geklärt werden, ob und in welchem Ausmaß Störungen der postischämischen, mikrovaskulären Perfusion zu den verstärkten Leberzell-Schäden in homozygoten Zucker-Ratten beitragen. Weiterhin war von Interesse, ob und inwieweit GSH zu einer Protektion gegen Mikrozirkulationsstörungen in verfetteten Lebern führt.

4.2.1.1 Sinusoidale Perfusionsrate

Mithilfe des unter 3.3.2.1 beschriebenen Verfahrens wurde in den einzelnen Gruppen der Anteil der nicht-perfundierten Sinusoide in den einzelnen Leberazini bestimmt und in Prozent ausgedrückt.

Scheinoperierte Tiere mit normalen Lebern (ZL-SH) wiesen $7,5 \pm 1,5$ % nicht-perfundierte Sinusoide auf. Nach 60minütiger Ischämie (ZL-KO) nahm während der Reperfusion der Anteil der nicht-perfundierten Sinusoide drastisch zu – insgesamt $29,3 \pm 1,9$ % der beobachteten Sinusoide waren nicht mehr durchblutet ($p < 0.001$).

Intravenös appliziertes GSH, das ab 20 Minuten vor Beginn der Reperfusionphase bis zum Versuchsende kontinuierlich zugeführt wurde, konnte den sinusoidalen Perfusionsausfall signifikant ($p < 0.05$) verringern (ZL-GSH): Hier betrug der Anteil der nicht-perfundierten Sinusoide $8,3 \pm 1,0$ % und lag damit nur noch geringfügig über dem Wert der nicht-ischämischen ZL-SH-Gruppe (s. Abb. 4.4.a).

Ähnliche Verhältnisse konnten in verfetteten Lebern beobachtet werden (s. Abb. 4.4.b): Hier betrug der Anteil der nicht-perfundierten Sinusoide $3,9 \pm 1,2$ % in der scheinoperierten (ZF-SH), $26,3 \pm 1,9$ % in der Kontroll- (ZF-KO) bzw. $7,5 \pm 1,0$ % in der GSH-behandelten Gruppe (ZF-GSH). Das heißt, dass GSH hinsichtlich des Erhalts der sinusoidalen Perfusion auch in verfetteten Lebern äußerst protektiv war (s. Abb. 4.4.b).

Dagegen zeigte der Vergleich der mikrovaskulären Perfusion in den Sinusoiden keine signifikanten Unterschiede in normalen und verfetteten Lebern von Sham- und Kontrolltieren (ZL-SH vs. ZF-SH bzw. ZL-KO vs. ZF-KO). Auch nach GSH-Therapie waren die sinusoidalen Perfusionsraten unabhängig vom Verfettungsgrad der Leber (ZL-GSH vs. ZF-GSH).

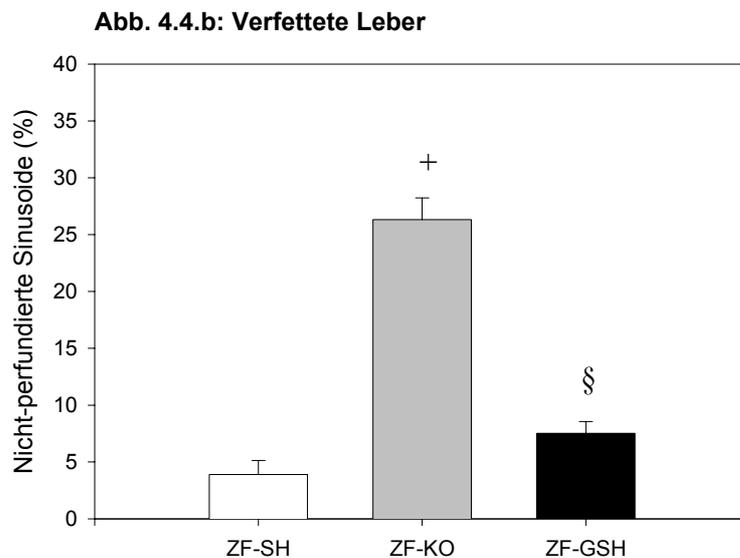
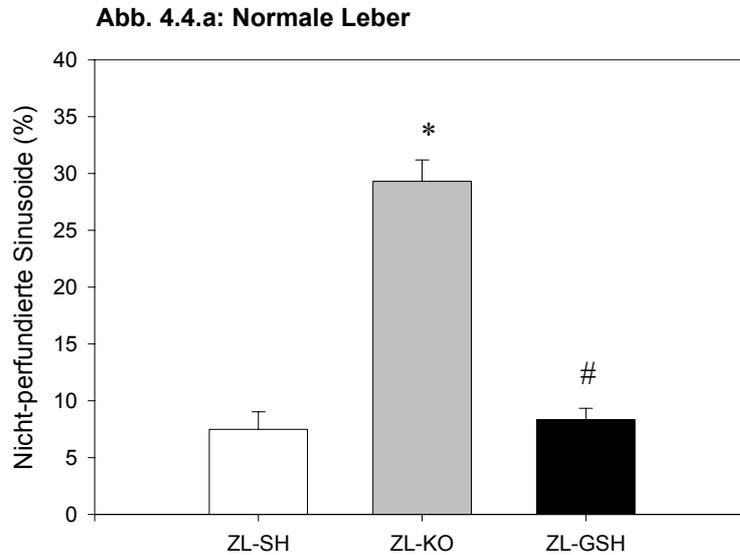


Abb. 4.4.a und b: Anteil der nicht-perfundierten Sinusoide in normalen (a) und verfetteten (b) Lebern: Die durch Ischämie / Reperfusion hervorgerufene Zunahme der nicht-perfundierten Sinusoide (Kontrollgruppen; KO) konnte durch GSH-Applikation (GSH-Gruppen) sowohl in normalen als auch in verfetteten Lebern nahezu vollständig verhindert werden. MW \pm SEM; n = je 6 (ZF-KO: n = 7);

* $p < 0.001$ vs. ZL-SH; # $p < 0.05$ vs. ZL-KO; + $p < 0.001$ vs. ZF-SH; § $p < 0.001$ vs. ZF-KO.

Betrachtet man die Lokalisation der Perfusionsausfälle innerhalb der einzelnen Leberazini entsprechend ihrer zonalen Gliederung (s. Abb. 4.5), so liegt nach Ischämie / Reperfusion sowohl in normalen als auch in verfetteten Lebern im periportalen Bereich (pp) der größte Perfusionsausfall vor (pp: Kontrolle-normal: $33,6 \pm 2,5$ %; Kontrolle-verfettet: $28,5 \pm 2,3$ % nicht-perfundierte Sinusoide).

Gegenüber dem midzonalen Bereich (mz) ist dieser periportale Perfusionsausfall nicht signifikant stärker ausgeprägt (mz: Kontrolle-normal: $30,0 \pm 2,7$ % und Kontrolle-verfettet: $27,8 \pm 2,5$ %), jedoch gegenüber dem Perfusionsausfall im perizentralen Bereich (pz) (pz: Kontrolle-normal: $24,3 \pm 1,7$ % und Kontrolle-verfettet: $22,7 \pm 1,3$ %) sowohl in normalen als auch in verfetteten Lebern.

Im Vergleich zwischen steatotischen und normalen Lebern konnten keine signifikanten Unterschiede bzgl. der Lokalisation der Perfusionsausfälle ermittelt werden. Auch die Verbesserung der Perfusionsrate mittels intravenöser GSH-Zufuhr ergab keine Unterschiede bezüglich des Verteilungsmusters nicht-perfundierter Sinusoide in verfetteten Lebern auf der einen und nicht-verfetteten Lebern auf der anderen Seite.

		Periportal	Midzonal	Perizentral
Sham-Gruppe	Normal	$12,4 \pm 1,3\text{§}$	$6,8 \pm 1,6$	$3,3 \pm 2,3$
	Verfettet	$6,8 \pm 1,1$	$3,7 \pm 1,4$	$1,2 \pm 1,2$
Kontroll-Gruppe	Normal	$33,6 \pm 2,5^*$	$30,0 \pm 2,7$	$24,3 \pm 1,7$
	Verfettet	$28,5 \pm 2,3\#$	$27,8 \pm 2,5$	$22,7 \pm 1,3$
GSH-Gruppe	Normal	$12,4 \pm 2,4$	$6,7 \pm 1,0$	$5,9 \pm 1,2$
	Verfettet	$10,2 \pm 2,6$	$7,3 \pm 1,7$	$5,1 \pm 1,1$

Abb. 4.5: Die Tabelle zeigt die nicht-perfundierten Sinusoide in Prozent aller Sinusoide entsprechend der zonalen Gliederung des Leberazinus (periportal, midzonal, perizentral) in normalen und verfetteten Lebern.

MW \pm SEM; * $p < 0.05$ vs. Kontrolle-normal (pz); # $p < 0.05$ vs. Kontrolle-verfettet (pz); § $p < 0.05$ vs. Sham-normal (mz).

4.2.1.2 Lobuläre Leukozyten-Adhärenz

Während der Reperfusionphase normotherm ischämischer Lebern führen unterschiedlichste Mechanismen (s. 1.2) zur Rekrutierung und Adhäsion von Leukozyten, im Wesentlichen daher von polymorphkernigen, neutrophilen Granulozyten (PMN). Diese tragen zur Ausbildung des IRS entscheidend bei. Mithilfe des unter 3.3.2.1 beschriebenen Verfahrens wurde die Anzahl der permanent adhärennten Leukozyten („sticker“) pro Leberlobulus bestimmt.

Normale Lebern wiesen ohne Ischämie / Reperfusion (ZL-SH) eine mittlere Anzahl von $19,1 \pm 7,3$ Leukozyten pro Lobulus auf (s. Abb. 4.6.a). Nach Ischämie / Reperfusion (ZL-KO) kam es im Zuge der Leukozyten-Rekrutierung zu einem signifikanten Anstieg der Leukozyten-Adhärenz ($p < 0.001$). Im Mittel wurden hier $144,9 \pm 12,0$ adhärennte Leukozyten pro Leberlobulus bestimmt. Diese Zunahme konnte durch eine GSH-Behandlung (ZL-GSH) signifikant ($p < 0.05$) um etwa 50 % auf $72,7 \pm 2,6$ adhärennte Leukozyten pro Leberlobulus vermindert werden (s. Abb. 4.6.a).

In verfetteten Lebern wurden ohne Ischämie / Reperfusion $26,1 \pm 3,1$ am sinusoidalen Endothel adhärennte Leukozyten bestimmt. Eine 60minütige Ischämie führte während der Reperusionsphase (ZF-KO) zu einer vergleichbaren, signifikanten ($p < 0.01$) Steigerung der lobulären Leukozyten-Adhärenz ($162,3 \pm 8,1$), die durch die intravenöse Applikation von GSH (ZF-GSH) signifikant ($p < 0.001$) reduziert werden konnte ($69,7 \pm 10,2$). Siehe hierzu auch Abb. 4.6.b.

Im direkten Vergleich zwischen steatotischen und normalen Lebern konnten sowohl zwischen den korrespondierenden Sham-, als auch zwischen den Kontrollgruppen keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Auch der Vergleich zwischen den GSH-behandelten Gruppen zeigte keine Veränderung des protektiven Potentials von GSH in den moderat verfetteten Lebern.

Abb. 4.6.a: Normale Leber

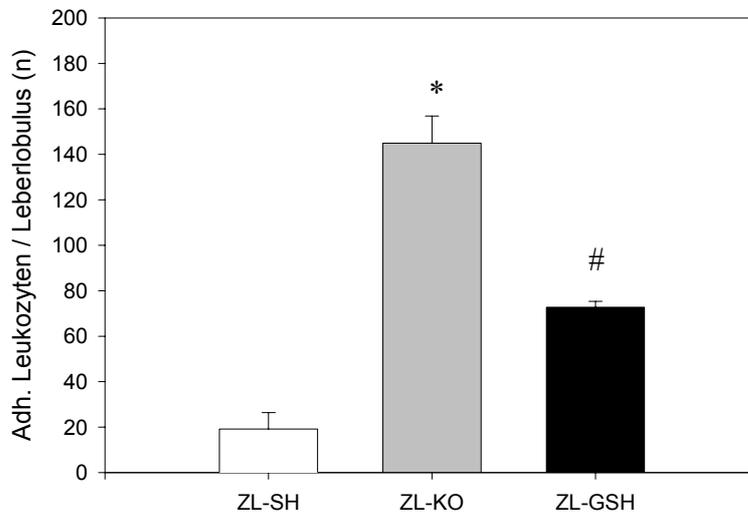


Abb. 4.6.b: Verfettete Leber

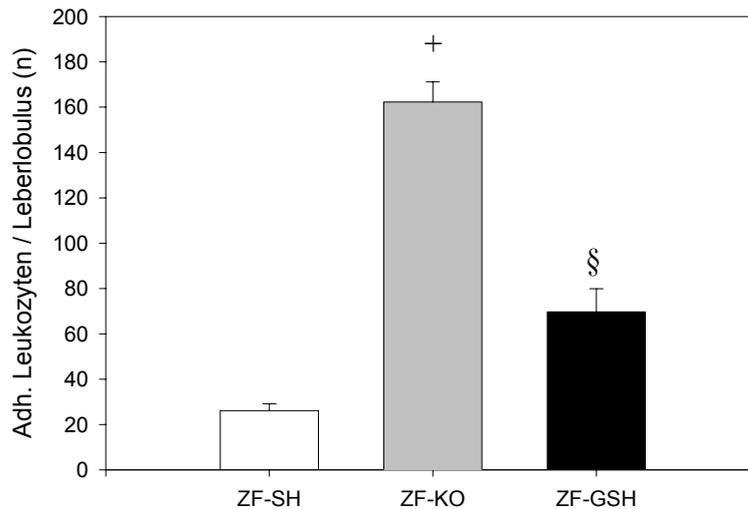


Abb. 4.6.a und b: Permanent adhärenente Leukozyten („sticker“) pro Leberlobulus in normalen (a) und verfetteten (b) Lebern: Ischämie / Reperfusion führte zu einer signifikanten Steigerung der Leukozyten-Adhärenz in normalen und verfetteten Lebern, die durch i. v. Zufuhr von GSH drastisch reduziert werden konnte.

MW ± SEM; n = je 6 (ZF-KO: n = 7);

*p<0.001 vs. ZL-SH; #p<0.01 vs. ZL-KO; +p<0.01 vs. ZF-SH; §p<0.001 vs. ZF-KO.

4.2.1.3 Leukozyten-Adhärenz in postsinusoidalen Venolen (PSV)

4.2.1.3.1 Permanente Leukozyten-Adhärenz in PSV („Sticker“)

Zur Quantifizierung der Leukozyten-Adhärenz in PSV – bezogen auf die endotheliale Oberfläche (mm^2) – wurde entsprechend des unter 3.3.2.1 beschriebenen Verfahrens vorgegangen. Permanent adhärenente Leukozyten („Sticker“) waren dabei als solche definiert, die über einen Beobachtungszeitraum von mindestens 20 Sekunden am Endothel der PSV adhären waren.

In PSV nicht-steatotischer Lebern konnten in scheinoperierten Tieren (ZL-SH) 66 ± 14 Sticker / mm^2 Endotheloberfläche bestimmt werden. Nach Ischämie / Reperfusion erhöhte sich diese Anzahl signifikant ($p < 0.001$) auf 469 ± 35 Sticker / mm^2 (ZL-KO). Durch intravenöse Zufuhr von GSH konnte das Ausmaß permanent adhärenter Leukozyten drastisch ($p < 0.001$) auf 181 ± 26 Sticker / mm^2 gesenkt werden (ZL-GSH). Siehe hierzu auch Abb. 4.7.a.

In PSV steatotischer Lebern, die keiner Ischämie / Reperfusion unterzogen wurden (ZF-SH), konnten 76 ± 26 Sticker / mm^2 endothelialer Oberfläche bestimmt werden. Auch hier wurde die permanente Leukozyten-Adhärenz nach Ischämie / Reperfusion (ZF-KO) signifikant ($p < 0.05$) auf 718 ± 105 Sticker / mm^2 erhöht. Dieser Anstieg konnte durch die bereits beschriebene GSH-Behandlung (ZF-GSH) ebenfalls drastisch gesenkt werden ($p < 0.05$), so dass nur noch 200 ± 16 Sticker / mm^2 Endotheloberfläche bestimmt wurden (s. Abb. 4.7.b).

Dagegen zeigte der Vergleich der permanenten Leukozyten-Adhärenz in PSV keine signifikanten Unterschiede zwischen normalen und verfetteten Lebern innerhalb der Sham- (ZL-SH vs. ZF-SH) und Kontrollgruppen (ZL-KO vs. ZF-KO). Auch nach intravenöser GSH-Therapie stellte sich die permanente Leukozyten-Adhärenz in PSV unabhängig vom Verfettungsgrad der Leber dar (ZL-GSH vs. ZF-GSH).

Abb. 4.7.a: Normale Leber

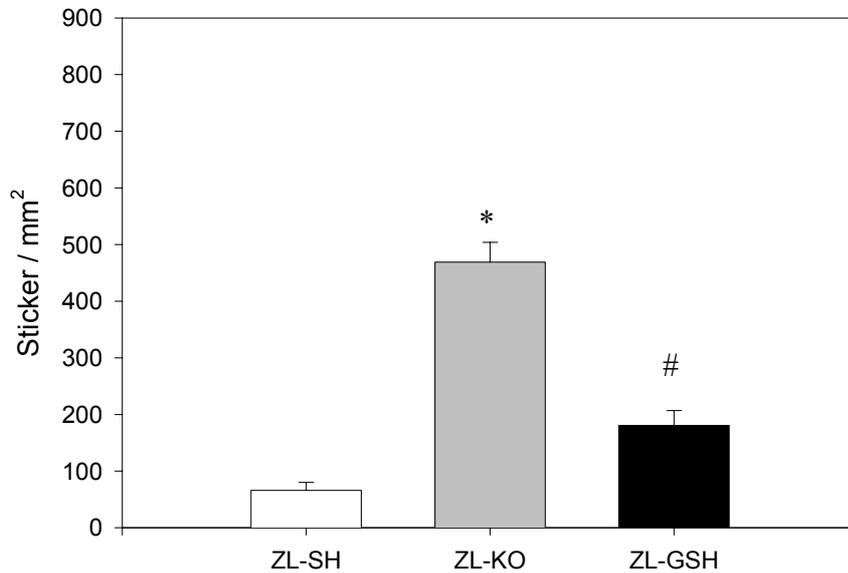


Abb. 4.7.b: Verfettete Leber

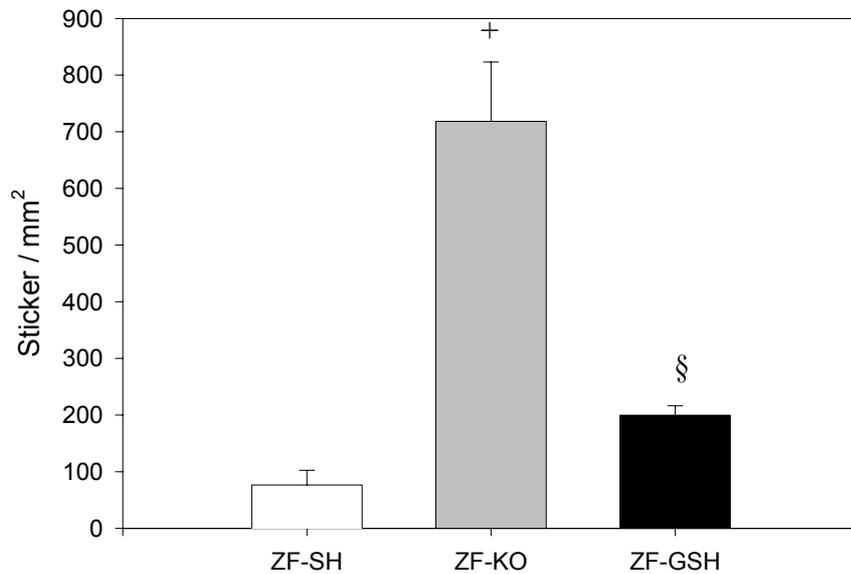


Abb. 4.7. a und b: *Permanent adhärenente Leukozyten („Sticker“) / mm² endothelialer Oberfläche in PSV normaler (a) und verfetteter (b) Lebern: Nach Ischämie / Reperfusion erfolgte gegenüber scheinoperierten Tieren ein signifikanter Anstieg von Stickern pro mm² in normalen und verfetteten Lebern, der durch GSH-Applikation drastisch reduziert werden konnte. MW ± SEM; n = je 6;*

**p<0.001 vs. ZL-SH; #p<0.001 vs. ZL-KO; +p<0.05 vs. ZF-SH; §p<0.05 vs. ZF-KO.*

4.2.1.3.2 Temporäre Leukozyten-Adhärenz in PSV („Roller“)

Im Gegensatz zu permanent adhärenenten Leukozyten waren temporär adhärenente Leukozyten weniger als 20 Sekunden am Endothel der PSV adhärenent und zeigten während des Beobachtungszeitraums ein „Roller“ entlang der PSV-Wand.

In normalen Lebern konnten in der Sham-Gruppe (ZL-SH) 154 ± 23 Roller / mm^2 Endotheloberfläche bestimmt werden. Ischämie / Reperfusion (ZL-KO) führte zu einer drastischen ($p < 0.05$) Erhöhung dieser temporären Leukozyten-Adhärenz (650 ± 62 Roller / mm^2). Durch eine Behandlung der normalen Lebern mit GSH (ZL-GSH) konnte dieser Anstieg signifikant ($p < 0.001$) auf 312 ± 32 Roller / mm^2 endothelialer Oberfläche vermindert werden (s. Abb. 4.8.a).

In PSV verfetteter Lebern wurden ohne Ischämie / Reperfusion (ZF-SH) 236 ± 38 Roller / mm^2 endothelialer Oberfläche bestimmt. Eine 60minütige Ischämie führte während der Reperfusion zu einem signifikanten ($p < 0.001$) Anstieg auf 613 ± 35 Roller / mm^2 . Dieser Anstieg der temporären Leukozyten-Adhärenz konnte durch eine GSH-Behandlung (ZF-GSH) wiederum drastisch ($p < 0.001$) auf 363 ± 40 Roller / mm^2 Endotheloberfläche reduziert werden (s. Abb. 4.8.b).

Die Anzahl der Roller in PSV war dabei unabhängig vom Verfettungsgrad der Leber: Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen normalen und verfetteten Lebern sowohl in Sham- (ZL-SH vs. ZF-SH) als auch in Kontrolltieren (ZL-KO vs. ZF-KO) erhoben werden. Darüber hinaus zeigte auch der protektive Effekt einer GSH-Behandlung keine drastischen Unterschiede zwischen nicht-verfetteten und verfetteten Lebern.

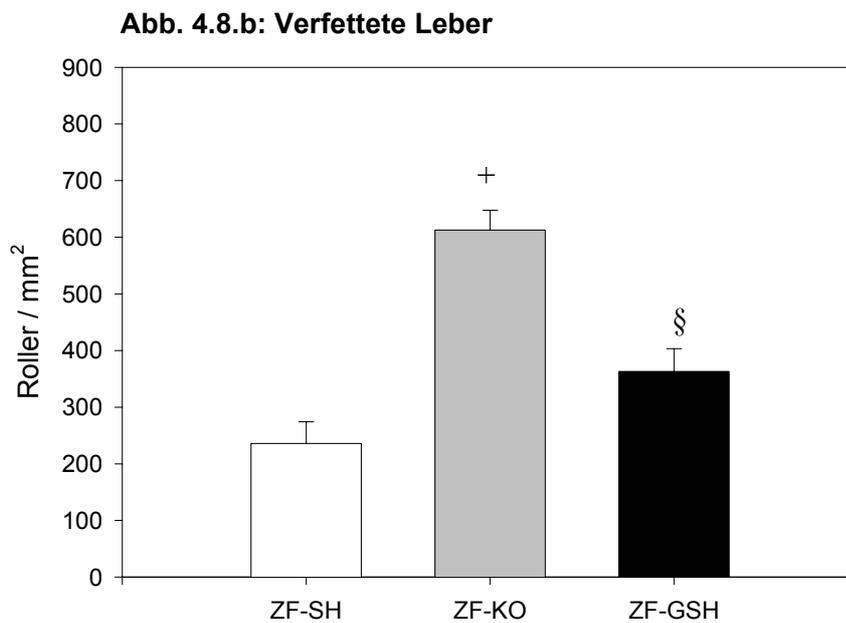
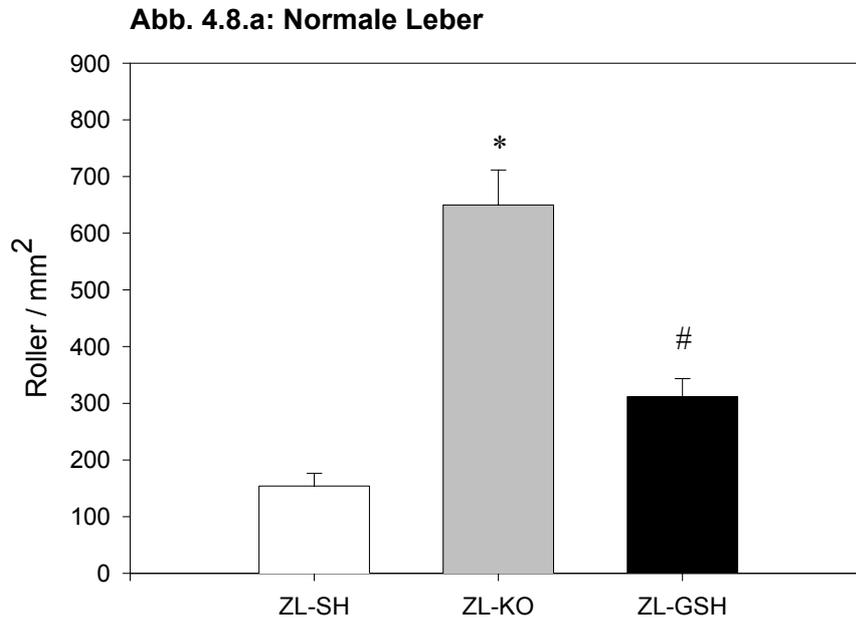


Abb. 4.8.a und b: Temporär adhärenente Leukozyten („Roller“) / mm² endothelialer Oberfläche in PSV normaler (a) und verfetteter (b) Lebern: Ischämie / Reperfusion führte gegenüber scheinoperierten Tieren zu einer signifikanten Steigerung von Rollern pro mm² in normalen und verfetteten Lebern. Dieser Anstieg konnte durch intravenöse GSH-Zufuhr drastisch reduziert werden.

MW ± SEM; n = je 6 (ZF-KO: n = 7);

*p<0.05 vs. ZL-SH; #p<0.001 vs. ZL-KO; +p<0.001 vs. ZF-SH; §p<0.001 vs. ZF-KO.

4.2.1.3.3 Bestimmung des Verhältnisses von Stickern zu Rollern in PSV

Leukozyten-„Rolling“ ist das initiale Ereignis, bevor die Leukozyten am Gefäßendothel fest adhären werden und durch deren Akkumulation und Infiltration in das Gewebe entscheidend zum hepatischen IRS beitragen (Jaeschke H, 1990a; Menger MD, 1992; Marzi I, 1993; Suzuki H, 1994). Daher stellte sich die Frage, inwieweit das Verhältnis von Stickern zu Rollern durch Ischämie / Reperfusion bzw. GSH-Behandlung moduliert wird.

Normale Lebern wiesen dabei ohne Ischämie / Reperfusion (Sham-lean) ein Verhältnis von $0,51 \pm 0,10$ auf, d. h. dass die Anzahl der Roller ca. der doppelten Anzahl an Stickern in scheinoperierten Tieren entsprach. Nach Ischämie / Reperfusion (Kontrolle-lean) kam es zu einem signifikanten ($p < 0,05$) Anstieg dieses Quotienten auf $0,86 \pm 0,10$. Ischämie / Reperfusion vermittelt über verschiedene Mediatoren eine Aktivierung von Leukozyten sowie eine Expression von Adhäsionsmolekülen auf Leukozyten und Endothelzellen (Jaeschke H, 1993b; Vollmar B, 1995). Die Folge ist eine Erhöhung der permanenten Leukozyten-Adhärenz („sticking“) am sinusoidalen Endothel, die an der Zunahme des Quotienten „Sticker zu Roller“ ersichtlich wird. Eine intravenöse GSH-Applikation (GSH-lean) konnte diesen Anstieg drastisch ($p < 0,05$) reduzieren. Der Quotient „Sticker zu Roller“ betrug in GSH-behandelten Tieren mit normalen Lebern nur noch $0,59 \pm 0,07$ (s. Abb. 4.9).

In verfetteten Lebern scheinoperierter Tiere (Sham-fat) wurde ein Sticker/Roller-Quotient von $0,34 \pm 0,07$ ermittelt. Auch in diesen verfetteten Lebern führte die Ischämie / Reperfusion (Kontrolle-fat) zu einem deutlichen ($p < 0,001$) Anstieg dieses Quotienten auf $1,65 \pm 0,23$, der durch die GSH-Behandlung (GSH-fat) verhindert werden konnte ($p < 0,05$). Der Sticker/Roller-Quotient betrug in der GSH-fat-Gruppe $0,67 \pm 0,07$ (s. Abb. 4.9).

Als entscheidendes Ergebnis muss dabei die signifikant ($p < 0,05$) höhere Zunahme des Sticker/Roller-Quotienten nach I / R in verfetteten Lebern gegenüber normalen

Lebern festgehalten werden (Kontrolle-lean vs. Kontrolle-fat). Während Kontrolltiere mit normalen Lebern anteilmäßig noch mehr Roller als Sticker aufwiesen (Kontrolle-lean: $0,86 \pm 0,10$), überwogen in der Kontrollgruppe mit verfetteten Lebern eindeutig die permanent adhärennten Leukozyten (Kontrolle-fat: $1,65 \pm 0,23$).

Abb. 4.9: Normale (lean) und verfettete (fat) Lebern

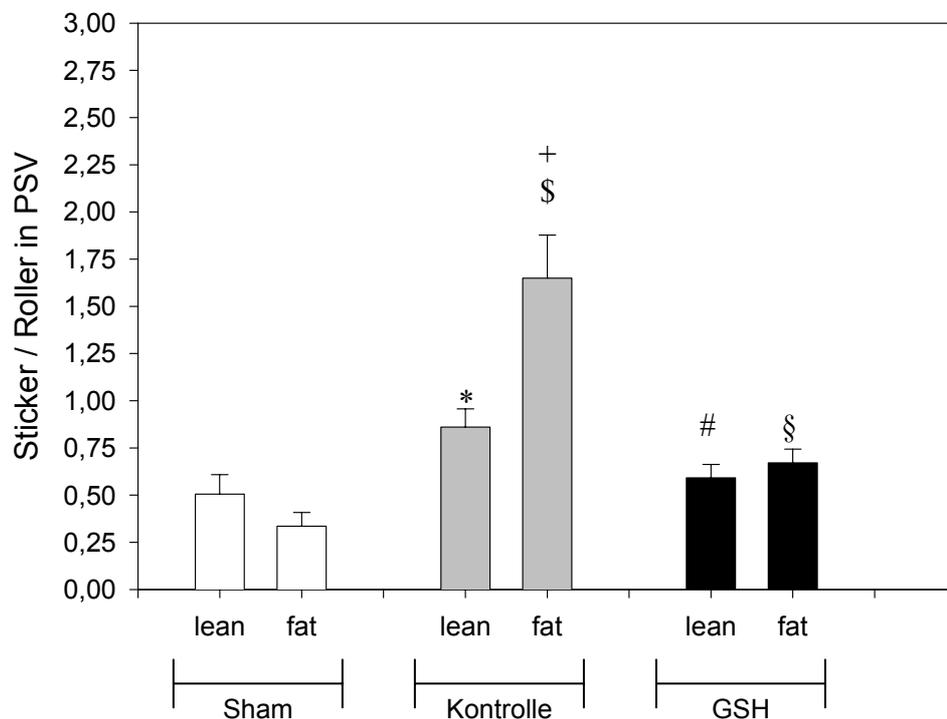


Abb. 4.9: Verhältnis zwischen Stickern und Rollern in normalen (lean) und verfetteten (fat) Lebern: Ischämie / Reperfusion führte in normalen Lebern (Kontrolle-lean) sowie in verfetteten Lebern (Kontrolle-fat) zu einem signifikanten Anstieg des Quotienten „Sticker / Roller“ gegenüber scheinoperierten Tieren (Sham-lean und -fat). Dieser Anstieg fiel in verfetteten Lebern gegenüber normalen Lebern deutlich höher aus. Durch eine GSH-Behandlung konnte der Quotient sowohl in normalen Lebern (GSH-lean) als auch in verfetteten Lebern (GSH-fat) drastisch gesenkt werden.

MW \pm SEM; n = je 6; *p<0.05 vs. Sham-lean; +p<0.001 vs. Sham-fat; \$p<0.05 vs. Kontrolle-lean; #p<0.05 vs. Kontrolle-lean; §p<0.05 vs. Kontrolle-fat.

4.2.1.4 Einfluss von I / R und GSH auf die Sinusoidweite

Zur Quantifizierung möglicher Unterschiede der Sinusoidweiten zwischen verfetteten und normalen Lebern sowie unter GSH-Applikation wurde entsprechend dem unter 3.3.2.2 beschriebenen Verfahren vorgegangen.

Ohne Ischämie / Reperfusion (ZL-SH) wiesen nicht-steatotische, normale Lebern eine mittlere Sinusoidweite von $8,75 \pm 0,20 \mu\text{m}$ im midzonalen Bereich der Leberazini auf. Ischämie / Reperfusion führte zu einer signifikanten ($p < 0.001$) Reduktion des sinusoidalen Durchmessers, so dass in der ZL-KO-Gruppe eine mittlere, midzonale Sinusoidweite von $6,17 \pm 0,09 \mu\text{m}$ gemessen wurde. Die intravenöse GSH-Behandlung (ZL-GSH) führte dagegen erneut zu einer drastischen ($p < 0.001$) Erweiterung und damit vollständigen Erholung der midzonalen Sinusoidweite ($9,32 \pm 0,23 \mu\text{m}$) (s. Abb. 4.10.a).

Unter den Bedingungen einer Scheinoperation (ZF-SH) konnte in steatotischen Lebern eine mittlere, midzonale Sinusoidweite von $9,50 \pm 0,37 \mu\text{m}$ festgestellt werden. Diese nahm nach Ischämie / Reperfusion (ZF-KO) ebenfalls signifikant ($p < 0.001$) auf $6,68 \pm 0,22 \mu\text{m}$ ab und wurde durch die GSH-Behandlung (ZF-GSH) wiederum drastisch ($p < 0.001$) verbessert. In der ZF-GSH-Gruppe betrug die mittlere, midzonale Sinusoidweite dann $9,68 \pm 0,39 \mu\text{m}$ (s. Abb. 4.10.b).

Im direkten Vergleich zwischen den korrespondierenden Sham, Kontroll- und GSH-Gruppen in normalen (ZL) und verfetteten Lebern (ZF) konnten allerdings keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Der sinusoidale Durchmesser zeigte sich daher sowohl in scheinoperierten Tieren als auch nach I/R bzw. unter GSH-Behandlung unabhängig vom Verfettungsgrad der Leber.

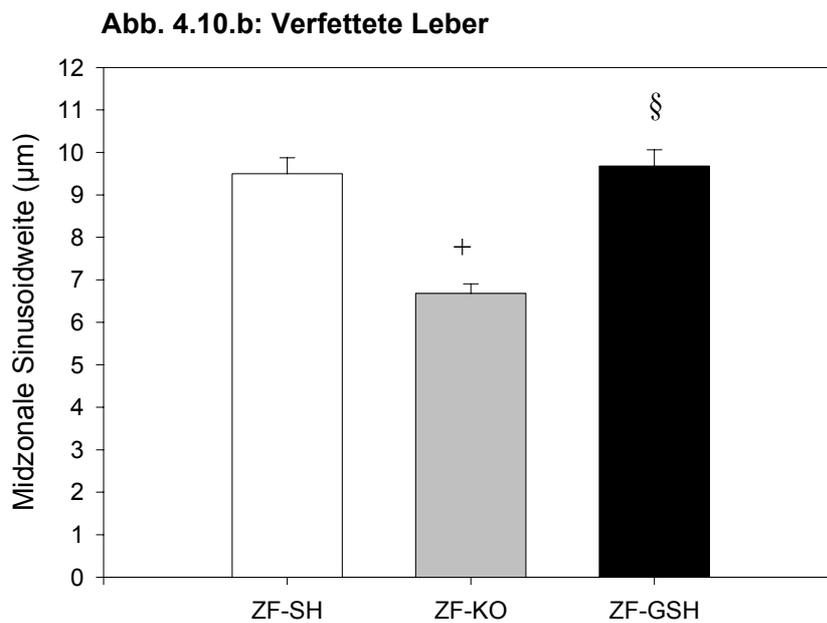
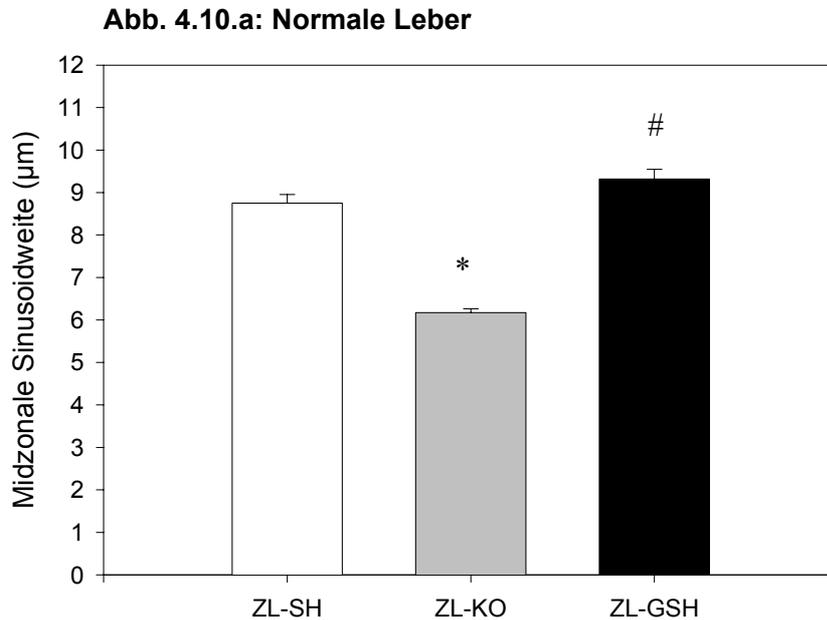


Abb. 4.10.a und b: Mittlere, midzonale Sinusoidweite (μm) in normalen (a) und verfetteten (b) Lebern: Gegenüber den scheinoperierten Tieren (SH) kam es nach Ischämie / Reperfusion (KO) zu einer signifikanten Reduktion der mittleren Sinusoidweite. Nach GSH-Behandlung (GSH) konnte wiederum ein drastischer Anstieg gegenüber den Kontrollgruppen festgestellt werden.

MW \pm SEM; n = je 6 (ZL-KO: n = 7; ZF-KO: n = 8);

* $p < 0.001$ vs. ZL-SH; # $p < 0.001$ vs. ZL-KO; + $p < 0.001$ vs. ZF-SH; § $p < 0.001$ vs. ZF-KO.

4.2.1.5 Postischämische Phagozytose-Aktivität der Kupffer-Zellen (KC)

KC spielen bei der Genese vor allem früher Reperfusionsschäden eine wichtige Rolle (s. 1.2). Andererseits ist eine intakte, physiologische KC-Funktion in der frühen postischämischen Phase wichtig, da zu diesem Zeitpunkt z. B. während der Ischämie angefallene Endotoxine effektiv eliminiert werden müssen (Bouwens L, 1992). Um nun die Funktion von KC zu bestimmen, wurde – wie unter 3.3.2.3 beschrieben – deren Phagozytose-Aktivität gemessen. Je mehr frei bewegliche bzw. je weniger an Sinusoiden adhärenente Latexpartikel beobachtet werden konnten, desto weniger KC waren phagozytotisch aktiv (Praaning – Van Dalen DP, 1982; Dan C, 1985).

In normalen Lebern wurden nach einer Scheinoperation (ZL-SH) $20,9 \pm 2,1$ % nicht-adhärenente Latexpartikel (NALP) fünf Minuten nach deren Injektion bestimmt. Ischämie / Reperfusion (ZL-KO) führte zu einer nicht-signifikanten Abnahme dieses Anteils an NALP ($14,7 \pm 3,6$ %). Durch die intravenöse GSH-Applikation (ZL-GSH) konnte die Anzahl von NALP gegenüber der Kontrollgruppe wiederum nicht-signifikant gesteigert werden ($24,48 \pm 3,92$ %). Siehe hierzu auch Abb. 4.11.a.

Verfettete Lebern wiesen ohne Ischämie / Reperfusion (ZF-SH) einen mittleren Anteil an nicht-adhärenenten Latexpartikeln (NALP) von $29,2 \pm 5,4$ % auf. In Lebern der Kontrollgruppe (ZF-KO) wurden nach Ischämie / Reperfusion $11,5 \pm 1,1$ % NALP festgestellt. Hier handelte es sich um eine gegenüber ZF-SH signifikante ($p < 0,05$) Abnahme des Anteils an NALP, d. h. dass drastisch weniger Latexpartikel frei beweglich und statt dessen an KC adhärenent bzw. von diesen phagozytiert worden waren. Durch die GSH-Behandlung (ZF-GSH) konnte der Anteil an NALP gegenüber der Kontrollgruppe wiederum etwas (nicht-signifikant) gesteigert werden ($19,66 \pm 4,27$ % NALP 5 Minuten nach Injektion). Siehe hierzu auch Abb. 4.11.b.

Der Vergleich des Anteils an NALP zeigte dabei keine signifikanten Unterschiede in normalen und verfetteten Lebern von Sham- und Kontrolltieren (ZL-SH vs. ZF-SH; ZL-KO vs. ZF-KO). Auch nach GSH-Therapie war der Anteil an NALP unabhängig vom Verfettungsgrad der Leber (ZL-GSH vs. ZF-GSH).

Abb. 4.11.a: Normale Leber

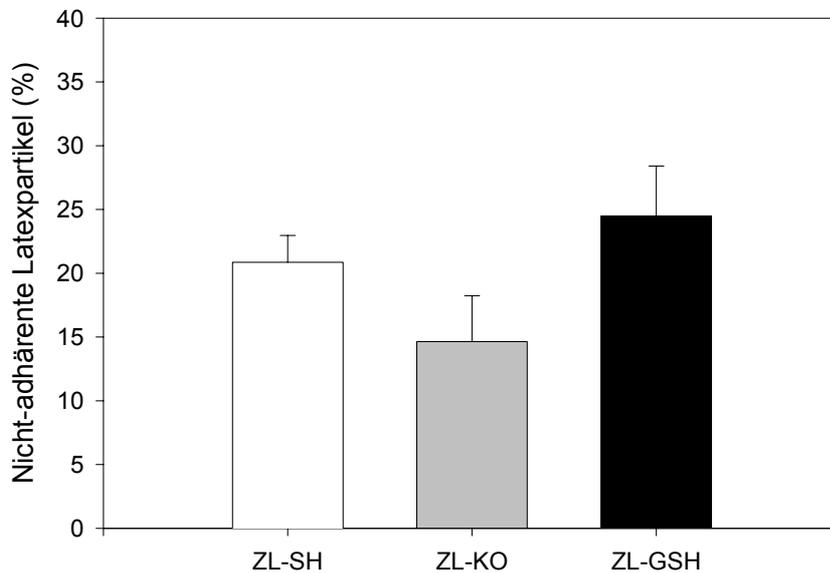


Abb. 4.11.b: Verfettete Leber

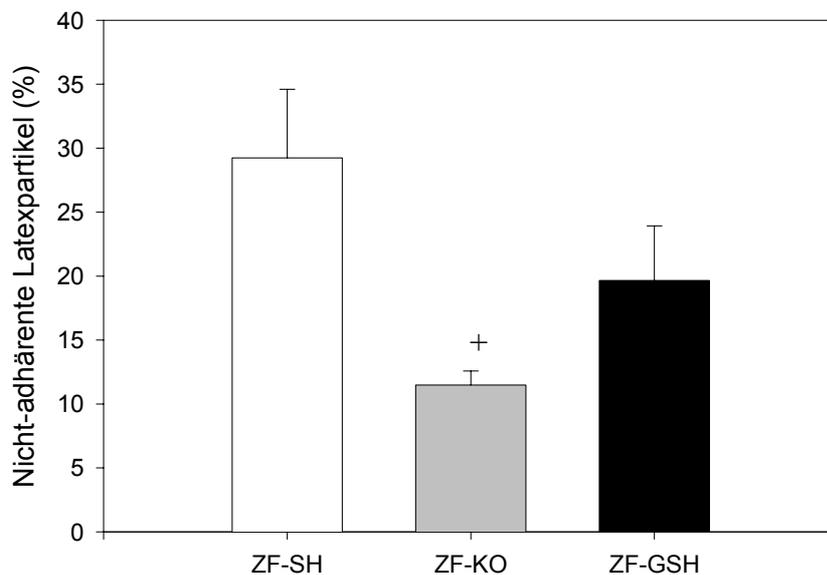


Abb. 4.11.a und b: Anteil nicht-adhärenter Latexpartikel (NALP) in Prozent 5 Minuten nach Injektion in normalen (a) und verfetteten (b) Lebern: Ischämie / Reperfusion führte nur in verfetteten Lebern zu einer signifikanten Abnahme des Anteils NALP gegenüber scheinoperierten Tieren. Die GSH-Behandlung führte sowohl in normalen als auch in verfetteten Lebern nur zu einer geringen, jedoch nicht-signifikanten Steigerung des Anteils an NALP gegenüber der Kontrollgruppe. MW ± SEM; n = je 6; +p<0.05 vs. ZF-SH.

4.3 EINFLUSS VON GSH AUF PARENCHYMALE UND NICHT-PARENCHYMALE SCHÄDEN NORMALER UND VERFETTETER LEBERN

Zur Abschätzung der postischämischen, hepatozellulären Integrität wurde die leberspezifische ALT-Aktivität bestimmt. Zusätzlich erfolgte die Anfertigung elektronenmikroskopischer Aufnahmen, um morphologische Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen zu eruieren. Auf die morphologischen Untersuchungen sowie auf die Bestimmung der ALT-Serumspiegel in den Sham- und Kontrollgruppen wurde bereits bei der Charakterisierung des Fettlebermodells (s. 4.1) eingegangen. Daher sollen an dieser Stelle nur die Effekte der GSH-Behandlung auf die ALT-Spiegel sowie auf morphologische Veränderungen behandelt werden.

4.3.1 Bestimmung der Alanin-Aminotransferase (ALT)

Entsprechend dem unter 3.3.3.1 beschriebenen Verfahren wurde nach 60 Minuten Ischämie und einer anschließenden 120minütigen Reperfusionphase die Aktivität der ALT (GPT) im Serum bestimmt. Die ALT stellt ein leberspezifisches Enzym dar und korreliert gut mit dem Ausmaß des frühen, hepatozellulären Schadens (Clary JJ, 1973).

In diesem Zusammenhang war es möglich, den signifikanten Anstieg der ALT-Aktivität nach Ischämie / Reperfusion (Kontrolle-lean) in normalen Lebern durch die intravenöse GSH-Zufuhr (GSH-lean) signifikant ($p < 0.01$) zu senken. Dies bestätigte die Ergebnisse früherer Untersuchungen aus der eigenen Forschungsgruppe (Schauer RJ, 2000a). Betrug die mittlere, plasmatische ALT-Aktivität in der Kontrollgruppe (Kontrolle-lean) noch 210 ± 51 U / l, so erreichte die Gruppe unter GSH-Behandlung eine mittlere ALT-Konzentration von 73 ± 7 U / l (s. Abb. 4.12).

In der Versuchsgruppe mit verfetteten Lebern waren nach Ischämie / Reperfusion (Kontrolle-fat) Leberzellschäden verstärkt nachzuweisen (826 ± 240 U / l) ($p < 0.05$ vs. Kontrolle-lean). Durch kontinuierlich intravenös zugeführtes GSH (GSH-fat) war auch

in diesen verfetteten Lebern eine signifikante Protektion möglich, da hierdurch die ALT-Aktivität auf 190 ± 61 U / l reduziert werden konnte ($p < 0.05$ vs. Kontrolle-fat). Siehe hierzu auch Abb. 4.12.

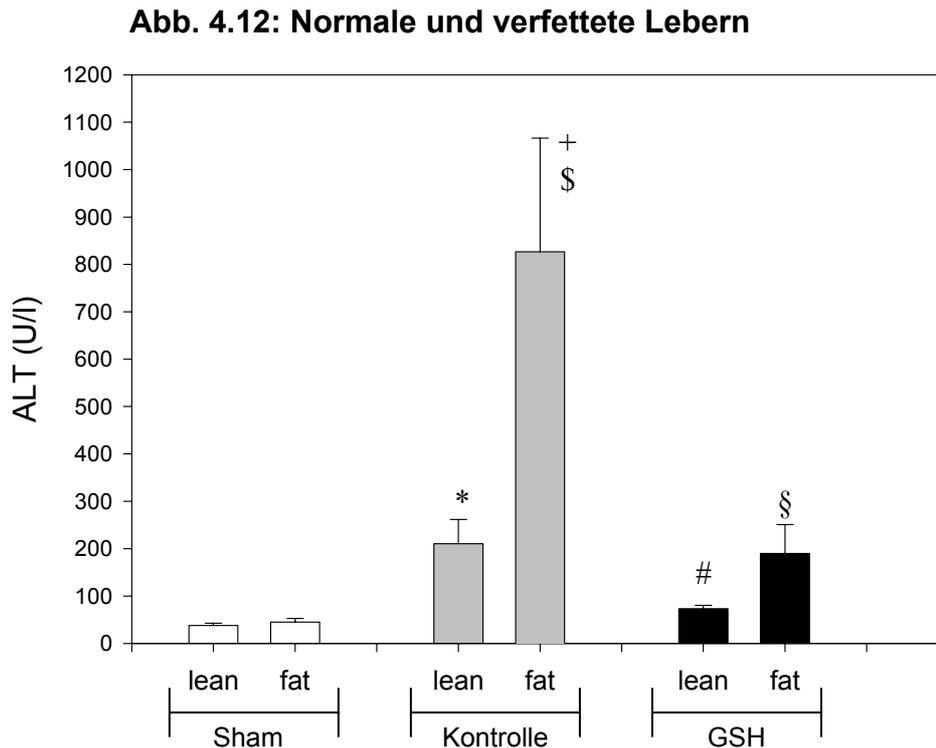


Abb. 4.12: *Plasmatische ALT-Aktivitäten in Tieren mit normalen (lean) und verfetteten (fat) Lebern: Ischämie / Reperfusion führte in normalen Lebern (Kontrolle-lean) sowie in verfetteten Lebern (Kontrolle-fat) zu einer signifikanten Zunahme der ALT-Aktivitäten gegenüber den scheinoperierten Tieren (Sham-lean und –fat). Diese Zunahme war in verfetteten Lebern signifikant höher als in normalen Lebern. Durch die GSH-Behandlung konnten die ALT-Aktivitäten sowohl in normalen als auch in steatotischen Lebern (GSH-lean und –fat) wiederum drastisch gesenkt werden.*

MW \pm SEM; n = je 6;

** $p < 0.05$ vs. Sham-lean; # $p < 0.01$ vs. Kontrolle-lean; + $p < 0.01$ vs. Sham-fat; § $p < 0.05$ vs. Kontrolle-lean; § $p < 0.05$ vs. Kontrolle-fat.*

4.3.2 Ergebnisse der Elektronenmikroskopie

Zur Abschätzung des postischämischen, hepatozellulären Schadens wurden neben der Bestimmung der ALT-Serumspiegel morphologische Untersuchungen mittels Elektronenmikroskopie (s. 3.3.3.2) durchgeführt. Auf lichtmikroskopische Aufnahmen wurde verzichtet, da nach einer Reperfusionszeit von 120 Minuten nicht mit der Entstehung von Nekrosen und daher auch nicht mit lichtmikroskopisch bestimmbareren Unterschieden zwischen normalen und verfetteten Lebern zu rechnen war (s. auch 4.1.2).

Elektronenmikroskopische Aufnahmen normaler Lebern nach Ischämie / Reperfusion (ZL-KO) zeigten die bereits beschriebene (s. 4.1.3) Vakuolenbildung sowie eine Zunahme der Peroxisomenzahl (s. Abb. 4.13.a). Dagegen wiesen GSH-behandelte Tiere (ZL-GSH) diese Veränderungen nicht auf und zeigten daher eine ungestörte Leberzellarchitektur (s. Abb. 4.13.b).

Ischämie / Reperfusion manifestierte sich in den verfetteten Lebern (ZF-KO) – wie bereits beschrieben (s. 4.1.3) – nicht mit einer Vakuolisierung der Hepatozyten, sondern mit einer Schwellung des sinusoidalen Endothels (s. Abb. 4.13.c). Darüber hinaus war wie in normalen Kontrolltieren eine Zunahme der Peroxisomenzahl zu beobachten. Verfettete Lebern GSH-behandelter Tiere (ZF-GSH) zeigten dagegen ein normales, nicht-geschwollenes Endothel sowie eine ebenfalls ungestörte Leberzellarchitektur (s. Abb. 4.13.d).

GSH scheint also sowohl in normalen als auch in verfetteten Lebern protektive Effekte hinsichtlich der Lebermorphologie nach I / R zu haben. In normalen Lebern konnte GSH die hepatozelluläre Vakuolenbildung, in verfetteten Lebern die Schwellung des sinusoidalen Endothels verhindern.

Abb. 4.13.a:

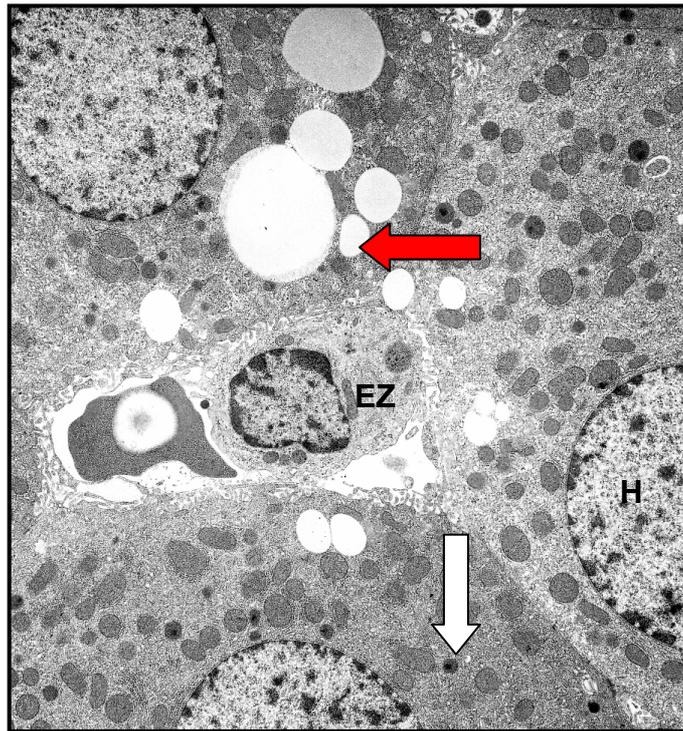


Abb. 4.13.b:

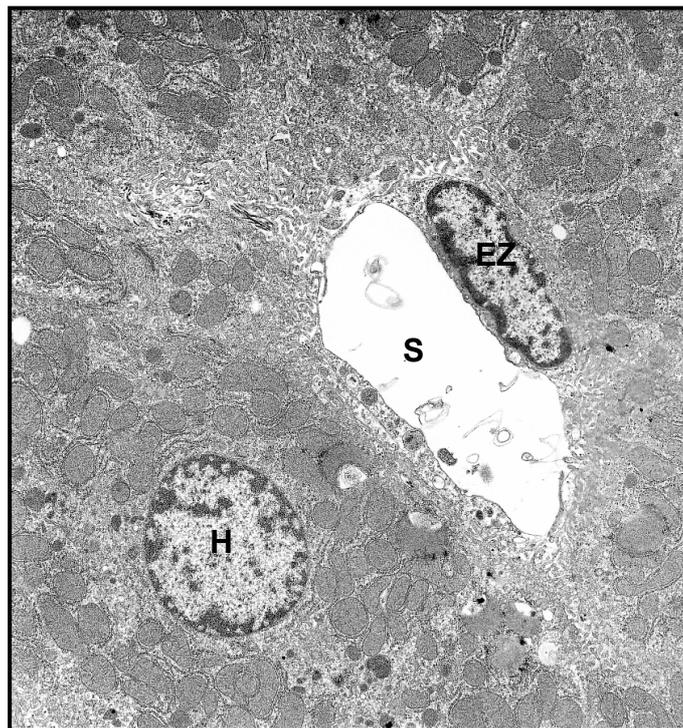


Abb. 4.13.a und b: Elektronenmikroskopische Aufnahmen normaler Lebern von Kontroll- (a) sowie GSH-behandelten Tieren (b): Zu sehen sind eine deutliche Vakuolisierung (roter Pfeil) sowie eine Zunahme der Peroxisomenzahl (weißer Pfeil) nach Ischämie / Reperfusion (a). Diese morphologischen Veränderungen konnten in normalen Lebern nach GSH-Behandlung nicht beobachtet werden (b).

H = Hepatozyt; EZ = Endothelzelle; S = Sinusoid.

Abb. 4.13.c:

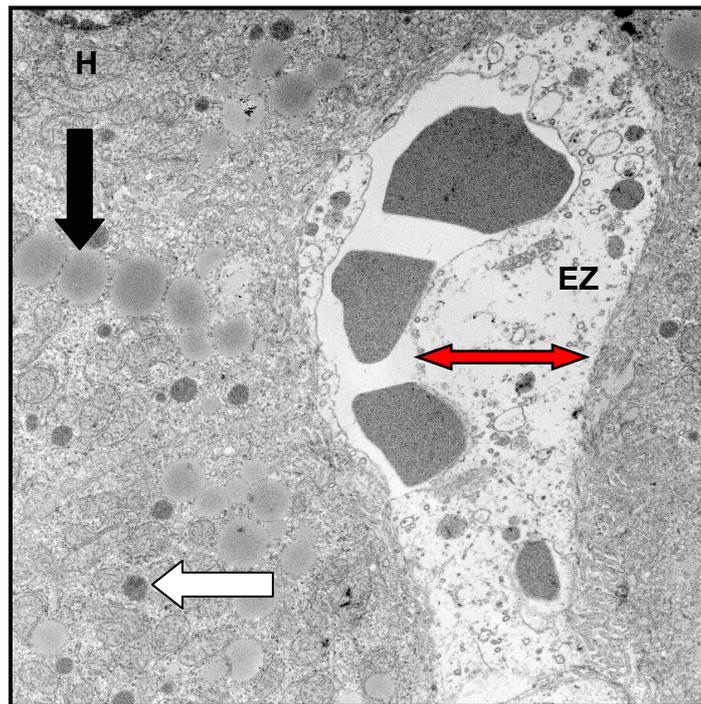


Abb. 4.13.d:

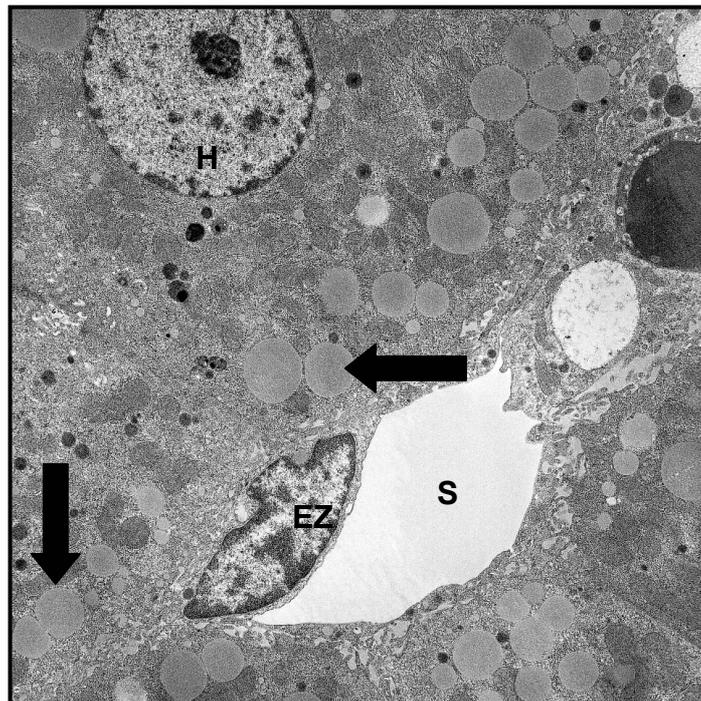


Abb. 4.13.c und d: Elektronenmikroskopische Aufnahmen verfetteter Lebern von Kontroll- (c) sowie GSH-behandelten Tieren (d): Zu sehen sind eine deutliche Endothelzellschwellung (roter Pfeil) sowie eine Zunahme der Peroxisomenzahl (weißer Pfeil) nach I/R (c), nicht jedoch in GSH-behandelten Tieren (d). Zu erkennen ist darüber hinaus die mikrovesikuläre Verfettung der Hepatozyten in beiden Aufnahmen (schwarzer Pfeil). H = Hepatozyt; EZ = Endothelzelle; S = Sinusoid.

4.4 EINFLUSS VON GSH AUF DIE LEBERFUNKTION: DER GALLEFLUSS

Der Gallefluss gilt als wichtiges Maß für die Exkretionsfunktion der Hepatozyten und darüber hinaus als wertvoller Parameter für das Ausmaß des ischämischen Schadens (Bowers BA, 1987). Zu dessen Beurteilung erfolgte vor und während der warmen Ischämie sowie während der Reperfusionphase die Bestimmung der Gallenmenge aus dem Ductus choledochus. Das fraktionierte Gallegewicht wurde dann auf den Referenzwert (erste Gallemessung vor der Ischämie) bezogen und die Abweichungen in Prozent angegeben (s. Abb. 4.14 und 4.15).

In normalen Lebern kam es während der Ischämie sowohl in den Kontroll- (ZL-KO) als auch in den mit GSH behandelten Tieren (ZL-GSH) zu einem drastischen Abfall des Galleflusses gegenüber den scheinoperierten Tieren (ZL-SH). In diesen beiden Gruppen (ZL-KO und ZL-GSH) wurden während der Ischämie nur noch Galleflussraten von ca. 60 – 65 % gegenüber dem Ausgangswert gemessen. Dagegen zeigten die Ergebnisse der Reperfusionphase eine signifikant schnellere Erholung der Leberfunktion in GSH-behandelten Tieren gegenüber den Kontrolltieren (vor allem während der letzten 60 Minuten der Reperfusionphase). Siehe hierzu auch Abb. 4.14.

Verfettete Lebern wiesen während der Ischämie sowohl in den Kontroll- (ZF-KO) als auch in den mit GSH-behandelten Tieren (ZF-GSH) eine ebenfalls deutlich eingeschränkte Leberfunktion gegenüber scheinoperierten Tieren (ZF-SH) auf. Die Galleflussraten fielen in diesen beiden Gruppen (ZF-KO und ZF-GSH) während der Ischämiephase auf ca. 55 – 58 % des Ausgangswertes („Nullwert“) ab. In der Reperfusionphase konnte durch die GSH-Applikation (ZF-GSH) keine Zunahme des Galleflusses gegenüber der Kontrollgruppe (ZF-KO) erreicht werden (s. Abb. 4.15).

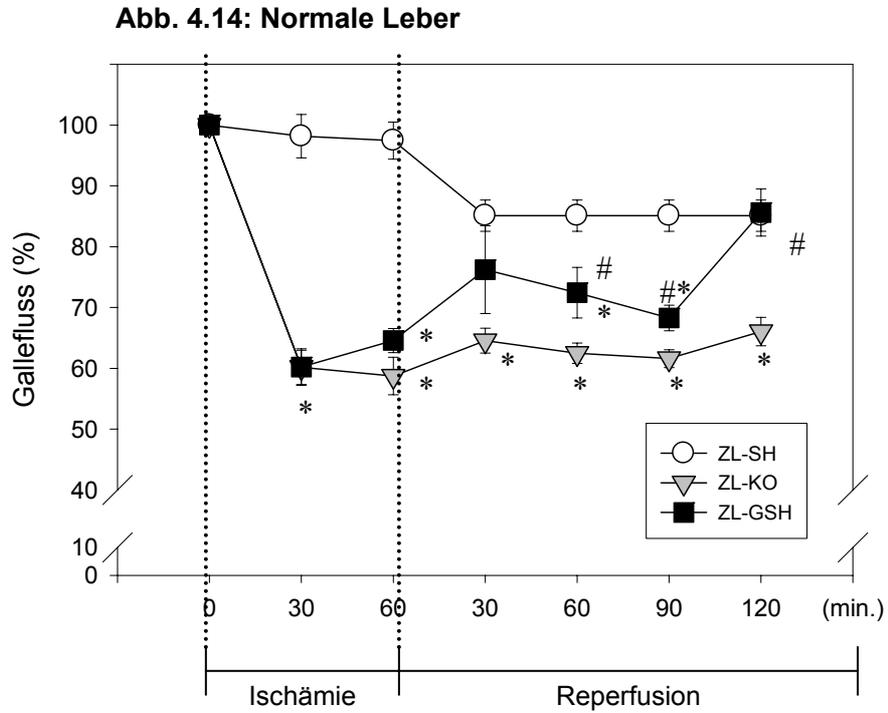


Abb. 4.14: Dynamischer Verlauf des Galleflusses in Tieren mit normalen Lebern: Während der Ischämiephase kam es sowohl in den Kontroll- (ZL-KO) als auch in den GSH-behandelten Tieren (ZL-GSH) zu einer signifikanten Abnahme des Galleflusses gegenüber den scheinoperierten Tieren (ZL-SH). In der Reperfusionphase konnte die GSH-Therapie die Galleflussraten deutlich gegenüber der Kontrollgruppe steigern.

MW ± SEM; ZL-SH: n = 6, ZL-KO: n = 8, ZL-GSH: n = 6;

*p<0.001 vs. ZL-SH; #p<0.05 vs. ZL-KO.

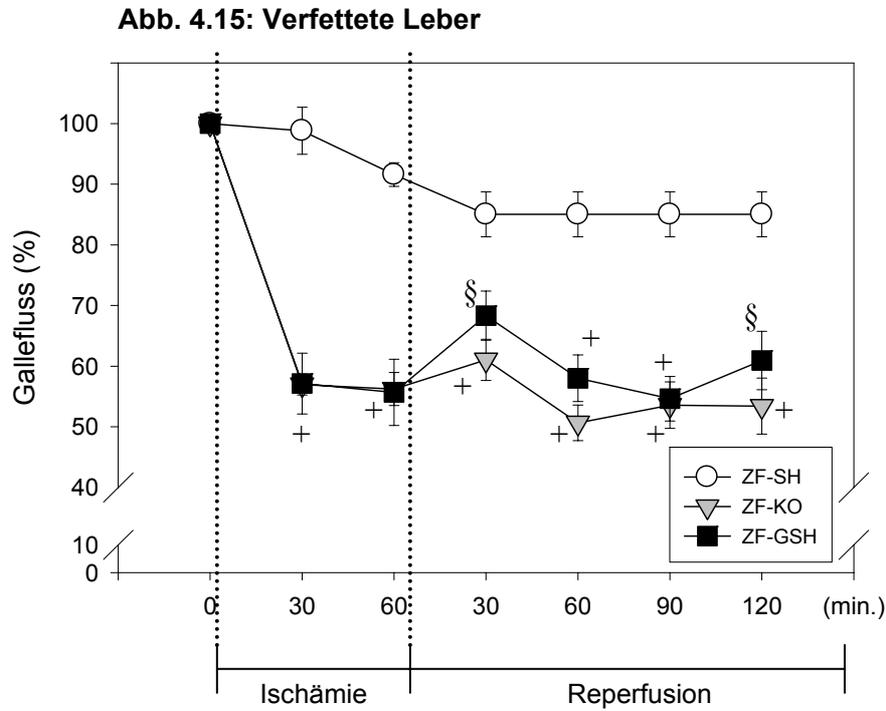


Abb. 4.15: Dynamischer Verlauf des Galleflusses in Tieren mit verfetteten Lebern: Während der Ischämiephase kam es sowohl in den Kontroll- (ZF-KO) als auch in den GSH-behandelten Tieren (ZF-GSH) zu einer signifikanten Abnahme des Galleflusses gegenüber den scheinoperierten Tieren (ZF-SH). In der Reperfusionphase konnte die GSH-Therapie die Galleflussraten gegenüber der Kontrollgruppe nicht steigern. MW \pm SEM; ZF-SH: n = 6, ZF-KO: n = 10, ZF-GSH: n = 7; +p < 0.001 vs. ZF-SH; §p < 0.05 vs. ZF-SH.

Um die Unterschiede zwischen normalen und verfetteten Lebern hinsichtlich des Galleflusses noch einmal zu verdeutlichen, wurde in der folgenden Abbildung (Abb. 4.16) der mittlere Gallefluss während der 120minütigen Reperfusionphase dargestellt. Dieser mittlere Gallefluss wurde auf das jeweilige Leberfeuchtgewicht bezogen und in $\mu\text{l} / \text{min} / \text{g}$ angegeben.

Ischämie / Reperfusion führte sowohl in normalen als auch in verfetteten Lebern (Kontrolle-lean und -fat) zu einer signifikanten Abnahme des mittleren Galleflusses während der Reperfusion gegenüber scheinoperierten Tieren (Sham-lean und -fat): In scheinoperierten Tieren lag der mittlere Gallefluss bei $1,18 \pm 0,29 \mu\text{l} / \text{min} / \text{g}$ in normalen Lebern und bei $0,85 \pm 0,17 \mu\text{l} / \text{min} / \text{g}$ in verfetteten Lebern. Ischämie / Reperfusion reduzierte den Gallefluss drastisch auf $0,89 \pm 0,12 \mu\text{l} / \text{min} / \text{g}$ in normalen Lebern und auf $0,63 \pm 0,08 \mu\text{l} / \text{min} / \text{g}$ in verfetteten Lebern.

Deutlich Unterschiede zwischen normalen und steatotischen Lebern zeigten sich hinsichtlich des protektiven Effekts von GSH auf den mittleren Gallefluss während der 120minütigen Reperfusionphase: Während die GSH-Behandlung in normalen Lebern (GSH-lean) zu einer signifikanten Verbesserung des Galleflusses und damit zu einer Erholung der exkretorischen Leberfunktion gegenüber den Kontrolltieren (Kontrolle-lean) führte, bewirkte die GSH-Behandlung in verfetteten Lebern (GSH-fat) keine Steigerung des mittleren Galleflusses (s. Abb. 4.16). Dieser betrug unter GSH-Behandlung $1,11 \pm 0,08 \mu\text{l} / \text{min} / \text{g}$ in Tieren mit normalen Lebern (GSH-lean) und $0,57 \pm 0,10 \mu\text{l} / \text{min} / \text{g}$ in Tieren mit verfetteten Lebern (GSH-fat) während der 120minütigen Reperfusionphase.

Darüber hinaus scheint der Gallefluss grundsätzlich vom Verfettungsgrad der Leber abzuhängen: In den korrespondierenden Sham-, Kontroll- und GSH-Gruppen ergaben sich jeweils signifikante Unterschiede zwischen normalen (lean) und verfetteten Lebern (fat).

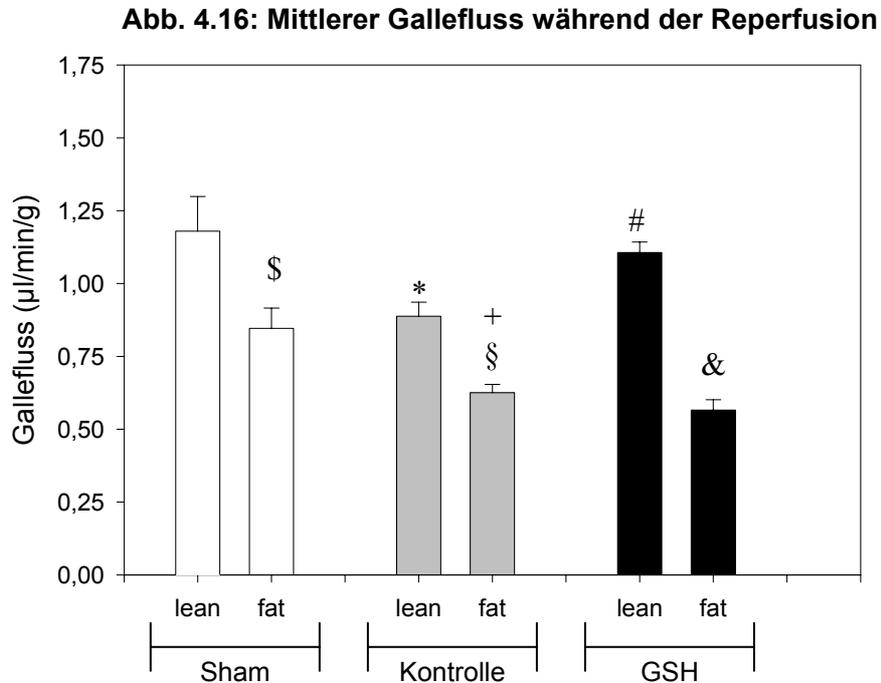


Abb. 4.16: Mittlerer Gallefluss während der 120minütigen Reperfusionsphase in normalen (lean) und verfetteten (fat) Lebern: Ischämie / Reperfusion führte sowohl in normalen Lebern (Kontrolle-lean) als auch in steatotischen Lebern (Kontrolle-fat) zu einer drastischen Abnahme des mittleren Galleflusses gegenüber den scheinoperierten Tieren (Sham-lean und -fat). Die GSH-Therapie war dabei nur in normalen Lebern (GSH-lean) wirksam. In verfetteten Lebern (GSH-fat) bewirkte die GSH-Behandlung keine Steigerung des mittleren Galleflusses während der Reperfusionsphase. Signifikante Unterschiede zwischen normalen und verfetteten Lebern in den Sham-, Kontroll- und GSH-Gruppen könnten auf eine vom Verfettungsgrad abhängige Exkretionsfunktion der Leber hinweisen.

MW ± SEM; ZL-SH: n = 6, ZF-SH: n = 6, ZL-KO: n = 8, ZF-KO: n = 10; ZL-GSH: n = 6, ZF-GSH: n = 7;

*p<0.05 vs. Sham-lean; #p<0.05 vs. Kontrolle-lean; +p<0.05 vs. Sham-fat; \$p<0.05 vs. Sham-lean; §p<0.001 vs. Kontrolle-lean; &p<0.001 vs. GSH-lean.

4.5 ANTIOXIDATIVER STRESS NACH ISCHÄMIE / REPERFUSION: EINFLUSS DER INTRAVENÖSEN GSH-THERAPIE

Zu Beginn diese Arbeit lagen keine Informationen vor, ob möglicherweise eine gesteigerte ROS-Bildung in verfetteten Lebern zu deren erhöhter Vulnerabilität gegenüber Ischämie / Reperfusion beiträgt. Daher sollte zum Einen untersucht werden, inwieweit eine Steatose der Leber zu einer Veränderung der Radikalbildung in den Sinusoiden führt, und zum Anderen, ob durch die intravenöse GSH-Zufuhr IRS durch Entgiftung von extrazellulären ROS reduziert werden können. Hierfür erfolgte die kontinuierliche, intravenöse Zufuhr von GSH (100 µmol / h / kg KG) für einen Zeitraum von 20 Minuten vor der Reperfusion bis zum Versuchsende, d. h. bis 120 Minuten nach Beginn der Reperfusion.

Die verwendete Konzentration führte während der Reperfusionsphase sowohl in normalen (ZL-GSH) als auch in steatotischen Lebern (ZF-GSH) zu einem drastischen Anstieg der plasmatischen GSH-Konzentrationen gegenüber den Kontrollgruppen (ZL-KO; ZF-KO). Dabei wurden in verfetteten Lebern deutlich höhere GSH-Konzentrationen erreicht als in Tieren mit normalen Lebern (ZL-GSH vs. ZF-GSH). Die extrazelluläre GSH-Freisetzung ohne exogene GSH-Zufuhr war dagegen unabhängig vom Verfettungsgrad der Leber (ZL-KO vs. ZF-KO). Siehe hierzu Abb. 4.17.

Um nun das Ausmaß der extrazellulären Radikalfreisetzung während der Reperfusionsphase zu quantifizieren, wurde das Oxidationsprodukt von Glutathion (GSSG) im Plasma bestimmt. Auch hier kam es in den GSH-behandelten Tieren sowohl mit normalen (ZL-GSH) als auch mit verfetteten Lebern (ZF-GSH) zu einem deutlichen Anstieg der plasmatischen GSSG-Konzentrationen gegenüber den entsprechenden Kontrollgruppen (ZL-KO; ZF-KO). Diese Zunahme ist vereinbar mit einer ausgeprägten ROS-Detoxifikation nach Wiedereinsetzen der hepatischen Reperfusion durch das zugeführte GSH. Der Verlauf der GSSG-Konzentrationen während der Reperfusionsphase zeigte dabei in GSH-behandelten Tieren mit verfetteten Lebern einen wesentlich drastischeren Anstieg als in Tieren mit normalen Lebern (ZF-GSH vs. ZL-GSH). Dies könnte auf eine verstärkte, extrazelluläre

Freisetzung von ROS nach Ischämie / Reperfusion in verfetteten Lebern hinweisen. Siehe hierzu Abb. 4.18.

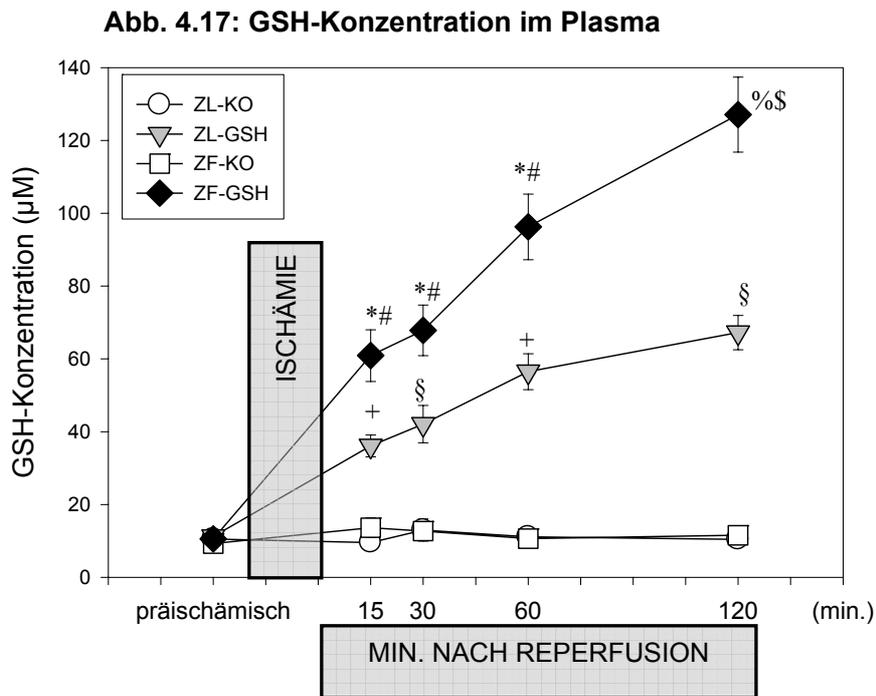


Abb. 4.17: Dynamischer Verlauf der plasmatischen GSH-Konzentrationen in normalen (ZL) und verfetteten (ZF) Lebern: Die intravenöse Zufuhr von 100 µmol / h / kg an GSH führte sowohl in normalen Lebern (ZL-GSH) als auch in verfetteten Lebern (ZF-GSH) zu einem drastischen Anstieg der plasmatischen GSH-Konzentrationen gegenüber den entsprechenden Kontrollgruppen (ZL-KO; ZF-KO). In steatotischen Lebern konnten dadurch wesentlich höhere GSH-Konzentrationen erreicht werden als in normalen Lebern (ZF-GSH vs. ZL-GSH). Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Kontrollgruppen (ZL-KO; ZF-KO) konnten nicht beobachtet werden.

MW ± SEM; ZL-KO: n = 7, ZF-KO: n = 9, ZL-GSH: n = 6, ZF-GSH: n = 7;

*p<0.01 vs. ZF-KO; %p<0.001 vs. ZF-KO; +p<0.01 vs. ZL-KO; §p<0.001 vs. ZL-KO; #p<0.05 vs. ZL-GSH; \$p<0.001 vs. ZL-GSH.

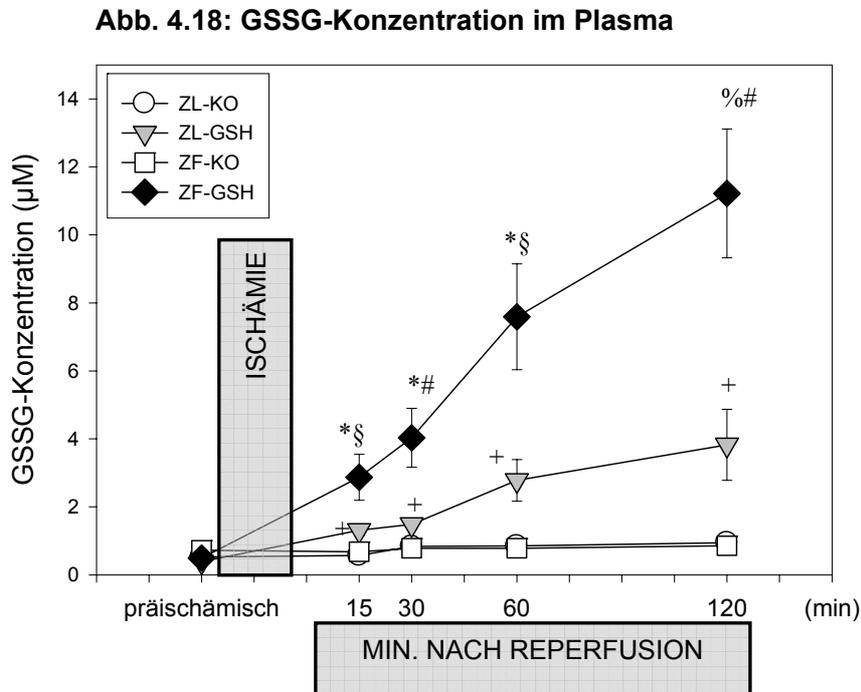


Abb. 4.18: Dynamischer Verlauf der plasmatischen GSSG-Konzentrationen in normalen (ZL) und verfetteten (ZF) Lebern: Die GSH-Behandlung führte sowohl in Tieren mit normalen Lebern (ZL-GSH) als auch in Tieren mit verfetteten Lebern (ZF-GSH) zu einer drastischen Erhöhung der plasmatischen GSSG-Konzentrationen gegenüber den entsprechenden Kontrolltieren (ZL-KO; ZF-KO). Die Zunahme der plasmatischen GSSG-Konzentrationen war dabei in verfetteten Lebern wesentlich stärker ausgeprägt als in Tieren mit normalen Lebern (ZF-GSH vs. ZL-GSH). Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Kontrollgruppen (ZL-KO; ZF-KO) konnten nicht beobachtet werden.

MW ± SEM; ZL-KO: n = 7, ZF-KO: n = 9, ZL-GSH: n = 6, ZF-GSH: n = 7;

*p<0.01 vs. ZF-KO; %p<0.001 vs. ZF-KO; +p<0.05 vs. ZL-KO; #p<0.01 vs. ZL-GSH; §p<0.05 vs. ZL-GSH.

4.6 DER INTRAZELLULÄRE GESAMT-GLUTATHION-GEHALT

Entsprechend dem unter 3.3.6 beschriebenen Verfahren wurde der intrazelluläre Gehalt des Antioxidans Glutathion (GSH) bestimmt. Die Messungen erfolgten dabei sowohl am linken, postischämischen Leberlappen (LL), aber auch an den rechten Lebersegmenten (LR), die keiner Ischämie / Reperfusion unterzogen wurden. Dadurch sollte überprüft werden, ob es während der Reperfusion des ischämischen Leberlappens (LL) zu einem relevanten Abfall des intrazellulären GSH-Gehaltes kommt.

In normalen Lebern führte die Ischämie / Reperfusion (Kontrollgruppen) zu einer signifikanten Abnahme des intrazellulären GSH-Gehaltes im linken, postischämischen Leberlappen (LL) gegenüber den rechten Lebersegmenten (LR), die keiner Ischämie / Reperfusion unterzogen worden waren. Durch die GSH-Behandlung (GSH-Gruppen) konnte diese Abnahme des intrazellulären GSH-Gehaltes im linken Leberlappen verhindert werden; die nicht-ischämischen rechten Lebersegmente erfuhren durch die GSH-Therapie keine weitere Erhöhung des intrazellulären GSH-Gehaltes. Hepatozyten normaler Lebern scheinen also unter pathologischen Bedingungen (I / R) intrazellulär vorhandenes GSH zu verlieren bzw. ihre intrazellulären „GSH-Speicher“ durch exogen zugeführtes GSH wiederauffüllen zu können. Siehe hierzu Abb. 4.19.

Ischämie / Reperfusion (Kontrollgruppen) hatte in verfetteten Lebern keinen Einfluss auf den intrazellulären GSH-Gehalt – weder im postischämischen, linken Leberlappen (LL) noch in den nicht-ischämischen, rechten Lebersegmenten (LR). Auch nach GSH-Therapie (GSH-Gruppen) zeigten sich keine Veränderungen des intrazellulären GSH-Gehaltes. Hepatozyten verfetteter Lebern scheinen somit unter pathologischen Veränderungen kein exogen zugeführtes GSH aufzunehmen. Siehe hierzu Abb. 4.20.

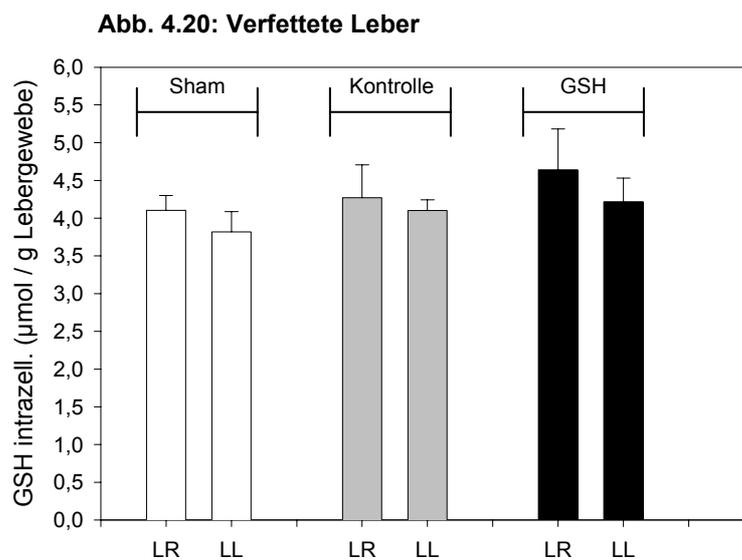
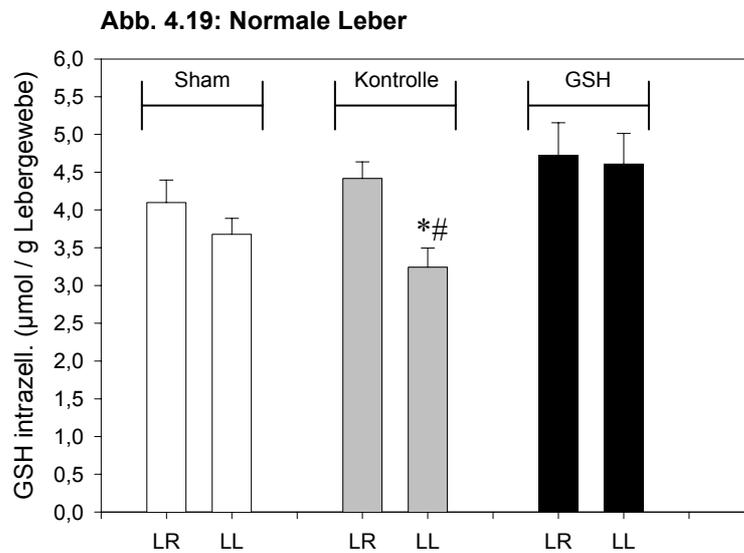


Abb. 4.19 und 4.20: Intrazellulärer Gesamt-GSH-Gehalt in normalen Lebern (oben) und verfetteten Lebern (unten) ($n = je\ 8$): In normalen Lebern führte I / R (Kontrolle) zu einer Abnahme des intrazell. GSH-Gehaltes im postischämischen, linken Leberlappen (LL) gegenüber den nicht-ischämischen, rechten Lebersegmenten (LR). Die GSH-Therapie (GSH) verhinderte diese Abnahme des intrazell. GSH-Gehaltes im linken Leberlappen. I / R sowie die GSH-Behandlung führte in verfetteten Lebern zu keiner Veränderung des intrazellulären Gesamt-GSH-Gehaltes.

MW \pm SEM; $n = je\ 6$ (ZL-KO: $n = 8$; ZF-KO: $n = 8$);

* $p < 0.01$ vs. Kontrolle-LR (normale Leber); # $p < 0.05$ vs. GSH-LL (normale Leber).

V. DISKUSSION

Verfettete Lebern stellen in den Ländern der „westlichen Welt“ ein häufiges Problem dar. Die Angaben hinsichtlich der Inzidenzen schwanken zwischen 6 und 11 % und beziehen sich auf Autopsien nach Unfall mit Todesfolge (Hilden M, 1977; Underwood G, 1984), während die Prävalenzen hepatischer Steatose im Krankengut der Leberchirurgie sogar mit 20 bis 26 % angegeben werden (Hornboll P, 1982; D'Alessandro A, 1991; Miki C, 1998). Dieses häufigere Vorkommen von verfetteten Lebern im chirurgischen Patientengut könnte durch Selektionseffekte bedingt sein (Selzner M, 2001).

Bereits 1969 berichteten Bengmark et al. zum ersten Mal, dass verfettete Lebern mit einer deutlich erhöhten Komplikationsrate nach Leberteilresektion assoziiert sind (Bengmark S, 1969). Behrns et al. konnten diese Beobachtung in einer Studie mit 135 Patienten bestätigen und zeigen, dass 14 % der Patienten mit moderater hepatischer Steatose ein Leberversagen nach Leberteilresektion entwickelten, während diese Komplikation lediglich in 4 % der Patienten mit unauffälliger Leberhistologie eintrat (Behrns KE, 1998). Belghiti et al. eruierten eine drastische Zunahme der postoperativen Morbidität nach Leberteilresektion in Patienten mit steatotischen Lebern (22 %) gegenüber Patienten mit normalen Lebern (8 %) in einer Studie mit 478 elektiv durchgeführten Leberteilresektionen (Belghiti J, 2000).

Die Häufigkeit von verfetteten Lebern sowie deren erhöhte Komplikationsrate nach Leberteilresektion zeigen die Notwendigkeit von klinischen Experimenten mit vorgeschädigten Lebern. Ziel dieser experimentellen Arbeit war es daher, steatotische Lebern mit normalen Lebern unter den Bedingungen von Ischämie / Reperfusion zu vergleichen und geeignete Therapieansätze zur Reduzierung von Ischämie- / Reperfusionsschäden in verfetteten Lebern zu prüfen.

5.1 MODELLE DER FETTLERBERINDUKTION

Zur Induktion einer steatotischen Leber in Versuchstieren existieren unterschiedliche Ansätze und basieren entweder auf genetischen Modifizierungen oder auf Veränderungen in der Nahrungszusammensetzung. Fett akkumuliert dabei in den Hepatozyten, sobald die Aufnahme oder die Synthese von Fettsäuren deren Abbau oder Ausfuhr übersteigt (Koteish A, 2001).

Eine gesteigerte hepatozelluläre Lipogenese kann durch unterschiedliche genetische Modelle hervorgerufen werden:

In sog. „*PEPCK-NSREBP-1 α* “-Mäusen kommt es zu einer gesteigerten Expression des Transkriptionsfaktors (TF) NSREBP-1 α , der die Transkription einer Vielzahl von Genen aktiviert, die an der Biosynthese von Fettsäuren und Cholesterin beteiligt sind. Dazu zählen beispielsweise Gene, die für die Enzyme HMG-CoA-Reduktase bzw. – Synthase oder für das Enzym Acetyl-CoA-Carboxylase kodieren. Transgene Mäuse mit einer hepatozellulär spezifischen Überexpression dieses TF entwickeln fettinfiltrierte Lebern (Shimano H, 1996) mit einer begleitenden Erhöhung der plasmatischen ALT-Konzentration um 60 %, jedoch ohne histologische Anzeichen einer Entzündungsreaktion oder Nekrose (Koteish A, 2001).

In sog. „*AP2-NSREBP-1c*“-Mäusen resultiert die Akkumulation des Transkriptionsfaktors (TF) SREBP-1c in den Nuclei von Adipozyten des braunen und weißen Fettgewebes in einer fehlenden Differenzierung dieser Adipozyten (Shimomura I, 1998). Die Folge ist eine massive Reduktion des weißen Fettgewebes sowie des Hormons Leptin, das vorwiegend in diesem Gewebe synthetisiert wird.

Leptin stellt ein Sättigungshormon dar, das den Trieb zur Nahrungsaufnahme inhibiert und den Energieverbrauch steigert (Campfield LA, 1996). Diese Effekte werden hauptsächlich über Leptinrezeptoren des hypothalamischen Nucleus ventralis medialis vermittelt (Campfield LA, 1996). Steht dieses Hormon – wie in den oben erwähnten transgenen Mäusen – nicht oder nur in ungenügender Menge zur Verfügung, so entwickeln diese Versuchstiere ein ungezügelter Fressverhalten, das zu einer kontinuierlichen Gewichtszunahme und zur Ausbildung einer fettinfiltrierten Leber führt (Pelleycounter MA, 1995). Darüber hinaus resultiert ein Mangel an Leptin

in der vermehrten Expression von Genen, die für das Enzym Lipoproteinlipase und für TNF- α kodieren (Zhou YT, 1999). Diese Faktoren stimulieren wiederum die Freisetzung von Fettsäuren aus entsprechenden Fettspeichern und bewirken über die Expression von bestimmten hepatozellulären Proteinen (sog. UCP-2) eine Reduktion der oxidativen Phosphorylierung von Fettsäuren in den Mitochondrien sowie eine Zunahme der Fettsäuresynthese (Skulachev VP, 1998). Ein Mangel an Leptin aktiviert außerdem die Produktion von Insulin in den β -Zellen des Pankreas (Zhou YT, 1997). Die resultierende Hyperinsulinämie führt dann ebenfalls über bestimmte TF (SREBP-1c) zu einer Induktion der Fettsäure-Synthese und damit zu einer Zunahme der Triglyzeridsynthese in Leber und Pankreas. In Versuchstieren mit Leptinmangel akkumulieren also aufgrund dieser Veränderungen im Fettsäuremetabolismus und aufgrund des unkontrollierten Fressverhaltens Lipide – vorwiegend Triglyzeride (Fromenty B, 1997a und b) – in den Hepatozyten.

Auch die Modelle mit sog. „A-BZIP/F“-Mäusen oder mit sog. „ob/ob“-Mäusen sowie das Modell der homozygoten Zucker-fat-Ratten basieren auf diesem Konzept des induzierten Leptinmangels: „A-BZIP/F“-Mäuse überexprimieren das Protein A-ZIP/F und sind dadurch nicht in der Lage, weißes Fettgewebe zu entwickeln (Moitra J, 1998). Die Folge ist wiederum ein absoluter Mangel an Leptin und konsekutiv die Ausbildung einer Fettleber. „Ob/ob“-Mäuse besitzen eine natürlich auftretende Mutation, die eine Synthese von Leptin verhindert und damit zu den oben beschriebenen Veränderungen im Fettstoffwechsel führt (Pelleymounter MA, 1995). Dagegen weisen sog. „fa(k)/fa(k)“-Ratten – auch als *homozygote Zucker-fat-Ratten* bezeichnet – natürliche Spontanmutationen im Gen für den Leptinrezeptor auf (Phillips MS, 1996). Diese „fehlgebildeten“ Leptinrezeptoren sind nicht mehr in der Lage, leptinmedierte Signale nach intrazellulär zu vermitteln, oder werden erst gar nicht in die Plasmamembran inseriert (Phillips MS, 1996). Dieser „indirekte“ Leptinmangel resultiert ebenfalls in einem unkontrollierten Fressverhalten der Versuchstiere, in einer massiven Gewichtszunahme, in einem insulinresistenten Diabetes mellitus sowie in einer Hyperlipidämie mit der Ausbildung einer steatotischen Leber. Darüber hinaus werden in homozygoten Zucker-Ratten verschiedene Enzyme der Lipogenese induziert, wie z. B. die Fettsäure-Synthese.

Die Folge ist ein bis zu 5facher Anstieg des hepatischen Triglyzeridgehaltes (Kakuma T, 2000).

Neben diesen genetisch modifizierten Modellen existieren Konzepte, die über eine Veränderung der Nahrungszusammensetzung eine gesteigerte hepatozelluläre Fettsäureaufnahme bewirken und damit ebenfalls die Entwicklung einer fettinfiltrierten Leber fördern:

Hierzu zählen beispielsweise sog. „*high-sucrose / -fructose diets*“, durch die verschiedene lipogene Enzyme sowie die hepatische Triglyzeridsynthese induziert werden (Poulsom R, 1986). Sog. „*high-fat diets*“ bewirken über eine Zunahme des totalen Körperfettgehaltes zunächst eine Steigerung des zirkulierenden Leptins. Eine solche persistierende Hyperleptinämie führt jedoch allmählich zu einer Leptinresistenz der hypothalamischen und peripheren Rezeptoren mit den Folgen eines „relativen“ Leptinmangels (El-Haschimi K, 2000). Auch sog. „*arginine-deficient diets*“ (Milner JA, 1981) und „*high-sucrose / high-fat diets*“ (Loria RM, 1976) resultieren in einer Zunahme der hepatischen Lipogenese, jedoch ohne Entwicklung einer generalisierten Adipositas. Eine chronische Aufnahme von *Ethanol* verursacht ebenfalls eine hepatozelluläre Fettinfiltration (Lieber CS, 1989; Gao W, 1995), für die in erster Linie zwei pathophysiologische Mechanismen verantwortlich gemacht werden: Zum Einen induziert ein vermindertes NAD⁺/NADH-Verhältnis lipogene Enzyme (NAD⁺ ist ein Co-Faktor der Alkohol-Dehydrogenase und wird daher bei Ethanolaufnahme zunehmend verbraucht) (Koteish A, 2001). Zum Anderen inhibiert eine chronische Ethanolbelastung die Freisetzung von VLDL aus den Hepatozyten (Lieber CS, 1993) und führt daher zu einer Akkumulation von Triglyzeriden. Eine ethanolinduzierte Leberzellverfettung wird dabei meist von einer Entzündungsreaktion begleitet (Koteish A, 2001), bei deren Entstehung vor allem intestinal freigesetztes Lipopolysaccharid (LPS) (Nanji AA, 1994; Adachi Y, 1995) sowie dadurch induzierter TNF- α (Iimuro Y, 1997) eine entscheidende Rolle spielen sollen. Persistierende Entzündungsreaktionen im Lebergewebe können dann unter kontinuierlicher Ethanolzufuhr in eine Leberfibrose bzw. -zirrhose übergehen.

Neben der Förderung der hepatischen Fettsäureaufnahme stehen auch Modelle der Fettleberinduktion zur Verfügung, die auf einer Reduktion der Fettsäureelimination

beruhen. Unterschiedliche genetische Modifizierungen in Versuchstieren sind diesbezüglich bekannt:

In sog. „*PPAR α -/-*“-Mäusen führt ein defektes Gen für den Transkriptionsfaktor (TF) PPAR α zu einer herabgesetzten Transkription von Genen, die in der mitochondrialen und peroxisomalen β -Oxidation von Fettsäuren involviert sind (Fan CY, 1996; Leone TC, 1999). Die Entwicklung einer generalisierten Adipositas sowie einer fettinfiltrierten Leber mit zunehmendem Alter sind die Folge (Costet P, 1998). Weitere Modelle einer reduzierten Fettsäureelimination der Leber entwickelten transgene Mäuse mit Gendefekten der Acyl-CoA-Oxidase (Fan CY, 1996) oder der Aromatase (Nemoto Y, 2000).

Darüber hinaus existieren sog. „*choline- and methionine-deficient diets (CMDD)*“, die in den Versuchstieren zu einer Gewichtsabnahme und zu einer perivenösen Fettakkumulation in den Hepatozyten führen (Tucker H, 1937; Teramoto K, 1993b; Nakano H, 1997). Ein Mangel an Cholin und Methionin führt zu einer geringeren Verfügbarkeit von Phosphatidylcholin und damit von VLDL in den Hepatozyten. Dies hat zur Folge, dass Triglyzeride nicht mehr an extrahepatische Zielorte transportiert werden können und somit intrahepatisch akkumulieren (Yao ZM, 1988 und 1989). Auch Inflammation und Nekrose konnten in Lebern von Versuchstieren, die einer CMDD unterzogen wurden, festgestellt werden (Teramoto K, 1993b).

Eine Behandlung mit *Östrogen-Antagonisten*, wie z. B. Tamoxifen (Pratt DS, 1995; Oien KA, 1999), oder eine Langzeittherapie mit *Glucocorticoiden* (Letteron P, 1997) können ebenfalls mit der Entwicklung einer hepatischen Steatose bzw. Steatohepatitis einhergehen.

Um Auswirkungen von Ischämie / Reperfusion auf verfettete Lebern untersuchen und um diese mit normalen Lebern vergleichen zu können, entschied man sich in der vorliegenden, experimentellen Arbeit zur Verwendung des Modells mit homozygoten bzw. heterozygoten Zucker-Ratten aus folgenden Gründen:

Homozygote Zucker-Ratten besitzen einen genetischen Defekt des hypothalamischen Leptinrezeptors und reagieren mit einem ungezügelt und übermäßigen Fressverhalten, das bei der Entwicklung der hepatischen Steatose eine entscheidende Rolle spielt (s. o.). Ernährungsbedingte Adipositas stellt außerdem in den Ländern der „westlichen Welt“ neben Alkoholkonsum, Diabetes mellitus und

bestimmten Medikamenten eine der häufigsten Ursachen für die Ausbildung einer Leberzellverfettung dar (Hilden M, 1977; Hornboll P, 1982; Alpers DH, 1987). Daher ist das etablierte Modell der homozygoten Zucker-Ratten geeignet, um Effekte von Ischämie / Reperfusion auf nutritiv hervorgerufene Fettlebern zu analysieren (White B, 1997). Als Kontrollgruppen mit normalen Lebern konnten heterozygote Zucker-Ratten verwendet werden, die intakte Leptinrezeptoren aufweisen und damit der Ausbildung einer fettinfiltrierten Leber entgehen. Darüber hinaus entwickeln homozygote Zucker-Ratten weder Inflammation noch Nekrose in den steatotischen Lebern (Koneru B, 1995), während andere Modelle der Fettleberinduktion, wie z. B. eine CMDD oder eine ethanolinduzierte Leberzellverfettung, mit einer Entzündungsreaktion und nekrotischen Veränderungen einhergehen können (Teramoto K, 1993b; Rogers AE, 1973). Derartige durch das Modell der Fettleberinduktion hervorgerufene Reaktionen sollten in der vorliegenden Arbeit vermieden werden, da Ischämie / Reperfusion ebenfalls eine inflammatorische Antwort induziert und als solche untersucht werden sollte. Aus Gründen der einfacheren Operationstechnik und der Gewinnung einer größeren Menge an Lebergewebe wurden Ratten gegenüber Mäusen als Versuchstiere favorisiert.

5.2 CHIRURGISCHE PRÄPARATION

Die chirurgische Präparation der Ratten konnte nach einer ca. dreimonatigen Einübungsphase problemlos und standardisiert durchgeführt werden. Zur Präparation der Leber und für die Durchführung der Intravitalmikroskopie (IVM) erfolgte zunächst eine transversale Laparotomie und anschließend die Lösung aller hepatischen Ligamente. Zusammen mit der Präparation und der Kanülierung des Ductus choledochus stellten diese operativen Maßnahmen einen ausgeprägten, chirurgischen Eingriff dar, der bereits zu einer erheblichen Freisetzung von leberspezifischen Enzymen führen kann. Daher war eine maximale Standardisierung des operativen Vorgehens unter weitestgehender Vermeidung einer unnötigen Lebermobilisation durchzuführen (Schemmer P, 1998).

Um eine mechanische Obstruktion afferenter bzw. efferenter Gefäße des linken Leberlappens während dessen Auslagerung zur IVM zu verhindern, wurde auf die

Haltevorrichtung verformbare Modelliermasse aufgetragen, in welcher die Leber atraumatisch gelagert werden konnte. Mithilfe des Operationsmikroskopes konnte auch eine geringgradige, mechanische Verlegung der Gefäße während dieses Manövers visuell ausgeschlossen werden.

Ein weiteres Problem während des mehrstündigen Versuchsablaufes stellten die drohenden Flüssigkeitsverluste bei offenem Abdomen infolge von Verdunstungsvorgängen dar. Um diesem Risiko vorzubeugen, wurde der offene Bauchraum mit Cuprophanfolie sowie der ausgelagerte, linke Leberlappen mit einem Deckglas abgedeckt. Parallel dazu wurde während des gesamten Versuches Flüssigkeit durch eine kontinuierliche Infusion einer Vollelektrolytlösung (Tutofusin® 4 ml / h) substituiert. Mithilfe einer in die Operationsfläche integrierten Heizplatte wurde eine konstante Körperkerntemperatur zw. 36,5 und 37,5° C aufrechterhalten.

5.3 INTRAVITALE FLUORESZENZMIKROSKOPIE (IVM)

Zur Analyse des mikrovaskulären Strombetts stehen unterschiedliche, indirekte und direkte Methoden zur Verfügung:

Zu den indirekten Untersuchungstechniken werden beispielsweise die Photoplethysmographie (Webster MH, 1976), die transkutane Bestimmung des Sauerstoffpartialdrucks (Keller HP, 1984), die Thermographie (Leonard AG, 1982; May JW, 1983) oder die Laser-Doppler-Fluxmetrie (Larrabee WF Jr, 1983; Arvidsson D, 1988) gerechnet. Mit diesen Methoden ist es jedoch nicht möglich, mikrozirkulatorische Vorgänge in den einzelnen Strukturen der Mikrovaskularisation – wie z. B. in den terminalen Arteriolen und in den postkapillären Venolen – getrennt zu betrachten (Menger MD, 1994). Darüber hinaus gestatten diese Untersuchungstechniken keine Analyse von zellulären Interaktionen zwischen Leukozyten, Thrombozyten und Endothelzellen (Menger MD, 1994).

Demgegenüber ermöglicht die Intravitale Fluoreszenzmikroskopie (IVM) eine direkte und getrennte Visualisierung der einzelnen anatomischen Strukturen auf mikrozirkulatorischer Ebene (Menger MD, 1991 und 1993a) sowie eine quantitative Bestimmung mikrohämodynamischer Parameter, wie z. B. der mittleren Gefäßweite, nach Gabe von fluoreszenzverstärkenden Farbstoffen (z. B. Natrium-Fluoreszein)

(Zeintl H, 1986). Weiterhin können mittels IVM zelluläre Interaktionen, wie z. B. die endotheliale Leukozyten-Adhärenz nach Applikation von Rhodamin 6G (Zeintl H, 1986; Menger MD, 1993b; Vollmar B, 1995) bzw. die Interaktionen von Thrombozyten (Lehr HA, 1999), oder die Funktion (Phagozytose) von Kupffer-Zellen durch die Injektion fluoreszierender Latexpartikel (Praaning – Van Dalen DP, 1982; Dan C, 1985; Post S, 1992; Vollmar B, 1994b) analysiert werden. Auch Veränderungen der Gefäßpermeabilität sowie zellulärer Transport und Integrität können unter Verwendung von IVM und verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen einer Beurteilung zugänglich gemacht werden (Menger MD, 1993a und 1993b).

Diese eindeutigen Vorteile gegenüber den indirekten Untersuchungsmethoden führten zu einer breiten Verwendung der IVM bei der Analyse der Mikrozirkulation in unterschiedlichsten Organen und Geweben, wie z. B. in der Lunge (Kuhnle GE, 1995), im Pankreas (Hoffmann TF, 1995), in der Muskulatur (Messina LM, 1990; Menger MD, 1994) sowie bei der Untersuchung der Mikrozirkulation in der Haut (Menger MD, 1994; Nolte D, 1995), im Darm (Massberg S, 1998) und in der Leber (Menger MD, 1991; Post S, 1993; Uhlmann S, 1999).

Potentielle Probleme der IVM liegen in der Applikation von Fluoreszenzfarbstoffen, die von verschiedenen Autoren als phototoxische Substanzen angesprochen wurden und in Experimenten mit Zellkulturen strukturelle Veränderungen bis hin zum Zelltod hervorriefen (Olsson GM, 1989; Zdolsek JM, 1990 und 1993). Saetzler et al. konnten durch in-vivo Experimente an Goldhamstern zeigen, dass die Fluoreszenzfarbstoffe Acridinorange und Rhodamin 6G in Abhängigkeit von der verwendeten Lichtenergie der CCD-Kamera temporäre und permanente Leukozyten-Adhärenzen in postkapillären Venolen und Arteriolen induzieren können (Saetzler RK, 1997). Dem Fluoreszenzfarbstoff Acridinorange wurde außerdem der Effekt eines induzierten Vasospasmus in Arteriolen und damit eine Abnahme des Gefäßdurchmessers zugeschrieben (Saetzler RK, 1997). Darüber hinaus wird Natrium-Fluoreszein mit der Entwicklung eines endothelialen Zellschadens und darauffolgender Aggregation von Thrombozyten in Verbindung gebracht (Povlishock JT, 1983). Diesen Beobachtungen stehen Ergebnisse von Forschungsgruppen des eigenen Labors gegenüber, die zeigen konnten, dass die Fluoreszenzfarbstoffe Rhodamin 6G,

Acridinorange und FITC-Dextran unter Verwendung einer CCD-Kamera keinen Einfluss auf die Interaktionen zwischen Leukozyten und Endothelzellen hatten und keine Veränderung des Gefäßdurchmessers hervorriefen. Phototoxische Effekte konnten erst durch hohe Lichtenergie-Dosierungen hervorgerufen werden (Steinbauer M, 2000; Harris AG, 2002). Darüber hinaus wurden in den eigenen Versuchen konsequent kurze Beobachtungszeiträume während der IVM eingehalten, die in jedem Experiment im Sinne eines standardisierten Versuchsablaufes von identischer Dauer waren. Dadurch wurde die erforderliche Lichtenergie der CCD-Kamera möglichst gering gehalten und das Risiko potentieller, phototoxischer Effekte der Fluoreszenzfarbstoffe minimiert.

5.4 AGGRAVATION VON ISCHÄMIE- / REPERFUSIONSSCHÄDEN IN VORGESCHÄDIGTEN LEBERN

5.4.1 Überblick über aktuelle Forschungsberichte

Steatotische Lebern entwickeln nach Ischämie / Reperfusion (I / R) deutlich ausgeprägtere IRS als normale Lebern. Dies belegen mehrere experimentelle Studien nach Leberresektion („warme“ Ischämie) und Lebertransplantation („kalte“ Ischämie):

So zeigten Untersuchungen an homozygoten Zucker-Ratten mit verfetteten Lebern drastisch erhöhte Aktivitäten der Leberenzyme ALT und AST (Koneru B, 1995; Sun CK, 2001) sowie eine Abnahme der Überlebensraten (Koneru B, 1995; Soltys K, 2001) nach I / R gegenüber heterozygoten Kontrolltieren mit normalen Lebern. Lichtmikroskopische Befunde untermauern die erhöhte Vulnerabilität fettinfiltrierter Lebern gegenüber I / R: Nekrotische Veränderungen waren in steatotischen Lebern stärker ausgeprägt als in normalen Lebern (Koneru B, 1995; Nardo B, 2001). Darüber hinaus wurde in mehreren Studien von einer stärkeren Abnahme der Galleflussraten in verfetteten Lebern nach I / R berichtet (Nakano H, 1997; Taneja C, 1998).

An dieser Aggravation von IRS in verfetteten Lebern scheinen unterschiedliche, pathophysiologische Mechanismen beteiligt zu sein (Selzner M, 2001; Koneru B, 2002):

- Hepatozelluläre Veränderungen:

Während in normalen Lebern mit zunehmender Lagerungszeit des Lebertransplantates („kalte“ Ischämie) vorwiegend sinusoidale Endothelzellen (SEC) geschädigt werden, konnten in verfetteten Lebern hauptsächlich Hepatozyten als Manifestationsorte von IRS identifiziert werden (Taneja C, 1998). Hepatozelluläre Fetteinlagerungen führen zu einer Zunahme der Zellgröße bzw. des Zellvolumens (Teramoto K, 1993a; Sun CK, 2001). Zusammen mit einer in steatotischen Lebern festgestellten Reduzierung des Blutflusses (Sato N, 1986; Ghoshal AK, 1993; Hayashi M, 1993; Seifalian AM, 1999) kann dies zu einer Mangelversorgung der Hepatozyten mit Sauerstoff führen und in einer Art „Diffusionsbarriere“ für Nährstoffe resultieren (Van Steenberg W, 1995). Die Hepatozyten verfetteter Lebern werden dadurch anfälliger gegenüber I / R.

Darüber hinaus sind steatotische Lebern während der Reperfusion nicht in der Lage, den nach Ischämie reduzierten Phospholipidgehalt wieder aufzufüllen (Reddy MC, 1996). Die Folge ist eine Beeinträchtigung der Fluidität von Plasmamembranen und damit der hepatozellulären Integrität. Weiterhin scheint ein gegenüber normalen Lebern reduziertes Verhältnis von Cholesterin zu Phospholipiden sowie die Abnahme von mehrfach ungesättigten Fettsäuren die Fluidität von Plasmamembranen in fettinfiltrierten Lebern zusätzlich herabzusetzen (Fukumori T, 1999).

Selzner et al. berichteten 2000 von einer eingeschränkten Regenerationsfähigkeit von steatotischen Lebern nach Leberteilresektion (Selzner M, 2000b). Diese Beobachtung wurde durch Studien unterstützt, die in verfetteten Lebern nach I / R eine deutlich herabgesetzte Induktion von sog. „immediate early genes (IEGs)“ feststellen konnten. Diese Gene kodieren für wichtige Proteine, die an der Zellreparatur beteiligt sind (Tsuchiya T, 1998 und 2000).

- Veränderungen der hepatischen Mikrozirkulation:

„Kalte“ Ischämie bewirkt eine Verfestigung der hepatozellulären Fetteinschlüsse, die während der Reperfusion zur Zellruptur (Belzer FO, 1988; D'Alessandro A, 1991) und damit zur Einschwemmung von Fettpartikeln sowie von hepatozellulären Fragmenten in den sinusoidalen Raum führen können (Todo S, 1989; Teramoto K, 1993a; Nakano H, 1997). Zusammen mit der bereits erwähnten Zunahme der Hepatozytengröße kann dadurch die hepatische Mikrozirkulation erheblich gestört werden. Unterschiedliche Ergebnisse liegen zu den Veränderungen des sinusoidalen Durchmessers in steatotischen Lebern vor: Während diätetische Modelle der Fettleberinduktion (z. B. CMD) vorwiegend von einer drastischen Abnahme des sinusoidalen Durchmessers von bis zu 54 % berichten (Ohhara K, 1989; Ghoshal AK 1993; Teramoto K, 1993a), konnten derartige Veränderungen in genetischen Modellen mit homozygoten Zucker-Ratten nicht beobachtet werden (Sun CK, 2001). Leukozyten scheinen bei der Aggravation von IRS in fettinfiltrierten Lebern keine wesentliche Rolle zu spielen: Verschiedene Studien konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass I / R in steatotischen Lebern keine vermehrte Rekrutierung von Leukozyten gegenüber normalen Lebern bewirkt (Koneru B, 1995; Yamada S, 2000; Sun CK, 2001).

- Veränderungen der Kupffer-Zell-Aktivität:

Teramoto et al. wiesen 1993 in einem in-vivo-Modell der Ratte eine zunehmende Aktivität und Anzahl von Kupffer-Zellen (KC) in steatotischen Lebern nach (Teramoto K, 1993a). Dagegen beobachteten Yang und Mitarbeiter in-vitro eine Abnahme der Phagozytose-Aktivität von KC in Fettlebern, die allerdings gegenüber normalen Lebern mit einer Steigerung der ROS- und IL-6-Freisetzung aus diesen KC assoziiert war (Yang SQ, 1997).

- Veränderungen in subzellulären Strukturen:

Mehrere Arbeitsgruppen befassten sich mit der Beeinträchtigung der *mitochondrialen Funktion* in verfetteten Lebern: So scheint die Fähigkeit zur ATP-Bildung in Mitochondrien steatotischer Lebern vor allem nach I / R deutlich gegenüber normalen Lebern herabgesetzt zu sein (Hayashi M, 1993; Hui AM, 1994; Fukumori T, 1997; Nakano H, 1998). Rashid et al. berichteten in diesem Zusammenhang von einer Zunahme des sog. „uncoupling protein-2 (UCP-2)“ in fettinfiltrierten Lebern, einem Protein der inneren mitochondrialen Membran, das über eine Reduzierung des transmembranösen Potentials zu einer Abnahme der ATP-Synthese und zu einer gesteigerten Produktion von ROS führen kann (Rashid A, 1999). Auch Sun et al. konnten mithilfe von Rhodamin 123 und IVM eine Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials nach I / R in steatotischen Lebern nachweisen (Sun CK, 2001). Darüber hinaus sind die in Fettlebern zahlreich vorhandenen nicht-veresterten Fettsäuren in der Lage, die mitochondriale β -Oxidation direkt zu hemmen (Fromenty B, 1997a und b). Dadurch kann Acetyl-CoA nur ungenügend zur Verfügung gestellt werden. Wichtige Energiequellen, wie die Gluconeogenese und der Zitronensäure-Zyklus werden dadurch inhibiert. Diese gesteigerte ATP-Depletion in fettinfiltrierten Lebern wird auch für die stärker ausgeprägten, nekrotischen Veränderungen nach I / R verantwortlich gemacht (Selzner M, 2000a): Während normale Lebern adäquate Mengen an ATP zur Verfügung haben, um nach I / R apoptotische, energieabhängige Mechanismen zu aktivieren, dominiert in verfetteten Lebern aufgrund des ATP-Mangels der nekrotische Zelluntergang (Selzner M, 2000a). Dadurch werden inflammatorische Vorgänge zusätzlich unterhalten. Die Folge ist eine Aggravation des hepatischen IRS.

Ein gesteigertes Angebot an freien Fettsäuren in steatotischen Lebern führt in den hepatozellulären *Peroxisomen* zu einer verstärkten Aktivierung des Transkriptionsfaktors „PPAR α “. Dieser reguliert die peroxisomalen Enzyme, die an der Metabolisierung von Fettsäuren beteiligt sind (Reddy JK, 1986). Die Folge ist eine Zunahme der peroxisomalen β -Oxidation sowie des „unerwünschten“ Nebenprodukts Wasserstoffperoxid (Osmundsen H, 1991; Day CP, 1998b). Diese ROS wiederum können die peroxisomalen, antioxidativen Systeme (z. B. Katalase)

überfordern und zur Induktion eines chronischen, oxidativen Stresses führen (Murphy PA, 1979; Reddy JK, 1986). Dafür sprechen auch herabgesetzte Aktivitäten des peroxisomalen Enzyms Katalase in verfetteten Lebern (Soltys K, 2001).

In *Mikrosomen* können durch eine Zunahme von freien Fettsäuren sog. „Cytochrom P-450 Enzyme“ induziert werden (Leclercq IA, 2000). Diese bewirken in Abhängigkeit von NADPH ebenfalls eine verstärkte ROS-Produktion sowie Lipidperoxidation und damit einen chronischen, oxidativen Stress.

- Zunahme des oxidativen Stresses / Beeinträchtigung antioxidativer Systeme:

Der verstärkten Produktion von ROS sowie den herabgesetzten antioxidativen Verteidigungsmechanismen werden Schlüsselrollen bei der gesteigerten Vulnerabilität steatotischer Lebern gegenüber Ischämie / Reperfusion zugeschrieben. Auf diese entscheidenden Faktoren soll später an geeigneter Stelle eingegangen werden (s. 5.4.3.2).

5.4.2 Charakterisierung des eigenen Modells der moderat verfetteten Rattenleber

5.4.2.1 Hepatozelluläre Integrität

Zur Bewertung der hepatozellulären Integrität bzw. des Ausmaßes des parenchymalen Schadens wurden die Aktivitäten des leberspezifischen Enzyms ALT (GPT) bestimmt sowie licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Mit Hilfe dieser Parameter war es möglich, die signifikant erhöhte Vulnerabilität von Lebern mit einem Verfettungsgrad von 30 bis 60 % gegenüber dem Ischämie- / Reperfusionstrauma zu beweisen und dieses Modell der moderat vorgeschädigten Leber zu charakterisieren. Enzymbestimmungen und morphologische Analysen wurden dabei miteinander kombiniert, da Transaminaseerhöhungen und parenchymale Desintegration des Lebergewebes zeitlich verschoben auftreten können (Korsrud GO, 1973a).

- Leberenzyme:

Die ALT-Aktivität im Plasma wird als äußerst sensitiver Parameter einer hepatozellulären Schädigung angesehen (Korsrud GO, 1972; Clary JJ, 1973; Ghys A, 1975). Dagegen muss eine Erhöhung der Aktivität des leberunspezifischen Enzyms LDH nicht zwingend mit einem hepatozellulären Schaden einhergehen und wurde daher nicht zur Beurteilung von IRS herangezogen.

Der direkte Vergleich verfetteter mit nicht-steatotischen Lebern belegte dabei eindrücklich, dass bei einem vergleichbaren Ischämie- / Reperfusionstrauma wesentlich größere Leberzellschäden in verfetteten Lebern auftreten: Gegenüber scheinoperierten Tieren kam es nach I / R zu einem etwa 6fachen Anstieg der ALT-Aktivitäten in Tieren mit normalen Lebern. Steatotische Lebern zeigten dagegen nach I / R eine ungefähr 18fache Zunahme der Leberenzyme und damit eine wesentlich stärkere Beeinträchtigung der hepatozellulären Integrität (s. Abb. 4.1).

Ähnliche Ergebnisse lieferten eine Reihe weiterer Arbeitsgruppen: Koneru und Mitarbeiter konnten sowohl nach 45 als auch nach 90 Minuten warmer Ischämie der linken und linksmedianen Leberlappen deutlich höhere ALT-Aktivitäten in verfetteten gegenüber normalen Lebern feststellen. Dies geschah ebenfalls unter Verwendung von homozygoten und heterozygoten Zucker-Ratten und über eine Reperfusionszeit von insgesamt 24 Stunden Dauer (Koneru B, 1995). In einer weiteren Studie mit Zucker-Ratten resultierten eine partielle, 40minütige Ischämie und eine anschließende Reperfusionszeit von 60 Minuten in einem 24fachen Anstieg der ALT-Aktivitäten in verfetteten Lebern, während die Zunahme der Leberenzyme in normalen Lebern lediglich das 3fache betrug (Sun CK, 2001). Auch in fettinfiltrierten Lebern, die durch eine Cholin-Methionin-defiziente Diät (CMDD) induziert wurden, führten Ischämie (60 Minuten) / Reperfusion (120 Minuten) zu einer signifikant stärkeren Zunahme der ALT-Aktivitäten im Vergleich zu nicht-vorgeschädigten Lebern (Nakano H, 1998). Diese experimentellen Studien zeigen eine wesentlich stärkere Beeinträchtigung der hepatozellulären Integrität in verfetteten Lebern und damit deren erhöhte Vulnerabilität gegenüber Ischämie / Reperfusion.

- Licht- und elektronenmikroskopische Befunde:

Die *histologischen Untersuchungen* erbrachten keine relevanten Unterschiede zwischen normalen und vorgeschädigten (verfetteten) Lebern nach I / R (s. Abb. 4.2.a-b). Drastische Veränderungen scheinen sich auch erst mit zunehmender Reperfusion zu ergeben, wie Koneru et al. zeigen konnten: Während sich die histologischen Aufnahmen normaler und verfetteter Lebern nach einstündiger Reperfusion nicht unterschieden, kam es nach 48 Stunden Reperfusion zu deutlich ausgeprägteren, nekrotischen Veränderungen in Tieren mit steatotischen Lebern (Koneru B, 1995). Hakamada und Mitarbeiter konnten erst nach 6 Stunden Reperfusion eine stärkere Verlegung der sinusoidalen Strombahn in verfetteten gegenüber normalen Lebern erkennen (Hakamada K, 1997). Die gewählte Reperfusionzeit von 120 Minuten dürfte daher im eigenen Modell zu kurz gewählt sein, um histologische Unterschiede zwischen vorgeschädigten und normalen Lebern beurteilen zu können.

Dagegen waren IRS auf ultrastruktureller Ebene (*Elektronenmikroskopie*) bereits nach 120 Minuten Reperfusion zu erkennen und in steatotischen gegenüber normalen Lebern unterschiedlich ausgeprägt: Charakteristisch für IRS nach warmer Ischämie war in normalen Lebern die Ausbildung von Vakuolen, die die Hepatozyten z. T. komplett verdrängen bzw. ersetzen konnten (s. Abb. 4.3.b). Dagegen fanden sich in verfetteten Lebern nach vergleichbarer Ischämie- und Reperfusionzeit erhebliche Schwellungen des sinusoidalen Endothels (s. Abb. 4.3.d). Beide Gruppen wiesen darüber hinaus eine Zunahme der Peroxisomenzahl nach I / R auf.

Fukumori et al. führten 1999 elektronenmikroskopische Untersuchungen an steatotischen Lebern homozygoter Zucker-Ratten nach 12 Stunden „kalter“ Ischämie durch (Fukumori T, 1999): Die sinusoidalen Endothelzellen verfetteter Lebern wiesen dabei eine stärker ausgeprägte Ablösung von der subendothelialen Matrix bzw. eine deutlichere Schwellung („rounding“) im Gegensatz zu normalen Lebern auf. Darüber hinaus kam es in dieser Studie zu einer deutlichen Reduktion der hepatozellulären Mikrovilli in Tieren mit fettinfiltrierten Lebern. Auch Nakano und Mitarbeiter konnten nach 24 Stunden „kalter“ Ischämie und anschließender 120minütiger Reperfusion

stärkere, ultrastrukturelle IRS in steatotischen gegenüber normalen Lebern nachweisen (Nakano H, 1997): Eine drastischere Ablösung sinusoidaler Endothelzellen sowie eine zunehmende Verlegung der Sinusoide durch hepatozelluläre Fragmente charakterisierten IRS verfetteter Lebern in diesen elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Peroxisomen enthalten das Enzym Katalase und besitzen damit antioxidative Verteidigungsmechanismen gegenüber ROS (Singh I, 1996). Die beobachtete Zunahme der Peroxisomenzahl in normalen und verfetteten Lebern könnte daher mit der stärkeren, hepatischen Produktion von ROS nach Ischämie / Reperfusion zusammenhängen und mit deren Detoxifikation durch Peroxisomen in Verbindung gebracht werden (Singh I, 1996; Singh AK, 1995).

Die Bestimmung des leberspezifischen Enzyms ALT sowie die morphologischen Untersuchungen zeigten damit deutlich aggravierte IRS und eine massivere Beeinträchtigung der hepatozellulären Integrität nach I / R in verfetteten gegenüber nicht-vorgeschädigten Lebern.

5.4.2.2 Hepatozelluläre Funktion – Der Gallefluss

Die Galleproduktion ist der geeignetste klinische Parameter zur Bewertung der hepatozellulären Funktion (Bowers BA, 1987) und wird durch den zellulären ATP-Gehalt reguliert (Slater TF, 1970; Sumimoto K, 1988). Bereits vor einigen Jahren konnten Lee und Clark zeigen, dass der Gallefluss an der isoliert perfundierten Rattenleber sehr gut mit der hepatischen Funktion korreliert (Lee D, 1977). Kamada et al. kamen zu ähnlichen Ergebnissen bei der Bewertung der hepatozellulären Funktion in einem Lebertransplantationsmodell der Ratte (Kamada N, 1980).

Die eigenen Versuche zeigten zunächst eine drastische Abnahme des Galleflusses während der 60minütigen Ischämie sowohl in normalen als auch in verfetteten Lebern (s. Abb. 4.14 und 4.15). Deutliche Unterschiede zwischen diesen beiden Gruppen ergaben sich während der zweistündigen Reperfusion: Die Galleflussraten nahmen in normalen Lebern mit zunehmender Reperfusionsdauer langsam zu – die

hepatozelluläre Funktion in diesen nicht-vorgeschädigten Lebern schien sich also während der Reperfusion allmählich zu erholen (s. Abb. 4.14). Dagegen wiesen steatotische Lebern während der Reperfusion keine Zunahme der Galleflussraten auf: Die Galleproduktion in den verfetteten Lebern verharrte auf dem Level der Werte während der Ischämie (s. Abb. 4.15). Darüber hinaus scheint die Galleproduktion grundsätzlich vom Verfettungsgrad der Leber abzuhängen: Dies belegen bereits reduzierte Galleflussraten in Sham-Tieren mit steatotischen Lebern gegenüber Sham-Tieren mit normalen Lebern (s. Abb. 4.16).

Auch andere Arbeitsgruppen beobachteten eine deutlich ausgeprägtere Einschränkung der hepatozellulären Funktion in vorgeschädigten gegenüber normalen Lebern nach I / R: Taneja und Mitarbeiter berichteten von einer stärkeren Beeinträchtigung der Galleproduktion in steatotischen Lebern von homozygoten Zucker-Ratten nach 30 Minuten „kalter“ Ischämie und darauffolgender 90minütiger Reperfusion gegenüber heterozygoten Zucker-Ratten mit normalen Lebern (Taneja C, 1998). Eine Zunahme der Reperfusiondauer (24 Stunden) führte in dieser Studie der isoliert perfundierten Rattenleber jedoch zu keiner weiteren Steigerung des Unterschiedes bzgl. der Galleproduktion, sondern zu einer weiteren Abnahme des Galleflusses in normalen Lebern, während der niedrige Gallefluss in den verfetteten Lebern weitestgehend konstant blieb. Nach 24 Stunden Reperfusion zeigten daher verfettete und normale Lebern ähnliche Galleflussraten. Nakano et al. verwendeten zur Induktion einer verfetteten Rattenleber eine Cholin-Methionin-defiziente Diät (CMDD). Auch in diesem Modell konnten in fettinfiltrierten Lebern sowohl nach 24 Stunden „kalter“ Ischämie als auch nach 60 Minuten „warmer“ Ischämie signifikant reduzierte Galleflussraten im Gegensatz zu normalen, ebenfalls postischämischen Lebern festgestellt werden (Nakano H, 1997).

Auf die eingeschränkte Fähigkeit zur mitochondrialen ATP-Synthese in verfetteten Lebern wurde bereits hingewiesen (s. 5.4.1 – Veränderungen in subzellulären Strukturen). Zahlreiche energieabhängige Prozesse werden durch diesen ATP-Mangel beeinträchtigt, wie z. B. die „organisierte“, nicht-entzündliche Form des Zelltodes, die Apoptose (Selzner M, 2000a). Auch die Galleproduktion wird durch den zellulären ATP-Gehalt reguliert (Slater TF, 1970; Sumimoto K, 1988) und könnte

daher aufgrund des geringeren Angebotes von ATP in steatotischen Lebern vermindert sein.

5.4.2.3 Ergebnisse der intravitalem Fluoreszenzmikroskopie (IVM)

Die Bestimmung der Leberenzyme, elektronenmikroskopische Befunde sowie die Quantifizierung des Galleflusses zeigten eine stärkere Vulnerabilität fettinfiltrierter Lebern gegenüber Ischämie / Reperfusion und charakterisierten damit das hier verwendete Modell der moderat verfetteten Rattenleber. Intravitalemikroskopische Untersuchungen wurden nun herangezogen, um auf mikrozirkulatorischer Ebene nach Ursachen für diese Aggravation von IRS in vorgeschädigten Lebern zu suchen.

- Sinusoidale Perfusionsrate und midzonale Sinusoidweiten:

Zwei wesentliche Phänomene charakterisieren die postischämischen Reperfusionsschäden in intravitalemikroskopischen Untersuchungen (Menger MD, 1991): Das sog. „no-reflow“-Phänomen beschreibt ein initiales Versagen der mikrovaskulären Strombahn nach Freigabe der Organdurchblutung und damit eine Verlängerung der lokalen Hypoxie. Dagegen erfolgt beim sog. „reflow-paradox“-Phänomen nach zunächst erfolgreicher Reperfusion eine sekundäre Mikrozirkulationsstörung, für die in erster Linie aktivierte Kupffer-Zellen und rekrutierte Leukozyten verantwortlich gemacht werden (s. 1.1.2).

Unterschiedliche Pathomechanismen sind an der Entstehung des „no-reflow“-Phänomens beteiligt: Zellschwellungen des sinusoidalen Endothels (Vollmar B, 1994a), intravaskuläre Hämokonzentration (Menger MD, 1988) oder eine Imbalance zwischen Vasokonstriktoren (z. B. Endothelin) und Vasodilatoren (z. B. Stickstoffmonoxid, NO), die bei Ischämie / Reperfusion aus verschiedenen, aktivierten Zellen sezerniert werden (Nakamura S, 1995; Clemens MG, 1997), scheinen bei der Entstehung des „no-reflow“-Phänomens eine entscheidende Rolle zu spielen.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Anteil nicht-perfundierter Sinusoide sowie der mittlere sinusoidale Durchmesser herangezogen, um sinusoidales Perfusionsversagen zu beurteilen: Dabei führte Ischämie / Reperfusion in normalen und steatotischen Lebern zu einem vergleichbaren Anstieg nicht-perfundierter Sinusoide um 22 bzw. 24 % (s. Abb. 4.4.a und b). Auch der sinusoidale Durchmesser nahm in normalen und verfetteten Lebern vergleichbar um 29 – 30 % ab (s. Abb. 4.10.a und b). Somit konnten in den unbehandelten Kontrollgruppen keine Unterschiede zwischen steatotischen und normalen Lebern bezüglich der sinusoidalen Perfusionsrate und der sinusoidalen Durchmesser nach I / R ermittelt werden.

Andere Autoren berichten jedoch von deutlichen Unterschieden zwischen steatotischen und normalen Lebern: So konnten Ohhara und Mitarbeiter in Lebern steatotischer Ratten eine 54%ige Verschmälerung der Sinusoidweite gegenüber normalen Lebern beobachten. Diese Untersuchungen erfolgten dabei an „unbeschädigten“ Lebern – Ischämie / Reperfusion wurde in dieser Studie also nicht induziert (Ohhara K, 1989). Wada et al. beschrieben eine zunehmende sinusoidale Stenose als Ursache der portalen Hypertension in zirrhotischen Fettlebern der Ratte (Wada K, 1974) und auch die Arbeitsgruppe von Seifalian wies eine generelle Verminderung des mikrozirkulatorischen Blutflusses in moderat und schwer verfetteten Lebern unter Verwendung eines Laserdopplers nach (Seifalian A, 1999). Teramoto et al. demonstrierten ebenfalls eine Abnahme der Sinusoidweite und des Anteils an perfundierten Sinusoiden in steatotischen Lebern nach Transplantation und Reperfusion (Teramoto K, 1993a).

Dennoch sei bezüglich der Ergebnisse dieser Arbeitsgruppen angeführt, dass lediglich „high-fat diets“ bzw. die sog. „CMDD“ zur Fettleberinduktion verwendet wurden. In einer anderen Studie mit genetisch veränderten Zucker-Ratten konnten dagegen keine Unterschiede im Perfusionsversagen bzw. im sinusoidalen Durchmesser zwischen normalen und verfetteten Lebern nach I / R ermittelt werden und unterstützt somit die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit (Sun CK, 2001). Eine weitere, tierexperimentelle Studie mit homo- und heterozygoten Zucker-Ratten fand nach 24 Stunden „kalter“ Ischämie ebenfalls keine Unterschiede zwischen normalen und verfetteten Lebern bezüglich Perfusionsrate und portalem Widerstand (Taneja C, 1998). Die mikrozirkulatorischen Veränderungen steatotischer Lebern scheinen

daher vom verwendeten Modell der Fettleberinduktion abzuhängen. Es ist vorstellbar, dass die bereits erwähnte inflammatorische Begleitreaktion in einigen Fettlebermodellen, wie z. B. in ethanol- oder CMDD-induzierten Fettlebern (Rogers AE, 1973; Teramoto K, 1993b), zusätzliche Mechanismen aktivieren, die sich negativ auf die hepatische Mikrozirkulation auswirken können. Darüber hinaus dürfte auch der Grad der hepatischen Verfettung am Ausmaß des mikrovaskulären Perfusionsversagens beteiligt sein: In der von Teramoto et al. vorgestellten Studie zur Mikrozirkulation transplantierte Fettlebern der Ratte resultierte die hepatozelluläre Verfettung in einer drastischen Zunahme des Zellvolumens und dadurch in einer sekundären Einengung des sinusoidalen Lumens (Teramoto K, 1993a). Dagegen wiesen die Hepatozyten der verwendeten, homozygoten Zucker-Ratten eine größtenteils „mikrovesikuläre“ Verfettung auf (s. 4.1.2) und schienen daher den sinusoidalen Raum nicht zu beeinträchtigen. Interessanterweise konnten Sun und Mitarbeiter trotz Zunahme des hepatozellulären Volumens in steatotischen, homozygoten Zucker-Ratten keine Veränderung des sinusoidalen Durchmessers im Vergleich zu normalen Lebern heterozygoter Zucker-Ratten feststellen (Sun CK, 2001).

- Leukozyten-Adhärenz in den Leberlobuli und in den PSV:

Leukozyten und darunter vor allem polymorphkernige, neutrophile Granulozyten (PMN) sind nach ihrer Aktivierung (Martinez-Mier G, 2000) durch ROS und durch verschiedene Zytokine, wie z. B. $TNF\alpha$, an der Genese des Reperfusionsschadens maßgeblich beteiligt (Jaeschke H, 1990a) und spielen vor allem bei der Entstehung des sog. „reflow-paradox“ (Menger MD, 1991) eine entscheidende Rolle. Unterschieden wurden diesbezüglich ICAM-1 vermittelte Leukozyten-Adhärenzen in PSV (Vollmar B, 1995) und solche in den Sinusoiden der Leberlobuli, für die P-Selektin als Vermittler der sinusoidalen Aggregation postuliert wurde (Horie Y, 1997). Eine sinusoidale Leukozytenstase muss dabei nicht zwingend mit einer Beeinträchtigung der sinusoidalen Perfusion einhergehen (Vollmar B, 1996). Siehe hierzu auch 1.1.2.

Nach Ischämie / Reperfusion konnte sowohl in normalen Lebern als auch in solchen mit moderater Verfettung eine vergleichbare Zunahme der permanent adhärenenten Leukozyten („Sticker“) in den Leberlobuli und PSV beobachtet werden: Lobuläre, permanent adhärenente Leukozyten nahmen in normalen Lebern um das 7-fache, in steatotischen Lebern um das 6-fache zu (s. Abb. 4.6.a und b), während Sticker in PSV um das 7-fache in nicht-steatotischen und um das 9-fache in verfetteten Lebern anstiegen (s. Abb. 4.7.a und b). Roller (temporäre Leukozyten-Adhärenzen) nahmen in PSV normaler Lebern um das 4-fache, in steatotischen um das 3fache zu (s. Abb. 4.8.a und b). Somit ergaben sich keine unterschiedlich ausgeprägten Leukozyten-Adhärenzen in verfetteten bzw. normalen Lebern und scheinen daher nicht entscheidend an der Aggravation von frühen IRS in vorgeschädigten Lebern beteiligt zu sein.

Diese Beobachtung wird durch die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen unterstützt: Koneru et al. konnten mittels histologischer Untersuchungen an homo- und heterozygoten Zucker-Ratten nach einer 45- bzw. 90minütigen Ischämie und einer anschließenden 120minütigen Reperfusionsphase keine Unterschiede in der lobulären Leukozytenzahl zwischen normalen und verfetteten Lebern feststellen (Koneru B, 1995). Auch nach 30minütiger „warmer“ Ischämie und anschließender 4stündiger Reperfusion zeigten sich keine stärker ausgeprägten Leukozytenakkumulationen in steatotischen gegenüber normalen Lebern (Yamada S, 2000). Sun und Mitarbeiter beobachteten im Intravitalmikroskop ebenfalls vergleichbare Zunahmen der sinusoidalen Leukozyten-Adhärenzen nach I / R in verfetteten und normalen Lebern (Sun CK, 2001).

Sowohl der eigene Versuchsansatz als auch die oben angeführten Berichte anderer Arbeitsgruppen verwendeten eine zwei- bis vierstündige Reperfusionsphase, um Leukozyten-Adhärenzen nach I / R der Leber zu untersuchen. Während dieser frühen Phase der Reperfusion akkumulieren Leukozyten zwar in den Sinusoiden und PSV – ihre Zahl ist jedoch noch sehr gering und korreliert nicht mit dem Ausmaß von Zellschäden (Jaeschke H, 1991a). Hierfür sprechen auch isolierte PMN aus postischämischen Lebern, die in dieser frühen Phase keine erhöhte ROS-Produktion aufweisen (Jaeschke H, 1991d). Dagegen werden aktivierte Leukozyten gerade in

der späteren Reperfusionphase (ca. 6 bis 24 Stunden) für weitere Reperfusionsschäden verantwortlich gemacht (Jaeschke H, 1990a) und könnten dann an der gesteigerten Vulnerabilität von steatotischen Lebern gegenüber Ischämie / Reperfusion beteiligt sein.

Unterschiede zwischen normalen und vorgeschädigten (verfetteten) Lebern ergaben sich dagegen im Hinblick auf die Relation von permanenten zu temporären Leukozyten-Adhärenzen in PSV: Während Kontrolltiere mit normalen Lebern nach I / R anteilmäßig mehr Roller als Sticker aufwiesen, überwogen in der Kontrollgruppe mit verfetteten Lebern eindeutig die permanent adhärennten Leukozyten (Sticker) (s. Abb. 4.9).

Die permanente Leukozyten-Adhärenz wird in PSV über β_2 -Integrine der Leukozyten (z. B. LFA-1 und Mac-1) sowie über Adhäsionsmoleküle des venulären Endothels (z. B. ICAM-1) vermittelt (Jaeschke H, 1993b; Vollmar B, 1995). Gerade das Adhäsionsmolekül ICAM-1 scheint dabei in steatotischen Lebern eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung von IRS zu spielen. Dies belegen tierexperimentelle Studien, die in verfetteten Lebern unter Verwendung von monoklonalen Antikörpern gegen ICAM-1 sowohl den hepatozellulären Schaden reduzieren als auch die Überlebensraten der Versuchstiere nach I / R steigern konnten (Nakano H, 1997; Hakamada K, 1997). Vergleichende Untersuchungen zu einer unterschiedlich ausgeprägten Expression von Adhäsionsmolekülen in normalen und steatotischen Lebern fehlen jedoch bislang, so dass das Überwiegen von Stickern gegenüber Rollern in den steatotischen Lebern der eigenen Studie noch nicht endgültig erklärt werden kann.

- Phagozytose-Aktivität von Kupffer-Zellen (KC):

Aktivierte KC (s. Abb. 5.1) spielen vor allem bei der Ausbildung des *frühen*, hepatischen Reperfusionsschadens eine entscheidende Rolle (Brass CA, 1995), da diese eine Vielzahl von proinflammatorischen Zytokinen (z. B. $\text{TNF}\alpha$, IL-13, LT-B4, PAF), vasoaktiven Substanzen, proteolytischen Enzymen und ROS freisetzen können (Decker K, 1990; Wanner GA, 1996). Durch diese Mediatoren bewirken KC

wiederum die Expression von Adhäsionsmolekülen (Patel KD, 1991; Fan C, 1999) bzw. die Freisetzung von Chemokinen (Konishi K, 1993; Ohtsuka T, 1996; Luster AD, 1998) und tragen so zur Genese des IRS bei. Andererseits besitzen KC die wichtige Aufgabe der „endogenen Clearance“, d. h. sie sind für die Elimination von Substraten (z. B. Endotoxinen) verantwortlich, die während I / R freigesetzt wurden (Miyata T, 1989; Yokoyama I, 1989; Bouwens L, 1992). Vor diesem Hintergrund erfolgte die funktionelle Untersuchung von KC.

Zur Analyse der Phagozytose-Aktivität von KC wurden unter Verwendung der IVM fluoreszierende Latexpartikel injiziert (McCuskey RS, 1987; Post S, 1992), die von KC aufgenommen werden. Die Menge der Latexpartikel wurde dabei weit unter der Anzahl von KC in Rattenlebern gewählt, um der Gefahr einer Sättigung der Partikelaufnahme durch KC zu begegnen (Bouwens L, 1986) und um so die tatsächliche Phagozytose-Aktivität ermitteln zu können. Latexpartikel mit einem hier verwendeten Durchmesser von 1,1 µm werden vorwiegend von KC phagozytiert (Praaning – Van Dalen DP, 1982; Dan C, 1985). Dennoch kann nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden, dass die Partikelaufnahme zu einem geringen Teil auch durch Endothelzellen erfolgt. Mittels intravitalmikroskopischer Methoden können durch Endothelzellen aufgenommene Latexpartikel nicht von solchen in bzw. an KC unterschieden werden.

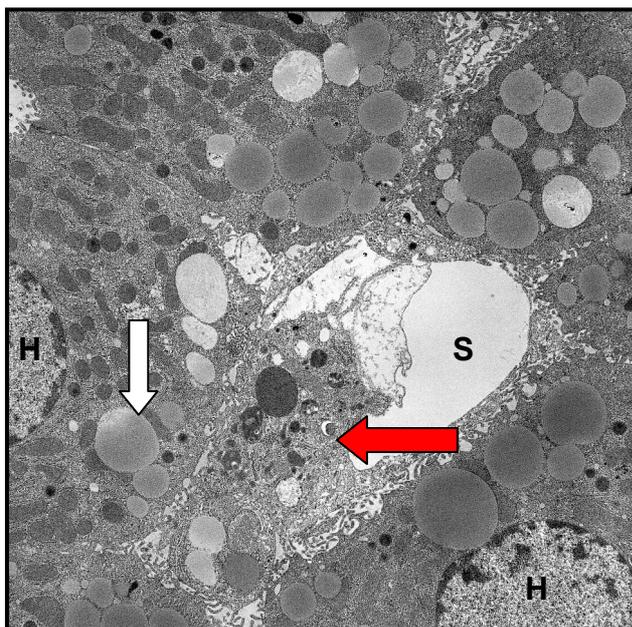


Abb. 5.1: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer KC im Disse'schen Raum (roter Pfeil). Die Untersuchung erfolgte am linken Leberlappen einer moderat verfetteten Leber. Die mikrovesikulären Fettvakuolen (weißer Pfeil) sind deutlich zu erkennen. H = Hepatozyt; S = Sinusoid.

Die Bestimmung der Phagozytose-Aktivität von KC in den eigenen Versuchen ergab einen deutlichen Unterschied zwischen normalen und steatotischen Lebern: Nicht-steatotische, normale Lebern wiesen nach Ischämie / Reperfusion keine signifikante Abnahme frei fließender, d. h. nicht-phagozytierter Latexpartikel auf (s. Abb. 4.11.a). Im Gegensatz dazu nahm dieser Anteil an nicht-phagozytierten Latexpartikel in verfetteten Lebern deutlich ab (s. Abb. 4.11.b). In steatotischen Lebern wurden nach I / R also mehr Latexpartikel phagozytiert als in normalen Lebern.

Teramoto und Mitarbeiter konnten ebenfalls an durch CMDD induzierten Fettlebern der Ratte nach 6 bzw. 18 Stunden „kalter“ Ischämie signifikant erhöhte Phagozytose-Aktivitäten von KC im Vergleich zu normalen Lebern feststellen (Teramoto K, 1993a). Zur Ermittlung der Phagozytose-Aktivität von KC verwendete diese Arbeitsgruppe sog. „kolloidalen Kohlenstoff“. In dieser Studie wird darüber hinaus von einer generell erhöhten, absoluten Anzahl von KC in fettinfiltrierten Lebern berichtet. Demgegenüber stehen In-vitro-Untersuchungen an Makrophagen der Leber aus steatotischen Mäusen, die eine herabgesetzte Phagozytose-Aktivität bei gleichzeitiger Zunahme der ROS-Produktion und Steigerung der IL-6-Freisetzung in diesen Zellen feststellen konnten (Yang SQ, 1997).

Da in der Vergangenheit die intakte Mikrozirkulation der Leber als eine wesentliche Voraussetzung für die Reduktion von Reperfusionsschäden nach „warmer“ und „kalter“ Ischämie betrachtet wurde, untersuchten wir erstmals in einem Modell der moderat verfetteten Rattenleber, ob prinzipielle Unterschiede von Mikrozirkulationsstörungen in normalen und verfetteten Lebern nachweisbar sind. Es bleibt festzuhalten, dass sich nach Ischämie / Reperfusion weitgehend vergleichbare Störungen der Mikrozirkulation in normalen und verfetteten Lebern feststellen ließen: Hinsichtlich der sinusoidalen Perfusion, des sinusoidalen Durchmessers sowie in bezug auf die Rekrutierung von Leukozyten ergaben sich keine Unterschiede zwischen steatotischen und normalen Lebern nach I / R. Dagegen konnten eine gesteigerte Phagozytose-Aktivität von KC sowie eine anteilmäßig stärkere Beteiligung von Stickern gegenüber Rollern in verfetteten Lebern nach I / R beobachtet werden.

5.4.3 Die Bedeutung von ROS bei Ischämie / Reperfusion der Leber

5.4.3.1 Derzeitiger Forschungsstand

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) spielen bei der Pathogenese hepatischer Reperfusionsschäden eine entscheidende Rolle. Dies konnte in verschiedenen, experimentellen Modellen durch direkten Nachweis von ROS und deren Oxidationsprodukte – wie z. B. von Glutathiondisulfid (GSSG) (Jaeschke H, 1988; 1990b; 1991c; 1996) und Malondialdehyd (MDA) – sowie indirekt durch die Schutzwirkung von Antioxidantien – wie z. B. SOD, Katalase und Vitamin E (Kondo S, 1996; Yabe H, 1999; Nagel E, 1997) – gezeigt werden. Als Produktionsstätten von ROS der Leber wurden dabei Hepatozyten, Endothelzellen, Kupffer-Zellen (KC) und polymorphkernige, neutrophile Granulozyten (PMN) identifiziert.

Gegenstand intensiver Forschungen war zunächst die intrazelluläre Radikalbildung: Bereits unter physiologischen Bedingungen ist in isolierten Hepatozyten die Bildung von $O_2^{\cdot-}$ und H_2O_2 nachweisbar. Während der Reoxygenierung von Hepatozyten, die bei 37°C über einen Zeitraum von 4 Stunden unter hypoxischen Bedingungen inkubiert worden waren, konnte eine deutlich Zunahme der ROS-Produktion beobachtet werden (Littauer A, 1992). Hierfür scheinen Störungen der mitochondrialen Atmungskette verantwortlich zu sein (Jaeschke H, 1989; Littauer A, 1992). Als weiterer Pathomechanismus der intrazellulären ROS-Bildung in Hepatozyten und Endothelzellen wird die Konversion der Xanthin-Dehydrogenase (XDH) zu Xanthin-Oxidase (XO) während der Ischämie angesehen (Stirpe F, 1969; Engerson TD, 1987). XO oxidiert dabei während der Reperfusion das anfallende Hypoxanthin zu Urat unter Verwendung von molekularem Sauerstoff. Hierbei entstehen $O_2^{\cdot-}$ und H_2O_2 . Im Vergleich zu Hepatozyten besitzen sinusoidale Endothelzellen der Leber lediglich geringe antioxidative Verteidigungsmechanismen. Dagegen ist die Aktivität der XO gerade in diesen Zellen besonders hoch ausgeprägt (Frederiks WM et al., 1993; Hamer I et al., 1995). Vor diesem Hintergrund wurde die intrazelluläre Bildung von ROS durch die Xanthin-Oxidase als entscheidender Faktor bei der Genese von Schäden am sinusoidalen Endothel während der Reperfusion

postuliert. Gegen diese Annahme spricht allerdings die fehlende Prävention von Sinusendothelschäden durch Allopurinol (Caldwell-Kenkel JC, 1995).

Zahlreiche Studien weisen darauf hin, dass die Bedeutung der XO als intrazellulärer ROS-Produzent eher gering einzustufen ist: Während Yokoyama und Mitarbeiter schon wenige Minuten nach Beginn der Reperfusion eine Zunahme der XO-Aktivität zeigen konnten (Yokoyama I, 1990), beobachteten Frederiks und Kooij keinen intrazellulären XO-Anstieg (Kooij A, 1994; Frederiks WM, 1996). Hepatozyten verfügen über eine sehr hohe antioxidative Kapazität, die auch postischämisch ausreichenden Schutz zu bieten scheint (Jaeschke H, 1988): Am Modell der isoliert perfundierten Rattenleber konnten nahezu unveränderte intrazelluläre GSSG-Konzentrationen nach normothermer Ischämie / Reperfusion nachgewiesen werden (Jaeschke H, 1988; Metzger J, 1988). Diese Ergebnisse zeigen, dass Hepatozyten auch während der Reperfusion auf ein enormes, antioxidatives Potential zurückgreifen können. Die in früheren Studien nachgewiesene, intrazelluläre ROS-Bildung kann daher nur bedingt für das Ausmaß von Reperfusionsschäden verantwortlich gemacht werden.

Anschließende Forschungen konzentrierten sich daher auf die Bildung von ROS im extrazellulären Kompartiment während der hepatischen Reperfusion: So konnten Experimente in-vivo zeigen, dass die plasmatischen GSSG-Konzentrationen nach normothermer Ischämie / Reperfusion drastisch anstiegen, während der intrazelluläre GSSG-Gehalt nahezu unverändert blieb (Metzger J, 1988; Jaeschke H, 1991c). Diese Zunahme an extrazellulärem, oxidativem Stress während der Reperfusion konnte in KC-depletierten Lebern drastisch reduziert werden (Jaeschke H, 1991c). Umgekehrt führte eine Aktivierung von KC durch Retinol zu einer weiteren Steigerung der plasmatischen GSSG-Konzentrationen (Jaeschke H, 1991a). Aufgrund dieser Beobachtungen wurde ein vaskulärer, oxidativer Stress durch aktivierte Kupffer-Zellen (KC) vor allem während der frühen Reperfusion postuliert (Jaeschke H, 1991c und 1992). Hierbei scheint die Aktivierung der NADPH-Oxidase in der Plasmamembran von KC eine entscheidende Rolle zu spielen, da durch diese $O_2^{\cdot-}$ -Radikale in die Lebersinusoiden freigesetzt werden können (Jaeschke H, 1991d). Als weitere Quelle extrazellulärer ROS der Leber wurden PMN identifiziert (Jaeschke H, 1990a; 1991a; 1991d). Auch in diesen Zellen ist die Freisetzung von $O_2^{\cdot-}$ durch die

NADPH-Oxidase der initiale Mechanismus der ROS-Produktion. Weiterhin sezernieren aktivierte Granulozyten das Enzym Myeloperoxidase, durch das Hypochlorsäure (HOCl) und toxische Chloramine – wie z. B. NH_2Cl und TauNHCl – gebildet werden können. Gerade Letzteren konnten durch Bilzer et al. ausgeprägte, hepatotoxische Eigenschaften zugeordnet werden (Bilzer M, 1991). Wie bereits oben näher erläutert wurde (s. 5.4.2.3 – Leukozyten-Adhärenzen), scheinen PMN aber eher in der späten Reperfusionphase bezüglich der ROS-Bildung von Bedeutung zu sein (Jaeschke H, 1990a; 1991a; 1991d). Für die frühe Phase der Reperfusion, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde, sind in erster Linie aktivierte KC verantwortlich.

ROS können unterschiedliche Mechanismen der Zellschädigung induzieren: Die bisher bekannten „direkten“ Mechanismen wie Proteinoxidation, Lipidperoxidation sowie DNA-Schäden wurden nur bei extrem hohen ROS-Bildungsraten beobachtet, die bei Ischämie / Reperfusion von gesunden Organen nicht zu erwarten sind. Diese Annahme wird durch die lediglich geringe Bildung von Lipidperoxidationsprodukten nach I / R der Leber unterstützt (Mathews WR, 1994). Von größerer Bedeutung dürften daher weitere, „indirekte“ Mechanismen sein: So konnte gezeigt werden, dass ROS die Synthese und Sekretion von PAF (Lewis MS, 1988; Zhou W, 1992), $\text{TNF-}\alpha$ und Interleukinen (Le Moine O, 1997) aktivieren können. Darüber hinaus sind O_2^- und H_2O_2 in der Lage, die Adhäsion von PMN während der Reperfusion zu verstärken (Koo A, 1992; Marzi I, 1992). Dies könnte durch eine ROS-induzierte Expression von Adhäsionsmolekülen an Endothelzellen, wie z. B. von GMP-140 (Patel KD, 1991) oder ICAM-1 (Fan C, 1999), sowie durch die Produktion von Chemokinen, wie z. B. des CINC (Konishi K, 1993; Ohtsuka T, 1996), erklärt werden. Für einen Großteil dieser Mechanismen wird die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 durch intra- und extrazellulär entstandene ROS verantwortlich gemacht, die derzeit Gegenstand intensiver Forschungen sind (Palmer HJ, 1997; Zwacka RM, 1998).

5.4.3.2 Die Bedeutung von ROS bei I / R in verfetteten Lebern

Soltys et al. konnten 2001 feststellen, dass verfettete Lebern homozygoter Zucker-Ratten einen erniedrigten, intrazellulären GSH-Gehalt sowie verminderte Katalase-Aktivitäten gegenüber heterozygoten Zucker-Ratten mit normalen Lebern aufweisen (Soltys K, 2001). Auch Nakano und Mitarbeiter berichteten von reduzierten mitochondrialen GSH-Werten in verfetteten gegenüber normalen Lebern (Nakano H, 1998). Darüber hinaus scheint auch der GSH-Efflux aus den Hepatozyten vorgeschädigter Lebern und damit die extrazelluläre Verfügbarkeit von GSH verringert zu sein (Burgunder JM, 1987). Diesen Ergebnissen vor Ischämie / Reperfusion könnte ein chronischer, oxidativer Stress in verfetteten Lebern zugrunde liegen, der zu einem Verbrauch antioxidativer Enzymaktivitäten und Mechanismen führt. Für die gesteigerte Produktion von ROS in steatotischen Lebern und für den dadurch entstehenden kontinuierlichen, oxidativen Stress werden vor allem Veränderungen in hepatozellulären Mitochondrien, Peroxisomen und Mikrosomen sowie Kupffer-Zellen verantwortlich gemacht (s. 5.4.1): Steatose führt zu einem Überangebot an freien Fettsäuren. Diese sind wiederum in der Lage, die Bildung von ROS in Mitochondrien (Rashid A, 1999), Peroxisomen (Reddy JK, 1986; Osmundsen H, 1991) sowie in Mikrosomen (Leclercq IA, 2000) direkt zu fördern. Eine häufig in nicht-alkoholisch verfetteten Lebern nachweisbare Erhöhung des intrazellulären Eisengehaltes wird für eine vermehrte, eisenabhängige Bildung reaktiver HO[•] verantwortlich gemacht (Sumida Y, 2003; Day CP, 1998a). Teramoto beschrieb darüber hinaus eine erhöhte Anzahl von Kupffer-Zellen in steatotischen Lebern (Teramoto K, 1993a), die den oxidativen Stress weiter unterhalten und steigern können.

Es ist daher leicht vorstellbar, dass vorgeschädigte (verfettete) Lebern unter chronischem, oxidativen Stress und mit bereits verminderten, antioxidativen Verteidigungsmechanismen empfänglicher für zusätzliche Schäden durch Ischämie / Reperfusion werden. ROS werden daher in fettinfiltrierten Lebern nach I / R vermehrt produziert und durch die reduzierte, antioxidative Kapazität in diesen Organen nur noch bedingt abgefangen (Hayashi M, 1993; Hui AM, 1994; Koneru B, 1995; Nardo B, 2001). Dadurch treten in steatotischen Lebern im Gegensatz zu nicht-

vorgeschädigten Lebern die „direkten“ Formen der Zellschädigung durch ROS immer mehr in den Vordergrund. So berichten mehrere experimentelle Studien von einer Zunahme von Lipidperoxidationsprodukten, wie z. B. Malondialdehyd (MDA), in steatotischen Lebern nach Ischämie / Reperfusion: Nardo et al. konnten am Modell der isoliert perfundierten Rattenleber nach 60 Minuten „warmer“ Ischämie und daran anschließender 60minütiger Reperfusion deutlich höhere MDA-Werte in verfetteten gegenüber normalen Lebern feststellen (Nardo B, 2001). Koneru und Mitarbeiter beobachteten in einem Lebertransplantationsmodell mit homozygoten und heterozygoten Zucker-Ratten ebenfalls eine gesteigerte Lipidperoxidation nach „kalter“ Ischämie / Reperfusion in verfetteten Lebern (Koneru B, 1995).

Angesichts dieser essentiellen Bedeutung von ROS bei der Aggravation von IRS in steatotischen Lebern sollte in der vorliegenden Arbeit geprüft werden, ob diese Schäden durch eine antioxidative Therapie verhindert werden können. Wir verwendeten hierfür das endogene Antioxidans Glutathion (GSH), das bei intravenöser Zufuhr am Menschen nach bis zu 200-facher Erhöhung seiner physiologischen, extrazellulären Konzentration keine toxischen Nebenwirkungen erzielte (Aebi S, 1991) und daher als geeignetes Medikament zur Prävention von hepatischen Reperfusionsschäden verwendet werden könnte.

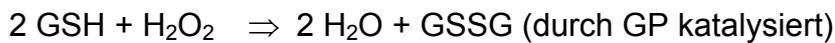
5.5 GSH-VERMITTELTE PROTEKTION NACH ISCHÄMIE / REPERFUSION IN NORMALEN UND VERFETTETEN LEBERN

5.5.1 Prävention hepatischer IRS durch Glutathion

Glutathion (GSH) ist ein Tripeptid (γ -Glutamyl-Cysteinyl-Glycin; s. Abb. 1.1) und in nahezu allen lebenden Zellen nachweisbar. Als wichtige Funktion wird dem Glutathion u. a. der Schutz von Zellbestandteilen gegenüber oxidierenden Substanzen zugeschrieben (Siegers CP, 1983) und durch die leicht oxidierbare Thiolgruppe des GSH ermöglicht. Eine Oxidation kann dabei auf zwei unterschiedlichen Wegen erfolgen:

1. Durch Katalyse über die Glutathion-Peroxidase (Chance B, 1979)
2. Durch direkte Oxidation der SH-Gruppen (Thiolgruppen)

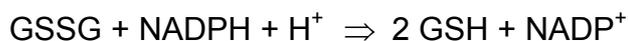
Das Enzym *Glutathion-Peroxidase (GP)* verwendet GSH als Co-Substrat (Protonen-Donator), um Wasserstoffperoxid H_2O_2 zu reduzieren. Hierbei entsteht aus zwei Molekülen reduziertem Glutathion (GSH) ein Molekül oxidiertes Glutathion, das sog. Glutathiondisulfid (GSSG):



Diese Reaktion findet vor allem intrazellulär statt und wird dort durch eine hohe Aktivität der GSH-Peroxidase gewährleistet (Aebi S, 1991). Im Plasma liegen dagegen nur geringe Aktivitäten dieses Enzyms vor (Halliwell B, 1990), so dass das Glutathion extrazellulär vorwiegend *nicht-enzymatisch*, d. h. direkt oxidiert wird:



GSSG entsteht sowohl bei der Katalyse durch das Enzym Glutathion-Peroxidase als auch bei der direkten Oxidation der Thiolgruppen des GSH. Unter Verbrauch von NADPH wird GSSG durch die Glutathion-Reduktase (GR) wieder zu GSH reduziert:



Unter physiologischen Bedingungen liegt Glutathion in der Leber vorwiegend in reduzierter Form vor: So beobachteten Srivastava et al. ein GSH/GSSG-Verhältnis von 400 : 1 (Srivastava SK, 1968). Kaplowitz und Mitarbeiter konnten in der Leber ein GSH/GSSG-Verhältnis von 250 : 1 feststellen (Kaplowitz N, 1985).

Die Hepatozyten besitzen zwei in anatomischer sowie funktioneller Hinsicht unterschiedliche Membranen: Die sinusoidale Zellmembran mit Abfluss in die Lebervene und die kanalikuläre Zellmembran mit Abfluss in die Gallenwege. Eine bestimmte Menge GSH verlässt kontinuierlich die Leberzelle und tritt in das

Blutplasma über (Anderson ME, 1980b). Die Menge an sinusoidal freigesetztem GSH ist dabei von der GSH-Konzentration in der Leberzelle abhängig (Ookhtens M, 1985): Steigen die Werte des intrazellulären GSH an, so erreicht die Freisetzung einen Sättigungsgrad; fallen diese Werte ab, geht auch der Efflux in das Blutplasma zurück. Aus diesen und weiteren Beobachtungen folgerten Kaplowitz und Mitarbeiter, dass es sich bei der sinusoidalen Freisetzung von GSH um einen carrier-vermittelten Transport handeln müsse (Kaplowitz N, 1985).

Dagegen verlässt GSSG die Hepatozyten sinusoidal in wesentlich geringeren Mengen: Bartoli et al. konnten eine zehnfach geringere Freisetzung von GSSG im Vergleich zu GSH feststellen (Bartoli GM; 1978).

Der Efflux von GSH auf kanalikulärem Weg in die Galle verhält sich direkt proportional zur GSH-Konzentration in der Leberzelle, jedoch ohne Zeichen einer Sättigungskinetik (Lauterburg BH, 1984b). Unklar ist jedoch, ob es sich hierbei um einen carrier-vermittelten Transport handelt oder um einen passiven Diffusionsvorgang. Vieles deutet jedoch auf einen aktiven Transportmechanismus hin (Siegers CP, 1983).

GSSG wird in großen Mengen aus den Hepatozyten kanalikulär in die Galle abgegeben. In der Galle konnten dadurch 10- bis 20-fach höhere GSSG-Konzentrationen gemessen werden als in den Leberzellen (Lauterburg BH, 1984b). Darüber hinaus besteht eine direkte Proportionalität zwischen diesen beiden Kompartimenten (Akerboom TP, 1982). Eine Sättigungskinetik bzgl. der Freisetzung von GSSG aus den Leberzellen konnte auch bei hohen hepatozellulären GSSG-Konzentrationen (über 200 μM) nicht festgestellt werden (Akerboom TP, 1982). Nimmt man jedoch an, dass es sich um einen ähnlichen Vorgang wie bei der Abgabe von GSSG aus den Erythrozyten handelt (Srivastava SK, 1971), so kann auch hier ein aktiver Transportmechanismus vorliegen. Srivastava und Mitarbeiter konnten dabei beobachten, dass der Transport von GSSG durch die Erythrozytenmembran energieabhängig ist: Der Transport von GSSG korrelierte mit dem ATP-Gehalt der Zelle, so dass ATP vermutlich für die Translokation von GSSG benötigt wird (Srivastava SK, 1971).

Die plasmatischen GSH-Konzentrationen betragen 5 bis 15 μM (Lauterburg BH, 1984a; Aebi S, 1991). Damit weist das extrazelluläre Kompartiment deutlich geringere, antioxidative Kapazitäten auf als der intrazelluläre Raum der Hepatozyten, in denen GSH-Konzentrationen von ca. 10 mM gemessen wurden (Lauterburg BH, 1984a). Es erscheint daher sinnvoll, vor allem die extrazellulären, antioxidativen Systeme nach I / R der Leber zu unterstützen. Intravenös zugeführtes Glutathion stellt in diesem Zusammenhang ein geeignetes Medikament auch für die Anwendung am Menschen dar, da dessen Pharmakokinetik annähernd bekannt ist und auch bei bis zu 200-facher Erhöhung der plasmatischen GSH-Konzentrationen ohne Nebenwirkungen toleriert wird (Aebi S, 1991).

5.5.2 Zytoprotektion durch GSH in normalen und verfetteten Lebern

Kobayashi et al. konnten durch eine einmalige, intravenöse Gabe von GSH vor einer zweistündigen Ischämiephase der Leber keine Reduktion der Zellschäden nach I / R nachweisen (Kobayashi H, 1992). Außerdem beobachteten Bilzer et al. am Modell der isoliert perfundierten Rattenleber nur dann zytoprotektive Effekte des GSH, wenn dieses über mindestens 120 Minuten während der Reperfusion zugeführt wurde (Bilzer M, 1999). Dies kann am wahrscheinlichsten durch die rasche, renale Elimination von GSH (Aebi S, 1991 und 1992) und damit durch die äußerst kurze Halbwertszeit von GSH (Wendel A, 1982) erklärt werden. Daher wurde GSH im eigenen Modell kontinuierlich während der Reperfusion bis zum Versuchsende zugeführt. Die verwendete Dosis betrug sowohl in normalen als auch in verfetteten Lebern 100 $\mu\text{mol} / \text{h} / \text{kg}$ i. v. Dabei konnten Versuche der eigenen Arbeitsgruppe eine dosisabhängige GSH-vermittelte Protektion nach I / R der Leber zeigen und nachweisen, dass eine Dosis von 100 $\mu\text{mol} / \text{h} / \text{kg}$ diesbezüglich effektiver war als eine Dosis von 50 $\mu\text{mol} / \text{h} / \text{kg}$. Eine weitere Steigerung der GSH-Zufuhr während der Reperfusion (200 $\mu\text{mol} / \text{h} / \text{kg}$) erzielte dabei keine weitere Zunahme der hepatozellulären Protektion nach I / R (Schauer RJ, 2000a).

Die Effektivität der hepatozellulären Protektion durch GSH nach Ischämie / Reperfusion wurde anhand von Leberenzymen sowie anhand von

elektronenmikroskopischen Aufnahmen beurteilt. Darüber hinaus erfolgte die Bestimmung des Galleflusses, um Aussagen über die hepatozelluläre Funktion nach I / R unter GSH-Zufuhr treffen zu können.

- Leberenzyme:

Die intravenöse Zufuhr von GSH erzielte in normalen und steatotischen Lebern eine vergleichbare Reduktion des leberspezifischen Enzyms ALT nach Ischämie / Reperfusion: Die ALT-Aktivität konnte nach I / R um 65 % in normalen Lebern und um 77 % in verfetteten Lebern reduziert werden (s. Abb. 4.12). Diese Ergebnisse deuten – besonders in fettinfiltrierten Lebern – auf einen zytoprotektiven Effekt des GSH sowie aufgrund des antioxidativen Potentials des GSH auf eine entscheidende Rolle von ROS bei der Genese des hepatozellulären Schadens hin. Unterstützung erfahren diese Ergebnisse durch elektronenmikroskopische Analysen.

- Elektronenmikroskopische Befunde:

IRS manifestierten sich auf ultrastruktureller Ebene unterschiedlich in normalen und verfetteten Lebern (s. 5.4.2.1): Während sich nach I / R in normalen Lebern Vakuolen in den Hepatozyten ausbildeten, fanden sich in steatotischen Lebern nach vergleichbarer Ischämie- und Reperfusionszeit vor allem Schwellungen der sinusoidalen Endothelzellen. Beide morphologischen Manifestationen des IRS – hepatozelluläre Vakuolisierung in normalen sowie Endothelzellschwellungen in verfetteten Lebern – konnten durch die intravenöse GSH-Zufuhr effektiv verringert werden (s. Abb. 4.13.a bis d). Darüber hinaus war unter GSH-Therapie eine drastische Reduktion der Peroxisomenzahlen in beiden Gruppen zu beobachten. Dies könnte mit der Detoxifikation von ROS durch Glutathion erklärt werden: Eine geringere Menge an ROS nach I / R benötigt zu deren Entgiftung möglicherweise weniger Peroxisomen, die mittels des Enzyms Katalase ebenfalls antioxidativ wirken können. Diese morphologischen Beobachtungen unterstreichen den zytoprotektiven Effekt des GSH in normalen und vorgeschädigten (verfetteten) Lebern.

- Gallefluss:

Der Gallefluss wurde zur Bewertung der hepatozellulären Funktion nach I / R herangezogen (Lee D, 1977; Kamada N, 1980).

GSH konnte die hepatozelluläre Funktion nach I / R nur in normalen Lebern verbessern. So zeigte sich unter GSH-Therapie im dynamischen Verlauf des Galleflusses eine zunehmende Erholung während der Reperfusion auf Werte, die annähernd denen von nicht-ischämischen Lebern entsprachen (s. Abb. 4.14). Diese Regeneration der hepatozellulären Funktion konnte in steatotischen Lebern unter intravenöser Zufuhr von GSH nicht erreicht werden. Die Galleflussraten blieben hier während der Reperfusion auf dem Niveau nicht-behandelter Kontrolltiere (s. Abb. 4.15 und 4.16). Für die fehlende Effektivität von GSH in steatotischen Lebern bieten sich hierfür zwei Erklärungsansätze an:

1. Die hepatozelluläre Schädigung nach I / R ist in verfetteten Lebern zu stark ausgeprägt, um kompensierbar zu sein.
2. Die Regeneration der hepatozellulären Funktion ist – auch unter GSH-Behandlung – ein zeitintensiver Prozess und konnte im Beobachtungszeitraum von 120 Minuten Reperfusion nicht erfasst werden. In diesem Zusammenhang konnten verzögerte Regenerationsprozesse in verfetteten Lebern bereits gezeigt werden (Selzner M, 2000b).

Insgesamt sprechen die drastischere Abnahme der Galleproduktion in der Reperusionsphase sowie die fehlende therapeutische Wirkung des GSH für eine wesentlich stärkere Beeinträchtigung der hepatozellulären Funktion in steatotischen gegenüber normalen Lebern nach Ischämie / Reperfusion.

5.5.3 Einfluss von GSH auf die Mikrozirkulation normaler und verfetteter Lebern

Die kontinuierliche, intravenöse Zufuhr von 100 $\mu\text{mol} / \text{h} / \text{kg}$ GSH führte in normalen und verfetteten Lebern zu einer vergleichbaren Verbesserung der Mikrozirkulation nach Ischämie / Reperfusion:

- Sinusoidale Perfusionsrate und midzonale Sinusoidweiten:

Die GSH-Therapie ermöglichte sowohl in normalen als auch in steatotischen Lebern eine vergleichbare Zunahme der sinusoidalen Perfusionsrate um 20 % (s. Abb. 4.4.a und b). Darüber hinaus führte GSH zu einer signifikanten Erweiterung der midzonalen Sinusoidweiten in normalen und verfetteten Lebern um 45 – 50 % (s. Abb. 4.10.a und b), so dass die präischämischen Durchmesser wiederhergestellt wurden.

ROS sind als vasokonstriktorisch wirksame Substanzen anzusprechen (Bilzer M, 1991 und 1996). Als solche können sie die hepatische Perfusion beeinträchtigen und zu einer Reduktion der sinusoidalen Durchmesser führen: Bilzer und Lauterburg konnten dem potenten Oxidans HOCl eine Erhöhung des hepatischen Perfusionsdrucks zuordnen (Bilzer M, 1991) und auch Schauer et al. beobachteten Mikrozirkulationsstörungen nach Lebertransplantation der Ratte, die durch ROS aus Kupffer-Zellen induziert wurden (Schauer RJ, 2001). Möglicherweise bewirken ROS eine sinusoidale Konstriktion, die über ein Ungleichgewicht von Vasokonstriktoren (z. B. Endothelin, Prostaglandine) und Vasodilatoren (z. B. NO) ausgelöst wird (Wang CY, 1995; Zhang JX, 1995). H₂O₂ scheint darüber hinaus die Proteinkinase C aktivieren zu können, die wiederum die Produktion von vasokonstriktorisch wirkenden Prostaglandinen fördert (Bilzer M, 1998). Eine antioxidative Therapie mit GSH könnte daher die ROS-medierte Vasokonstriktion abschwächen und damit zu einer Verbesserung der hepatischen Reperfusion führen. Bilzer et al. konnten allerdings auch zeigen, dass diese GSH-vermittelte, hämodynamische Wirkung zumindest teilweise durch die osmotischen Effekte des zugeführten GSH bedingt ist (Bilzer M, 1999).

- Leukozytenadhärenz in den Leberlobuli und in den PSV:

Die kontinuierliche, intravenöse Zufuhr von 100 µmol / h / kg GSH führte in normalen und verfetteten Lebern zu einer vergleichbaren Reduktion adhärenter Leukozyten sowohl in den Leberlobuli als auch in den postsinusoidalen Venolen (PSV) (s. Abb.

4.6 bis 4.8). Dabei wurden sowohl temporär adhärenzte (Roller) als auch permanent adhärenzte Leukozyten (Sticker) während der Reperfusion effektiv vermindert.

Es ist vorstellbar, dass die Zufuhr von GSH zu einer Blockade der ROS-medierte Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen und Leukozyten führt (Gasic AC, 1991). Da infolge der GSH-Applikation sowohl Sticker als auch Roller in den PSV quantitativ vermindert wurden, scheinen beide Leukozyten-Endothel-Interaktionen – nämlich „sticking“ und „rolling“ – u. a. durch ROS vermittelt zu werden. Dieselben Resultate ergaben sich bei Transplantation von Rattenlebern, in denen die Hauptquelle der ROS in der frühen Reperusionsphase durch Depletion von Kupffer-Zellen inhibiert worden war (Schauer RJ, 2001). Intra- und extrazelluläre ROS sind diesbezüglich in der Lage, über bestimmte Signaltransduktionswege den Transkriptionsfaktor NF- κ B zu aktivieren und damit zu einer Hoch-Regulation von bestimmten Adhäsionsmolekülen zu führen (Palmer HJ, 1997). Darüber hinaus scheinen ROS die Freisetzung von sog. CXC-Chemokinen zu beeinflussen (Luster AD, 1998) und damit chemotaktische Signale für Leukozyten in das durch Ischämie / Reperfusion geschädigte Areal abzugeben. Die antioxidative Therapie mit GSH unterbricht möglicherweise sowohl eine durch ROS mediierte Expression von Adhäsionsmolekülen als auch die Rekrutierung von Leukozyten über durch ROS freigesetzte Chemokine.

- Phagozytose-Aktivität von Kupffer-Zellen (KC):

Die postischämische GSH-Therapie konnte die Phagozytose-Leistung von KC weder in normalen noch in steatotischen Lebern relevant vermindern (s. Abb. 4.11.a und b). Die Phagozytose-Aktivität scheint daher auch nicht nur durch ROS vermittelt zu werden. Betrachtet man die Phagozytose-Aktivität als Parameter für die Funktion von Kupffer-Zellen, so blieb diese durch die Zufuhr von GSH während der frühen Reperfusion unbeeinflusst. Es ist daher vorstellbar, dass KC trotz GSH-Therapie Signalmoleküle und ROS während der Reperfusion sezernieren. Die antioxidative Therapie mit Glutathion könnte dann die durch KC freigesetzten ROS abfangen und so möglicherweise zu einer Reduktion von IRS in normalen und verfetteten Lebern beitragen. Bilzer et al. konnten in diesem Zusammenhang eine Reduktion von

hepatischen IRS durch Zufuhr von 2 bis 4 mmol/l GSH an der isoliert perfundierten Rattenleber feststellen (Bilzer M, 1999). Da hierbei leukozytenfreie Perfusionslösungen verwendet wurden, scheint das zugeführte GSH vor allem ROS aus aktivierten KC entgiftet und dadurch zu einer Verminderung der hepatozellulären Schädigung nach I / R geführt zu haben.

Zusammenfassend bleibt Folgendes festzuhalten: Die kontinuierliche, intravenöse Zufuhr von 100 $\mu\text{mol} / \text{h} / \text{kg}$ GSH während der Reperfusion erzielte eine vergleichbare Verbesserung sämtlicher intravitalmikroskopischer Parameter in normalen und verfetteten Lebern. Die Phagozytose-Aktivität von KC – wiederum in normalen und steatotischen Lebern – blieb durch die Anhebung der extrazellulären GSH-Konzentration jedoch unbeeinflusst. Somit konnten keine unterschiedliche, therapeutische Effektivität des Glutathions zwischen normalen und verfetteten Lebern auf mikrozirkulatorischer Ebene ermittelt werden.

5.5.4 Der Einfluss von GSH auf die intra- und extrazellulären GSH- und GSSG-Konzentrationen – Beurteilung des oxidativen Stresses

- Extrazelluläre GSH- und GSSG-Konzentrationen:

Zur Bestimmung der extrazellulären GSH- und GSSG-Konzentrationen wurde Blut aus der Arteria carotis communis entnommen. Aufgrund von Konzentrationsschwankungen des Glutathions zwischen den verschiedenen Blutgefäßen war eine standardisierte Entnahme aus dem gleichen Gefäß von entscheidender Bedeutung (Anderson ME, 1980a und b; Meister A, 1984). Eine weitere Fehlerquelle stellt die Freisetzung von GSH aus Erythrozyten in das Plasma dar. Diese besitzen eine relativ hohe GSH-Konzentration (2 – 2,5 mM) und könnten bei einer Hämolyse falsch hohe GSH-Konzentrationen im Plasma hervorrufen. Um diesem Problem zu begegnen, wurden die Blutproben unmittelbar nach Abnahme zentrifugiert, die entstandenen Aliquots abpipettiert und bei $- 80^{\circ} \text{C}$ aufbewahrt. Die Spontanoxidation des gewonnenen Plasma-GSH wurde durch den Zusatz von NEM

und der konsekutiven Konjugatbildung von GSH und NEM verhindert (Lauterburg BH, 1984a).

Die kontinuierliche Zufuhr von GSH führte während der Reperfusion zu einer wesentlich ausgeprägteren Steigerung der plasmatischen GSSG-Konzentrationen in verfetteten gegenüber normalen Lebern bei vergleichbarer Ischämie- und Reperfusiondauer (s. Abb. 4.18). Damit scheinen in steatotischen Lebern deutlich mehr ROS entgiftet worden zu sein als in nicht-vorgeschädigten, normalen Lebern. Dieses entscheidende Ergebnis unterstreicht die essentielle Bedeutung von ROS bei der Aggravation von IRS in vorgeschädigten (verfetteten) Lebern.

Die signifikante Steigerung der plasmatischen GSSG-Konzentrationen in normalen und verfetteten Lebern gegenüber den unbehandelten Kontrollgruppen kann dabei nicht durch die Spontanoxidation des intravenös verabreichten GSH erklärt werden, da diese einen langsam ablaufenden Prozess darstellt (Jaeschke H, 1991a und 1993c). Vielmehr scheinen durch die GSH-Applikation extrazellulär vorhandene ROS entgiftet worden zu sein, wozu die Leber aufgrund ihres niedrigen, extrazellulären GSH-Gehaltes von ca. 5 – 15 μM (Lauterburg BH, 1984a; Aebi S, 1991) ohne zusätzliche therapeutische GSH-Zufuhr nicht in der Lage ist (siehe Kontrollgruppen; Abb. 4.18). Darüber hinaus konnte bereits gezeigt werden, dass eine intrazelluläre Bildung von GSSG nach Ischämie / Reperfusion aufgrund des hohen antioxidativen Potentials innerhalb der Hepatozyten in nur sehr geringen Mengen erfolgt (Wefers H, 1983; Metzger J, 1988; Jaeschke H, 1988) und damit kaum zu einer wesentlichen Steigerung der extrazellulären GSSG-Formation beitragen kann. Die Anhebung der plasmatischen GSSG-Konzentrationen stellt also mit hoher Wahrscheinlichkeit einen extrazellulären Entgiftungsprozess für ROS durch das zugeführte GSH dar. Dabei dürfte es sich am ehesten um nicht-enzymatische Reaktionen des GSH mit ROS handeln, da die GSH-Peroxidase, welche Glutathion als Co-Substrat verwendet, eine nur geringe extrazelluläre Aktivität aufweist (Halliwell B, 1990).

Aktivierte KC und Leukozyten wurden als Hauptquellen für die Bildung und Freisetzung von ROS in den Extrazellulärraum während der Reperfusion identifiziert (Jaeschke H, 1991a; c und d). Die deutlich verringerte Akkumulation von adhärenenten Leukozyten in den mit GSH behandelten normalen und verfetteten Lebern macht die Oxidation des plasmatischen GSH durch ROS aus aktivierten Leukozyten

unwahrscheinlich. Vielmehr scheinen dafür ROS aus aktivierten KC verantwortlich zu sein. Dafür sprechen eine signifikant verminderte, plasmatische GSSG-Formation während der Reperfusion in KC-depletierten Lebern nach warmer und kalter Ischämie (Jaeschke H, 1991c; Schauer RJ, 1999 und 2001). Und auch in Studien an Perfusionsmodellen, in denen die Leber mit leukozytenfreier Lösung perfundiert wurde, konnte der oxidative Zellschaden durch GSH-Zufuhr drastisch reduziert werden (Bilzer M, 1999; Baron A, 1999). Das intravenös applizierte GSH scheint also während der frühen Reperfusion vor allem ROS aus aktivierten KC zu entgiften und dadurch zu einer Erhöhung der extrazellulären GSSG-Konzentrationen zu führen.

In den eigenen Versuchen bleibt jedoch unklar, ob die höheren, plasmatischen GSSG-Konzentrationen in Tieren mit steatotischen Lebern nicht durch die höheren GSH-Konzentrationen bedingt sind, die nach intravenöser GSH-Zufuhr in diesen Tieren gegenüber solchen mit normalen Lebern erreicht wurden (s. Abb. 4.17). Es konnten in diesem Zusammenhang keine Erklärungen gefunden werden, weshalb bei Verwendung einer vergleichbaren GSH-Dosis (100 $\mu\text{mol} / \text{h} / \text{kg}$) höhere plasmatische GSH-Konzentrationen in Tieren mit verfetteten Lebern gegenüber solchen mit normalen Lebern erreicht wurden.

- Intrazelluläre GSH-Konzentrationen:

Ischämie / Reperfusion führte in normalen Lebern zu einer Abnahme des intrazellulären GSH-Gehaltes (s. Abb. 4.19), welche durch die kontinuierliche, intravenöse Zufuhr von GSH während der Reperfusion verhindert werden konnte.

GSH wird jedoch in mikromolaren Konzentrationen, wie sie in den eigenen Versuchen verwendet wurden, nicht von der Leber aufgenommen (Hahn R, 1978; Ookhtens M, 1985). Auch die Verwendung von 4 mmol / l GSH führte am Modell der isoliert perfundierten Rattenleber nach I / R nur zu einer sehr geringen, intrazellulären Aufnahme des extrazellulär zugeführten GSH im Bereich von 0.08 % (Bilzer M, 1999). Die Aufrechterhaltung des intrazellulären GSH-Gehaltes durch das extrazellulär zugeführte GSH könnte daher durch die verringerte Leberzellschädigung nach I / R bewirkt worden sein und konsekutiv zu einem reduzierten Verlust an intrazellulärem GSH geführt haben. Diese Beobachtung wird

durch die Ergebnisse von Bilzer et al. unterstützt, die eine Korrelation des GSH-Effluxes aus den Hepatozyten mit dem Ausmaß der zellulären Schädigung nach I / R feststellen konnten (Bilzer M, 1999).

Dagegen führte Ischämie / Reperfusion in verfetteten Lebern zu keiner Veränderung des intrazellulären GSH-Gehaltes. Auch die postischämische GSH-Zufuhr konnte die intrazellulären GSH-Konzentrationen nicht zusätzlich beeinflussen (s. Abb. 4.20). Von ähnlichen Ergebnissen berichteten Nakano und Mitarbeiter: Auch hier kam es nach normothermer Ischämie / Reperfusion zu einer drastischen Abnahme des intrazellulären GSH-Gehaltes in Mitochondrien normaler Lebern, nicht jedoch in steatotischen Lebern (Nakano H, 1998).

Verschiedene Arbeitsgruppen berichten von einer wesentlich geringeren, intrazellulären Verfügbarkeit von GSH in verfetteten gegenüber normalen Lebern unter physiologischen Bedingungen (Nakano H, 1998; Soltys K, 2001). Dies konnte im eigenen Modell nicht bestätigt werden. Sham-Tiere mit normalen und verfetteten Lebern unterschieden sich nicht bezüglich des intrazellulären GSH-Gehaltes (s. Abb. 4.19 und 4.20). Soltys und Mitarbeiter verwendeten für ihre Versuche an steatotischen Lebern ebenfalls homozygote Zucker-Ratten (Soltys K, 2001). Das Gewicht dieser Versuchstiere betrug allerdings 480 – 560 g und übertrifft damit bei weitem die Gewichtsklasse, die im eigenen Modell der moderat verfetteten Rattenleber verwendet wurde (s. 3.1.1). Damit dürfte in den schwereren Zucker-Ratten eine wesentlich ausgeprägtere Leberzellverfettung erreicht worden sein. Es ist denkbar, dass die antioxidativen Mechanismen in den Hepatozyten, wie z. B. der intrazelluläre GSH-Gehalt, mit zunehmendem Verfettungsgrad und mit einem möglicherweise gesteigerten, chronischen, oxidativen Stress weiter vermindert werden.

Zusammenfassend bleibt Folgendes festzuhalten: Die kontinuierliche, intravenöse Zufuhr von 100 $\mu\text{mol} / \text{h} / \text{kg}$ GSH während der hepatischen Reperfusion führte sowohl in normalen als auch in moderat verfetteten Lebern der Ratte zu einer drastischen Reduktion der IRS: Das leberspezifische Enzym ALT sowie

morphologische Schäden nach I / R konnten wirksam vermindert werden. Diese protektiven Effekte des Glutathions wurden von einer signifikanten Verbesserung der hepatischen Mikrozirkulation in normalen und steatotischen Lebern begleitet. Der Gallefluss als Parameter der Leberfunktion konnte durch die extrazelluläre GSH-Zufuhr allerdings nur in normalen Lebern verbessert werden, nicht jedoch in verfetteten Lebern.

Die erhöhte plasmatische GSSG-Produktion in steatotischen Lebern deutet auf eine stärkere Detoxifikation von ROS durch das extern zugeführte GSH hin. GSH scheint damit ein geeignetes Medikament zur Prävention ROS-medierter Reperfusionsschäden in normalen und verfetteten Lebern nach normothermer Ischämie zu sein. Die geringe Bandbreite an Nebenwirkungen sowie die direkte Wirkung des GSH im extrazellulären Kompartiment, die keine intakte, intrazelluläre GSH-Synthese voraussetzt, befürworten eine klinische Anwendung des endogenen Antioxidans Glutathion in normalen und speziell in steatotischen Lebern, zumal eine Anhebung der extrazellulären GSH-Konzentrationen um das 200-fache keine toxischen Nebenwirkungen am Menschen hervorrief (Aebi S, 1991).

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Vorgeschädigte (verfettete) Lebern sind mit einer deutlich höheren Komplikationsrate nach Leberteileresektion assoziiert als normale Lebern. Die Angaben zur postoperativen Mortalität schwanken zwischen 10 und 14 % in steatotischen Lebern, während die Mortalität nach Resektion in nicht-vorgeschädigten Lebern lediglich 2 bis 4 % beträgt. Im Krankengut der Leberchirurgie konnten dabei hohe Inzidenzen verfetteter Lebern von 20 bis 26 % festgestellt werden.

Die Häufigkeit von verfetteten Lebern sowie deren erhöhte Komplikationsrate nach Leberteileresektion zeigen die Notwendigkeit von kliniknahen Experimenten mit vorgeschädigten Lebern. Ziel dieser experimentellen Arbeit war es daher, steatotische Lebern mit normalen Lebern unter den Bedingungen von Ischämie / Reperfusion zu vergleichen. Da frühe Ischämie- / Reperfusionsschäden im Wesentlichen durch das Ausmaß von hepatischen Mikrozirkulationsstörungen sowie durch die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) determiniert werden, sollte außerdem ein antioxidativer Therapieansatz mit intravenös zugeführtem Glutathion (GSH) überprüft werden.

- Modell:

Insgesamt 21 heterozygote sowie 23 homozygote Zucker-Ratten ermöglichten vergleichende Untersuchungen zwischen normalen und steatotischen Lebern: Homozygote Zucker-Ratten besitzen einen genetischen Defekt des hypothalamischen Leptinrezeptors und reagieren daher mit einem ungezügelten und übermäßigen Fressverhalten. Die Folge ist eine massive Gewichtszunahme sowie die Entwicklung einer Hyperlipidämie mit Ausbildung einer steatotischen Leber. Dabei wurden nur solche Tiere in die Versuche einbezogen, die eine Leberzellverfettung von 30 bis 60 % aufwiesen und damit als „moderat“ verfettete Lebern klassifiziert wurden. Heterozygote Zucker-Ratten dienten als Kontrolltiere mit intakten Leptinrezeptoren und nicht-vorgeschädigten, normalen Lebern.

Die beiden Hauptgruppen – Tiere mit normalen sowie solche mit verfetteten Lebern – wurden in je 3 Untergruppen aufgeteilt, so dass insgesamt 6 Versuchsgruppen

untersucht wurden: Sham-Tiere (SH) wurden einer „Scheinoperation“, jedoch keiner Ischämie / Reperfusion der Leber unterzogen und dienten somit zur Bestimmung der „base-line“-Werte. Diese Gruppe umfasste 6 Tiere mit normalen sowie 6 Tiere mit steatotischen Lebern. In den Kontrolltieren (KO) wurde eine normotherme, 60minütige Ischämie der linken und links-medianen Lebersegmente sowie eine daran anschließende Reperfusionsphase von 120 Minuten durchgeführt. Dieser Gruppe wurden 9 Tiere mit nicht-vorgeschädigten sowie 10 Tiere mit verfetteten Lebern zugeteilt. GSH-Tiere erfuhren zusätzlich eine kontinuierliche, intravenöse Zufuhr von 100 $\mu\text{mol} / \text{h} / \text{kg}$ GSH. Die Applikation des Glutathions erfolgte dabei ab 20 Minuten vor Beginn der Reperfusion bis zum Versuchsende, d. h. bis zum Ende der 120minütigen Reperfusion. Insgesamt gehörten dieser Gruppe 6 Tiere mit normalen sowie 7 Tiere mit verfetteten Lebern an. Die durchgeführten Untersuchungen umfassten die intravitale Fluoreszenzmikroskopie mit Bewertung der sinusoidalen Perfusion und der Phagozytose-Aktivität von Kupffer-Zellen sowie die Entnahme von arteriellen Blutproben für laborchemische Analysen (Lebertransaminase ALT, oxidiertes und reduziertes Glutathion). Außerdem erfolgte durch Kanülierung des Ductus choledochus die Bestimmung des Galleflusses zur Bewertung der hepatozellulären Funktion. Die Versuche wurden durch die Entnahme von Lebergewebe für licht- und elektronenmikroskopische Analysen nach einer 120minütigen Reperfusionsphase beendet.

- Ergebnisse:

Die moderate Leberzellverfettung führte zu einer drastischen Aggravation der hepatozellulären Schädigung nach Ischämie / Reperfusion: Dies belegen deutlich erhöhte Aktivitäten der Lebertransaminase ALT sowie eine fehlende Erholung der Galleflussraten als Parameter der hepatozellulären Funktion in steatotischen gegenüber normalen Lebern. Elektronenmikroskopische Untersuchungen ergaben dabei unterschiedliche, morphologische Veränderungen in verfetteten und nicht-vorgeschädigten Lebern nach Ischämie / Reperfusion: Während sich in Hepatozyten normaler Lebern vorwiegend Vakuolen ausbildeten, fanden sich in steatotischen Lebern nach vergleichbarer Ischämie- und Reperfusionszeit Schwellungen des sinusoidalen Endothels.

Die Bewertung der hepatischen Mikrozirkulation nach Ischämie / Reperfusion durch die intravitale Fluoreszenzmikroskopie zeigte keine wesentlichen Unterschiede zwischen normalen und fettinfiltrierten Lebern, so dass diese nicht für die erhöhte Vulnerabilität verfetteter Lebern verantwortlich sein können: In beiden Gruppen kam es nach Ischämie / Reperfusion zu einer vergleichbaren Beeinträchtigungen der sinusoidalen Perfusion (sinusoidale Perfusionsrate, midzonale Sinusoiddurchmesser) sowie zu einer vergleichbaren Rekrutierung von Leukozyten in den Leberlobuli und in den postsinusoidalen Venolen. Steatotische Lebern wiesen dabei im Vergleich zu normalen Lebern eine stärkere Beteiligung von permanent adhärenenten Leukozyten (Sticker) gegenüber temporär adhärenenten Leukozyten (Roller) auf. Ein deutlicher Unterschied konnte bezüglich der Phagozytose-Aktivität von Kupffer-Zellen festgestellt werden: In steatotischen Lebern wurden nach Ischämie / Reperfusion mehr Latexpartikel phagozytiert als in normalen Lebern.

Die antioxidative Therapie mit kontinuierlich, intravenös appliziertem GSH führte zu einer drastischen Reduktion von Ischämie- / Reperfusionsschäden sowohl in normalen als auch in verfetteten Lebern: Das leberspezifische Enzym ALT sowie die morphologischen Schäden nach Ischämie / Reperfusion konnten wirksam vermindert werden. Diese protektiven Effekte des Glutathions wurden von einer signifikanten Verbesserung der hepatischen Mikrozirkulation in normalen und steatotischen Lebern begleitet. Der Gallefluss als Parameter der Leberfunktion konnte durch die extrazelluläre GSH-Zufuhr allerdings nur in normalen Lebern verbessert werden, nicht jedoch in verfetteten Lebern.

Als entscheidendes Ergebnis bleibt die deutlich stärkere Detoxifikation von ROS durch das zugeführte GSH in steatotischen Lebern festzuhalten: Die plasmatische GSSG-Formation nach Ischämie / Reperfusion war in verfetteten Lebern nach intravenöser Applikation von GSH wesentlich stärker ausgeprägt als in Tieren mit nicht-vorgeschädigten Lebern. Die intrazellulären GSH-Konzentrationen unterschieden sich nicht zwischen normalen und fettinfiltrierten Lebern. Normale Lebern zeigten allerdings eine Abnahme dieses intrazellulären GSH-Gehaltes nach Ischämie / Reperfusion, während dieser in steatotischen Lebern unverändert blieb.

- Schlussfolgerung:

Vorgeschädigte (verfettete) Lebern entwickeln nach Ischämie / Reperfusion wesentlich ausgeprägtere Zellschäden als normale Lebern.

Die vorliegende, experimentelle Arbeit wies nach hepatischer Ischämie / Reperfusion einen erheblich stärkeren extrazellulären, oxidativen Stress in steatotischen Lebern nach, der bei der Aggravation von Ischämie- / Reperfusionsschäden in vorgeschädigten Lebern eine entscheidende Rolle spielen dürfte. Dies belegt die Effektivität des exogen zugeführten Glutathions bei der Reduktion der hepatozellulären Schädigung. Als Hauptquelle der ROS scheinen in der frühen Phase der Reperfusion vor allem aktivierte Kupfer-Zellen verantwortlich zu sein. Unklar bleibt jedoch, welche Pathomechanismen durch ROS in verfetteten Lebern induziert werden und zum gesteigerten Leberzellschaden führen. Es konnte durch andere Arbeitsgruppen bereits gezeigt werden, dass ROS die Adhäsion von Leukozyten während der Reperfusion medieren und als potente vasoaktive Substanzen die hepatische Mikrozirkulation nachhaltig beeinträchtigen können. Da jedoch in der vorliegenden Arbeit keine wesentlichen Unterschiede in der Mikrozirkulation normaler und steatotischer Lebern festgestellt werden konnten, scheinen ROS in verfetteten Lebern über andere pathophysiologische Mechanismen zum aggravierten Zellschaden nach Ischämie / Reperfusion zu führen. Hier dürften vor allem direkte Formen der Zellschädigung durch ROS, wie z. B. eine gesteigerte Lipidperoxidation, eine Rolle spielen.

GSH wurde hier erstmals in-vivo zur Prävention von hepatozellulären Schäden nach normothermer Ischämie / Reperfusion in vorgeschädigten (verfetteten) Lebern eingesetzt. Die nachgewiesene Effektivität sowie die nahezu idealen Eigenschaften von GSH befürworten eine Untersuchung dieses endogenen Antioxidans in klinischen Studien mit dem Ziel, hepatische Ischämie- / Reperfusionsschäden auch in vorgeschädigten Lebern effektiv zu reduzieren und damit die gesteigerte Mortalität nach Resektion zu senken.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

Adachi Y, Moore LE, Bradford BU, Gao W, Thurman RG. Antibiotics prevent liver injury in rats following long-term exposure to ethanol. *Gastroenterology* 1995; 108: 218-224.

Adam R, Reynes M, Johann M, Morino M, Astarcioglu I, Kafetzis I, Castaing D, Bismuth H. The outcome of steatotic grafts in liver transplantation. *Transplant Proc* 1991; 23: 1538-1540.

Aebi S, Assereto R, Lauterburg BH. High-dose intravenous glutathione in man: pharmacokinetics and effects on cyst(e)ine in plasma and urine. *Eur J Clin Invest* 1991; 21: 103-110.

Aebi S, Lauterburg BH. Divergent effects of intravenous GSH and cysteine on renal and hepatic GSH. *Am J Physiol* 1992; 263: R348-R352.

Akerboom TP, Sies H. Assay of glutathione, glutathione disulfide and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol* 1981; 77: 373-382.

Akerboom TP, Bilzer M, Sies H. The relationship of biliary glutathione disulfide efflux and intracellular glutathione disulfide content in perfused rat liver. *J Biol Chem* 1982; 257: 4248-4252.

Alpers DH, Sabesin SM. Fatty liver: Biochemical and clinical aspects. In: Schiff L, Schiff ER (eds.). *Diseases of the liver*. Philadelphia. Lippincott; 1987: 9498.

Anderson ME, Bridges RJ, Meister A. Direct evidence for inter-organ transport of glutathione and that the non-filtration renal mechanism for glutathione utilization involves gamma-glutamyl transpeptidase. *Biochem Biophys Res Commun* 1980a; 96: 848-853.

Anderson ME, Meister A. Dynamic state of glutathione in blood plasma. *J Biol Chem* 1980b; 255: 9530-9533.

Arvidsson D, Svennson H, Haglund U. Laser-Doppler flowmetry for estimating liver blood flow. *Am J Physiol* 1988; 254: G471-G476.

Baron A, Gerbes AL, Bilzer M. Prevention of Kupffer cell-induced injury in rat liver by glutathione. *Hepatology* 1999; 30: 226A.

Bartoli GM, Sies H. Reduced and oxidized glutathione efflux from liver. *FEBS Lett* 1978; 86: 89-91.

Behrns KE, Tsiotos GG, DeSouza NF, Krishna K, Ludwig J, Nagorney DM. Hepatic steatosis as a potential risk factor for major hepatic resection. *J Gastrointest Surg* 1998; 2: 292-298.

Belghiti J, Hiramatsu K, Benoist S, Massault P, Sauvanet A, Farges A. Seven hundred forty-seven hepatectomies in the 1990's: an update to evaluate the actual risk of liver resection. *J Am Coll Surg* 2000; 191: 38-46.

Belzer FO, Southard JH. Principles of solid-organ preservation by cold storage. *Transplantation* 1988; 45: 673-676.

Benchmark S. Liver steatosis in liver resection. *Digestion* 1969; 2: 304-311.

Bilzer M, Lauterburg BH. Effects of hypochlorous acid and chloramines on vascular resistance, cell integrity and biliary glutathione disulfide in the perfused rat liver: modulation by glutathione. *J Hepatol* 1991; 13: 84-89.

Bilzer M, Gerbes AL. Prolonged modulation of the hepatic circulation by Kupffer cell-derived reactive oxygen species. In: Cells of the hepatic sinusoid. Wisse E, Knook DL, Balabaud C (eds.). *Kupffer Cell Foundation*, Leiden 1996; 6: 200-201.

Bilzer M, Paumgartner G, Gerbes AL. Protein kinase C (PKC) and prostaglandin mediate vasoconstriction during oxidative liver injury: a novel pathomechanism of portal hypertension. *Hepatology* 1998; 28: 1142A.

Bilzer M, Paumgartner G, Gerbes AL. Glutathione protects the rat liver against reperfusion injury after hypothermic preservation. *Gastroenterology* 1999; 117: 200-210.

Bilzer M, Gerbes AL. Preservation injury of the liver: mechanisms and novel therapeutic strategies. *J Hepatol* 2000; 32: 508-515.

Bouwens L, Baekeland M, De Zanger R, Wisse E. Quantitation, tissue distribution and proliferation kinetics of Kupffer cells in normal rat liver. *Hepatology* 1986; 6: 718-722.

Bouwens L, De Bleser P, Vanderkerken K, Geerts B, Wisse E. Liver cell heterogeneity: function of non-parenchymal cells. *Enzyme* 1992, 46: 155-168.

Bowers BA, Branum GD, Rotolo FS, Watters CR, Meyers WC. Bile flow – an index of ischemic injury. *J Surg Res* 1987; 42: 565-569.

Bradham CA, Schemmer P, Stachlewitz RF, Thurman RG, Brenner DA. Activation of nuclear factor- κ B during orthotopic liver transplantation in rats is protective and does not require Kupffer cells. *Liver Trans Surg* 1999; 5: 282-293.

Brass CA, Roberts TG. Hepatic free radical production after cold storage: Kupffer cell-dependent and -independent mechanisms in rats. *Gastroenterology* 1995; 108: 1167-1175.

Brecht M, de Groot H. Veränderungen der cytosolischen Ca^{2+} -, Mg^{2+} -, H^+ -, Na^+ - und K^+ -Konzentrationen in kultivierten Hepatozyten unter hypoxischen Bedingungen. *Zentralbl Chir* 1994; 119: 341-346.

Bronk SF, Gores GJ. pH-dependent nonlysosomal proteolysis contributes to lethal anoxic injury of rat hepatocytes. *Am J Physiol* 1993; 264: G744-G751.

Burgunder JM, Lauterburg BH. Decreased production of glutathione in patients with cirrhosis. *Eur J Clin Invest* 1987; 17: 408-414.

Caldwell-Kenkel JC, Currin RT, Coote A, Thurman RG, Lemasters JJ. Reperfusion injury to endothelial cells after cold storage of rat livers: protection by mildly acidic pH and lack of protection by antioxidants. *Transpl Int* 1995; 8: 77-85.

Campfield LA, Smith FJ, Burn P. The OB protein (leptin) pathway – a link between adipose tissue mass and central neural networks. *Horm Metab Res* 1996; 28: 619-632.

Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 1979; 59: 527-605.

Cheng Y, Chen C, Lai CY, Chen T, Huang T, Lee T, Lin C, Lord R, Chen Y, Eng H, Pan TL, Lee TH, Wang YH, Iwashita Y, Kitano And S, Goto S. Assessment of donor fatty livers for liver transplantation. *Transplantation* 2001; 71: 1221-1225.

Chien KR, Abrams J, Serroni A, Martin JT, Farber JL. Accelerated phospholipid degradation and associated membrane dysfunction in irreversible, ischemic liver cell injury. *J Biol Chem* 1978; 253: 4809-4817.

Clary JJ, Groth DH, Stokinger HE. Comparative changes in serum enzyme levels in beryllium- or carbon tetrachloride-induced liver necrosis. *Proc Soc Exp Biol Med* 1973; 143: 1207-1210.

Clavien PA. Sinusoidal endothelial cell injury during hepatic preservation and reperfusion. *Hepatology* 1998; 28: 281-285.

Clemens MG, Bauer M, Pannen BH, Bauer I, Zhang JX. Remodeling of hepatic microvascular responsiveness after ischemia/reperfusion. *Shock* 1997; 8: 80-85.

Colotta F, Polentarutti N, Sironi M, Mantovani A. Expression and involvement of c-fos and c-jun protooncogenes in programmed cell death induced by growth factor deprivation in lymphoid cell lines. *J Biol Chem* 1992; 267: 18278-18283.

Costet P, Legendre C, More J, Edgar A, Galtier P, Pineau T. Peroxisome proliferation-activated receptor alpha-isoform deficiency leads to progressive dyslipidemia with sexually dimorphic obesity and steatosis. *J Biol Chem* 1998; 273: 29577-29585.

D'Alessandro A, Kalayoglu M, Sollinger H, Hoffmann RM, Reed A, Knechtle SJ, Pirsch JD, Lorentzen D, Hafez GR, Belzer FO. The predictive value of donor liver biopsies for the development of primary nonfunction after orthotopic liver transplantation. *Transplantation* 1991; 51: 157-163.

Dan C, Wake K. Modes of endocytosis of latex particles in sinusoidal endothelial and Kupffer cells of normal perfused rat liver. *Exp Cell Res* 1985; 158: 75-85.

Day CP, James OF. Hepatic steatosis: innocent bystander or guilty party? *Hepatology* 1998a; 27: 1463-1466.

Day CP, James OF. Steatohepatitis: A tale of two "hits"? *Gastroenterology* 1998b; 114: 842-845.

Decker K. Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells). *Eur J Biochem* 1990; 192: 245-261.

DeLeve LD, Kaplowitz N. Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. *Pharmac Ther* 1991; 52: 287-305.

DeLeve LD. Glutathione defense in non-parenchymal cells. *Sem Liv Dis* 1998; 18: 403-413.

Demir S, Inal-Erden M. Pentoxifylline and N-acetylcysteine in hepatic ischemia / reperfusion injury. *Clin Chim Acta* 1998; 275: 127-135.

Drugas GT, Paidas CN, Yahanda AM, Ferguson D, Clemens MG. Conjugated desferoxamine attenuates hepatic microvascular injury following ischemia / reperfusion. *Circ shock* 1991; 34: 278-283.

El-Haschimi K, Pierroz DD, Hileman SM, Bjorbaek C, Flier JS. Two defects contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet-induced obesity. *J Clin Invest* 2000; 105: 1827-1832.

Engerson TD, McKelvey TG, Rhyne DB, Boggio EB, Snyder SJ, Jones HP. Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat tissues. *J Clin Invest* 1987; 79: 1564-1570.

Fan CY, Pan J, Chu R, Lee D, Kluckman KD, Usuda N, Singh I, Yeldandi AV, Rao MS, Maeda N, Reddy JK. Hepatocellular and hepatic peroxisomal alterations in mice with a disrupted peroxisomal fatty acyl-coenzyme A oxidase gene. *J Biol Chem* 1996; 271: 24698-24710.

Fan C, Zwacka RM, Engelhardt JE. Therapeutic approaches for ischemia/reperfusion injury in the liver. *J Mol Med* 1999; 77: 577-596.

Feliciano DV, Mattox KL, Jordon GL Jr, Burch JM, Bitondo CG, Cruse PA. Management of 1000 consecutive cases of hepatic trauma (1979 – 1984). *Ann Surg* 1986; 204: 438-445.

Fernández-Checa JC, Yi JR, Ruiz CG, Ookhtens M, Kaplowitz N. Plasma membrane and mitochondrial transport of hepatic reduced glutathione. *Sem Liv Dis* 1996; 16: 147-158.

Flaherty JL, Wesfeldt ML. Reperfusion injury. *Free Radic Biol Med* 1988; 5: 409-419.

Fong Y, Cohen AM, Fortner JG, Enker WE, Turnbull AD, Coit DG, Marrero AM, Prasad M, Blumgart LH, Brennan MF. Liver resection for colorectal metastases. *J Clin Oncol* 1997; 15: 938-946.

Frederiks WM, Marx F, Kooij A. The effect of ischemia on xanthine oxidase activity in rat intestine and liver. *Int J Exp Pathol* 1993; 74: 21-26.

Frederiks WM, Bosch KS. The proportion of xanthine oxidase activity of total xanthine oxidoreductase activity in situ remains constant in rat liver under various (patho)physiological conditions. *Hepatology* 1996; 24: 1179-1184.

Frenzel H, Kremer B, Richter IE, Hucker H. The fine structure of liver sinusoids after perfusion fixation with various pressures. A transmission and scanning electron microscopy study. *Res Exp Med (Berl.)* 1976; 168: 229-241.

Fromenty B, Pessayre D. Impaired mitochondrial function in microvesicular steatosis. *J Hepatol* 1997a; 26: 43-53.

Fromenty B, Berson A, Pessayre D. Microvesicular steatosis and steatohepatitis: role of mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation. *J Hepatol* 1997b; 26: 13-22.

Fukumori T, Ohkohchi N, Tsukamoto S, Satomi S. Why is fatty liver unsuitable for transplantation? Disorientation of mitochondrial ATP synthesis and sinusoidal structure during cold preservation of a liver with steatosis. *Transpl Proc* 1997; 29: 412-415.

Fukumori T, Ohkohchi N, Tsukamoto S, Satomi S. The mechanism of injury in a steatotic liver graft during cold preservation. *Transplantation* 1999; 67: 195-200.

Gao W, Connor HD, Lemasters JJ, Mason RP, Thurman RG. Primary nonfunction of fatty livers produced by alcohol is associated with an new antioxidant-insensitive free radical species. *Transplantation* 1995; 59: 674-679.

Garcia-Ruiz C, Fernandez-Checa JC, Kaplowitz N. Bidirectional mechanism of plasma membrane transport of reduced glutathione in intact rat hepatocytes and membrane vesicles. *J Biol Chem* 1992; 267: 22256-22264.

Gasic AC, McGuire G, Krater S, Farhood AW, Goldstein MA, Smith CW, Entman ML, Taylor AA. Hydrogen peroxide pretreatment of perfused canine vessels induces ICAM-1 and CD18-dependent neutrophil adherence. *Circulation* 1991; 84: 2154-2166.

Ghoshal AK, Farber E. Choline deficiency, lipotrope deficiency and the development of liver disease including liver cancer: a new perspective. *Lab Invest* 1993; 68: 255-260.

Ghys A, Thys O, Hildebrand J, Georges A. Relation between hepatic and renal function tests and ultrastructural changes induced by 2-N-methylpiperazinomethyl-1,3-diazafluoranthren-1-oxide (AC-3579), a new experimental antileukemic drug. *Toxicol Appl Pharmacol* 1975; 31: 13-20.

Granger DN, Kubes P. The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. *J Leukoc Biol* 1994; 55: 662-675.

Hahn R, Wendel A, Flohe L. The fate of extracellular glutathione in the rat. *Biochim Biophys Acta* 1978; 539: 324-337.

Hakamada K, Sasaki M, Takahashi K, Umehara Y, Konn M. Sinusoidal flow block after warm ischemia in rats with diet-induced fatty liver. *J Surg Res* 1997; 70: 12-20.

Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys* 1986; 246: 501-514.

Halliwell B, Gutteridge MC. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys* 1990; 280: 1-8.

Hamer I, Wattiaux R, Wattiaux – De Coninck S. Deleterious effects of xanthine oxidase on rat liver endothelial cells after ischemia / reperfusion. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1269: 145-152.

Harris AG, Sinitsina I, Messmer K. Intravital fluorescence microscopy and phototoxicity: effects on leukocytes. *Eur J Med Res* 2002; 7: 117-124.

Häussinger D. The role of cellular hydration in regulation of cell function. *Biochem J* 1996; 313: 697-710.

Hayashi M, Tokunaga T, Fujita T, Tanaka K, Yamaoka Y, Ozawa K. The effects of cold preservation on steatotic graft viability in rat liver transplantation. *Transplantation* 1993; 56: 282-287.

Hilden M, Christoffersen P, Juhl E, Dalgaard JB. Liver histology in a normal population – examination of 503 consecutive fatal traffic casualties. *Scand J Gastroenterology* 1977; 12: 593-597.

Hoffmann TF, Leiderer R, Waldner H, Arbogast S, Messmer K. Ischemia reperfusion of the pancreas: a new in vivo model for acute pancreatitis in rats. *Res Exp Med (Berl.)* 1995; 195: 125-144.

Horie Y, Wolf R, Anderson DC, Granger DN. Hepatic leukostasis and hypoxic stress in adhesion molecule-deficient mice after gut ischemia-reperfusion. *J Clin Invest* 1997; 99: 781-788.

Hornboll P, Olsen TS. Fatty changes in the liver: the relation to age, overweight and diabetes mellitus. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [A]* 1982; 90: 199-205.

Hui AM, Kawasaki S, Makuuchi M, Nakayama J, Ikegami T, Miyagawa S. Liver injury following normothermic ischemia in steatotic rat liver. *Hepatology* 1994; 20: 1287-1293.

Iimuro Y, Gallucci RM, Luster MI, Kono H, Thurman RG. Antibodies to tumor necrosis factor alfa attenuate hepatic necrosis and inflammation caused by chronic exposure to ethanol in rat. *Hepatology* 1997; 26: 1530-1537.

Jaeschke H, Smith CV, Mitchell JR. Reactive oxygen species during ischemia-reflow injury in isolated perfused rat liver. *J Clin Invest* 1988; 81: 1240-1246.

Jaeschke H, Mitchell JR. Mitochondria and xanthine oxidase both generate reactive oxygen species in isolated perfused rat liver after hypoxic injury. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 160: 140-147.

Jaeschke H, Farhood A, Smith CW. Neutrophils contribute to ischemia/reperfusion injury in rat liver in vivo. *FASEB J* 1990a; 4: 3355-3359.

Jaeschke H. Glutathione disulfide as index of oxidant stress in rat liver during hypoxia. *Am J Physiol* 1990b; 258: G499-G505.

Jaeschke H, Farhood A. Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Am J Physiol* 1991a; 260: G355-G362.

Jaeschke H. Reactive oxygen and ischemia/reperfusion injury of the liver. *Chem Biol Interactions* 1991b; 79: 115-136.

Jaeschke H. Vascular oxidant stress and hepatic ischemia / reperfusion injury. *Free Radic Res Commun* 1991c; 12-13: 737-743.

Jaeschke H, Bautista AP, Spolarics Z, Spitzer JJ. Superoxide generation by Kupffer cells and priming of neutrophils during reperfusion after hepatic ischemia. *Free Radic Res Commun* 1991d; 15: 277-284.

Jaeschke H, Bautista AP, Spolarics Z, Spitzer JJ. Superoxide generation by neutrophils and Kupffer cells during in vivo reperfusion after hepatic ischemia in rats. *J Leukoc Biol* 1992; 52: 377-382.

Jaeschke H, Farhood A, Bautista AP, Spolarics Z, Spitzer JJ. Complement activates Kupffer cells and neutrophils during reperfusion after hepatic ischemia. *Am J Physiol* 1993a; 264: G801-G809.

Jaeschke H, Farhood A, Bautista AP, Spolarics Z, Spitzer JJ, Smith CW. Functional inactivation of neutrophils with a Mac-1 (CD11b/CD18) monoclonal antibody protects against ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Hepatology* 1993b; 17: 915-923.

Jaeschke H. The therapeutic potential of glutathione in hepatic ischemia-reperfusion injury. *Transplantation* 1993c; 56: 256-257.

Jaeschke H. Preservation injury: mechanisms, prevention and consequences. *J Hepatol* 1996; 25: 774-780.

Kakuma T, Lee Y, Higa M, Wang Z, Pan W, Shimomura I, Unger RH. Leptin, troglitazone and the expression of sterol regulatory element binding proteins in liver and pancreatic islets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 8536-8541.

Kamada N, Calne RY, Wight DGD, Lines JG. Orthotopic rat liver transplantation after long-term preservation by continuous perfusion with fluorocarbon emulsion. *Transplantation* 1980; 30: 43-48.

Kaplowitz N, Aw TY, Ookhtens M. The regulation of hepatic glutathione. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1985; 25: 715-744.

Keller HP, Lanz U. Objective control of replanted fingers by transcutaneous partial O₂ (pO₂) measurements. *Microsurgery* 1984; 5: 85-89.

Kobayashi H, Kurokawa T, Kitahara S, Nomani T, Harada A, Nakao A, Sugiyama S, Ozawa T, Takagi H. The effects of γ -glutamylcysteine ethyl ester, a prodrug of glutathione, on ischemia-reperfusion-induced injury in rats. *Transplantation* 1992; 54: 414-418.

Kohli V, Madden J, Bentley R, Clavien PA. Calpain mediates ischemic injury of the liver through modulation of apoptosis and necrosis. *Gastroenterology* 1999; 116: 168-178.

Komatsu H, Koo A, Guth PH. Leukocyte flow dynamics in the rat liver microcirculation. *Microvasc Res* 1990; 40: 1-13.

Kondo S, Segawa T, Tanaka K, Izawa K, Hashida M, Kanematsu T. Mannosylated superoxide dismutase inhibits hepatic reperfusion injury in rats. *J Surg Res* 1996; 60: 36-40.

Koneru B, Reddy MC, Dela Torre AN, Patel D, Ippolito T, Ferrante RJ. Studies of hepatic warm ischemia in the obese Zucker rat. *Transplantation* 1995; 59: 942-946.

Koneru B, Dikdan G. Hepatic steatosis and liver transplantation current clinical and experimental perspectives. *Transplantation* 2002; 73: 325-330.

Konishi K, Tanaka Y, Yamamoto M, Yomogida K, Watanabe K, Tsurufuji S, Fujioka M. Structure of the gene encoding rat neutrophil chemoattractant Gro. *Gene* 1993; 126: 285-286.

Koo A, Komatsu H, Tao G, Inoue M, Guth PH, Kaplowitz N. Contribution of no-reflow phenomenon to hepatic injury after ischemia-reperfusion: evidence for a role for superoxide anion. *Hepatology* 1992; 15: 507-514.

Kooij A, Schiller HJ, Schijns M, Van Noorden CJ, Frederiks WM. Conversion of xanthine dehydrogenase into xanthine oxidase in rat liver and plasma at the onset of reperfusion after ischemia. *Hepatology* 1994; 19: 1488-1495.

Korsrud GO, Grice HC, McLaughlan JM. Sensitivity of several serum enzymes in detecting carbon tetrachloride-induced liver damage in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1972; 22: 474-483.

Korsrud GO, Grice HG, Goodman TK, Knipfel JE, McLaughlan JM. Sensitivity of several serum enzymes for the detection of thioacetamide-, dimethylnitrosamine- and diethanolamine-induced liver damage in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1973a; 26: 299-313.

Korsrud GO, Trick KD. Activities of several enzymes in serum and heparinized plasma from rats. *Clin Chim Acta* 1973b; 48: 311-315.

Koteish A, Mae Diehl A. Animal models of steatosis. *Sem Liv Dis* 2001; 21: 89-104.

Kuhnle GE, Kuebler WM, Groh J, Goetz AE. Effect of blood flow on the leukocyte-endothelium interaction in pulmonary microvessels. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152: 1221-1228.

Lakshminarayanan V, Drab-Weiss EA, Roebuck KA. H₂O₂ and tumor necrosis factor- α induce differential binding of the redox-responsive transcription factors AP-1 and NF- κ B to the interleukin-8 promoter in endothelial and epithelial cells. *J Biol Chem* 1998; 273: 32670-32678.

Land W, Schneeberger H, Schleibner S, Illner D, Abendroth D, Rutili G, Arfors E, Messmer K. The beneficial effect of human recombinant superoxide dismutase on acute and chronic rejection events in recipients of cadaveric renal transplants. *Transplantation* 1994; 57: 211-217.

Larrabee WF Jr, Sutton GD, Holloway A Jr, Tolentino G. Laser Doppler velocimetry and fluorescein dye in the prediction of skin flap viability. *Arch Otolaryngol* 1983; 109: 454-456.

Lauterburg BH, Adams JD, Mitchell JR. Hepatic glutathione homeostasis in the rat: efflux accounts for glutathione turnover. *Hepatology* 1984a; 4: 586-590.

Lauterburg BH, Smith CV, Hughes H, Mitchell JR. Biliary excretion of glutathione and glutathione disulfide in the rat. Regulation and response to oxidative stress. *J Clin Invest* 1984b; 73: 124-133.

Le Moine O, Luis H, Stordeur P, Collet JM, Goldman M, Deviere J. Role of reactive oxygen intermediates in interleukin-10 release after cold liver ischemia and reperfusion in mice. *Gastroenterology* 1997; 113: 1701-1706.

Leclercq IA, Farrell GC, Field J, Bell DR, Gonzalez F, Robertson GR. CYP2E1 and CYP4A as microsomal catalysts of lipid peroxides in murine nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Invest* 2000; 105: 1067-1075.

Lee D, Clark DG. Influence of ischemic time on the production of bile by perfused rat liver. *Cryobiology* 1977; 14: 37-44.

Lehr HA, Vollmar B, Vajcoczy P, Menger MD. Intravital fluorescence microscopy for the study of leukocyte interaction with platelets and endothelial cells. *Methods Enzymol* 1999; 300: 462-481.

Lentsch A, Kato A, Yoshidome H, McMasters K, Edwards M. Inflammatory mechanisms and therapeutic strategies for warm hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepatology* 2000; 32: 169-173.

Leonard AG, Brennen MD, Colville J. The use of continuous temperature monitoring in the postoperative management of microvascular cases. *Br J Plast Surg* 1982; 35: 337-342.

Leone TC, Weinheimer CJ, Kelly DP. A critical role for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in the cellular fasting response: the PPAR alpha-null mouse as a model of fatty acid oxidation disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 7473-7478.

Letteron P, Brahimi-Bourouina N, Robin MA, Moreau A, Feldmann G, Pessayre D. Glucocorticoids inhibit mitochondrial matrix acyl-CoA dehydrogenases and fatty acid beta oxidation. *Am J Physiol* 1997; 35: G1141-G1150.

Lewis MS, Whatley RE, Cain P, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmermann GA. Hydrogen peroxide stimulates the synthesis of platelet-activating factor by endothelium and induces endothelial cell-dependent neutrophil adhesion. *J Clin Invest* 1988; 82: 2045-2055.

Lieber CS, DeCarli LM, Sorrell MF. Experimental methods of ethanol administration. *Hepatology* 1989; 10: 501-510.

Lieber CS. Biochemical factors in alcoholic liver disease. *Sem Liv Dis* 1993; 13: 136-147.

Littauer A, de Groot H. Release of reactive oxygen by hepatocytes on reoxygenation: three phases and role of mitochondria. *Am J Physiol* 1992; 262: G1015-G1020.

Liu P, Fisher MA, Farhood A, Smith CY, Jaeschke H. Beneficial effects of extracellular glutathione against endotoxin-induced liver injury during ischemia and reperfusion. *Circ Shock* 1994; 43: 64-70.

Loria RM, Kibrick S, Madge GE. Infection of hypercholesterolemic mice with Coxsackie virus B. *J Infect Dis* 1976; 133: 655-662.

Luster AD. Chemokines – chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 1998; 338: 436-445.

Markin RS, Wisecarver JL, Radio SJ, Stratta RJ, Langnas AN, Hirst K, Shaw BW Jr. Frozen section evaluation of donor livers before transplantation. *Transplantation* 1993; 56: 1403-1409.

Martinez-Mier G, Toledo-Pereyra L, Ward P. Adhesion molecules in liver ischemia and reperfusion. *J Surg Res* 2000; 94: 185-194.

Marzi I, Knee J, Bühren V, Menger MD, Trentz O. Reduction by superoxide dismutase of leukocyte-endothelial adherence after liver transplantation. *Surgery* 1992; 111: 90-97.

Marzi I, Walcher F, Bühren V. Macrophage activation and leukocyte adhesion after liver transplantation. *Am J Physiol* 1993; 265: G172-G177.

Massberg S, Eisenmenger S, Enders G, Krombach F, Messmer K. Quantitative analysis of small intestinal microcirculation in the mouse. *Res Exp Med (Berl.)* 1998; 198: 23-35.

Mathews WR, Guido DM, Fischer MA, Jaeschke H. Lipid peroxidation as molecular mechanism of liver injury during reperfusion after ischemia. *Free Radic Biol Med* 1994; 16: 763-770.

Mavier P, Preaux AM, Guigui B, Lescs MC, Zafrani ES, Dhumeaux D. In vitro toxicity of polymorphonuclear neutrophils to rat hepatocytes: evidence for a proteinase-mediated mechanism. *Hepatology* 1988; 8: 254-258.

May JW Jr, Lukash FN, Gallico GG 3rd, Stirrat CR. Removable thermocouple probe microvascular patency monitor: An experimental and clinical study. *Plast Reconstr Surg* 1983; 72: 366-379.

McCuskey RS, McCuskey PA, Urbaschek R, Urbaschek B. Kupffer cell function in host defense. *Rev Infect Dis* 1987; 9: 616-619.

Meister A. New aspects of glutathione biochemistry and transport: selective alteration of glutathione metabolism. *Fed Proc* 1984; 43: 3031-3042.

Menger MD, Sack FU, Barker JH, Feifel G, Messmer K. Quantitative analysis of microcirculatory disorders after prolonged ischemia in skeletal muscle: therapeutic effects of prophylactic isovolemic hemodilution. *Res Exp Med* 1988; 188: 151-165.

Menger MD, Marzi I, Messmer K. In vivo fluorescence microscopy for quantitative analysis of the hepatic microcirculation in hamsters and rats. *Eur Surg Res* 1991; 23: 158-169.

Menger MD, Pelikan S, Steiner D, Messmer K. Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of „reflow paradox“. *Am J Physiol* 1992; 263: H1901-H1906.

Menger MD, Lehr HA. Scope and perspectives of intravital microscopy – bridge over from in vitro to in vivo. *Immunol Today* 1993a; 14: 519-522.

Menger MD, Vollmar B, Glasz J, Post S, Messmer K. Microcirculatory manifestations of hepatic ischemia / reperfusion injury. *Prog Appl Microcirc* 1993b; 19: 106-124.

Menger MD, Vollmar B. In vivo analysis of microvascular reperfusion injury in striated muscle and skin. *Microsurgery* 1994; 15: 383-389.

Menger MD, Richter S, Yamauchi J, Vollmar B. Role of microcirculation in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepatogastroenterology* 1999; 46: 1452-1457.

Messina LM. In vivo assessment of acute microvascular injury after reperfusion of ischemic tibialis anterior muscle of the hamster. *J Surg Res* 1990; 48: 615-621.

Metzger J, Dore SP, Lauterburg BH. Oxidant stress during reperfusion of ischemic liver: No evidence for a role of xanthine oxidase. *Hepatology* 1988; 8: 580-584.

Miki C, Iriyama K, Mirza DF, Mayer AD, Buckels JA, Suzuki H, McMaster P. Postperfusion energy metabolism of steatotic graft and its relation to early graft viability following liver transplantation. *Dig Dis Sci* 1998; 43: 74-79.

Milner JA, Hassan AS. Species specificity of arginine deficiency-induced hepatic steatosis. *J Nutr* 1981; 111: 1067-1073.

Miura K, Ishii T, Sugita Y, Bannai S. Cystine uptake and glutathione level in endothelial cells exposed to oxidative stress. *Am J Physiol* 1992; 262: C50-C58.

Miyata T, Todo S, Ueda Y. Endogenous endotoxemia during orthotopic liver transplantation in dogs. *Transpl Proc* 1989; 21: 3861-3862.

Miyoshi H, Umeshita K, Sakon M, Imajoh-Omi S, Fujitani K, Gotoh M, Oiki E, Kambayashi J, Monden M. Calpain activation in plasma membrane bleb formation during tert-butyl hydroperoxide-induced rat hepatocyte injury. *Gastroenterology* 1996; 110: 1897-1904.

Moitra J, Mason MM, Olive M, Krylov D, Gavrilova O, Marcus-Samuels B, Feigenbaum L, Lee E, Aoyama T, Eckhaus M, Reitman ML, Vinson C. Life without white fat: a transgenic mouse. *Genes Dev* 1998; 12: 3168- 3181.

Murphy PA, Krahling JB, Gee R, Kirk JR, Tolbert NE. Enzyme activities of isolated hepatic peroxisomes from genetically lean and obese male mice. *Arch Biochem Biophys* 1979; 193: 179-185.

Nagel E, Meyer zu Vilsendorf A, Bartels M, Pichlmayr R. Antioxidative vitamins in prevention of ischemia / reperfusion injury. *Int J Vitam Nutr Res* 1997; 67: 298-306.

Nakamura S, Nishiyama R, Serizawa A, Yokoi Y, Suzuki S, Konno H, Baba S, Muro H. Hepatic release of endothelin-1 after warm ischemia. *Transplantation* 1995; 59: 679-684.

Nakano H, Nagasaki H, Barama A, Boudjema K, Jaeck D, Kumada K, Tatsuno M, Baek Y, Kitamura N, Suzuki T, Yamaguchi M. The effects of n-acetylcysteine and anti-intercellular adhesion molecule-1 monoclonal antibody against ischemia-reperfusion injury of the rat steatotic liver produced by a choline-methionine-deficient diet. *Hepatology* 1997; 26: 670-678.

Nakano H, Yamaguchi M, Kaneshiro Y, Yoshida K, Kigawa G, Nagasaki H, Fujiwara Y, Matsumoto F, Kitamura N, Sasaki J, Kuzume M, Takeuchi S, Kumada K. S-Adenosyl-L-Methionine attenuates ischemia-reperfusion injury of steatotic livers. *Transpl Proc* 1998; 30: 3735-3736.

Nanji AA, Khettry U, Sadrzadeh SM. Lactobacillus feeding reduces endotoxemia and severity of experimental alcoholic liver disease. *Proc Soc Exp Biol Med* 1994; 205: 243-247.

Nardo B, Caraceni P, Pasini P, Domenicali M, . Increased generation of reactive oxygen species in isolated rat fatty liver during postischemic reoxygenation. *Transplantation* 2001; 71: 1816-1820.

Nemoto Y, Toda K, Ono M, Fujikawa-Adachi K, Saibara T, Onishi S, Enzan H, Okada T, Shizuta Y. Altered expression of fatty acid-metabolizing enzymes in aromatase-deficient mice. *J Clin Invest* 2000; 105: 1819-1825.

Nolte D, Menger MD, Messmer K. Microcirculatory models of ischemia – reperfusion in skin and striated muscle. *Int J Microcirc Clin Exp* 1995; 15, Suppl 1: 9-16.

Ohhara K. Study of microcirculatory changes in experimental dietary fatty liver. *J Med Hokkaido* 1989; 64: 177-185.

Ohtsuka T, Kubota A, Hirano T, Watanabe K, Yoshida H, Tsurufuji M, Iizuka Y, Konishi K, Tsurufuji S. Glucocorticoid-mediated gene suppression of rat cytokine-induced neutrophil chemoattractant CINC/gro, a member of the interleukin-8 family, through impairment of NF- κ B activation. *J Biol Chem* 1996; 271: 1651-1659.

Oien KA, Moffat D, Curry GW, Dickson J, Habeshaw T, Mills PR, MacSween RN. Cirrhosis with steatohepatitis after adjuvant tamoxifen. *Lancet* 1999; 353: 36-37.

Okuda M, Kee HC, Kumar C, Chance B. Oxygen radical generation during ischemia-reperfusion in the isolated perfused rat liver monitored by enhanced chemiluminescence. *Circ Shock* 1992; 38: 228-237.

Olsson GM, Brunmark A, Brunk UT. AO-mediated photodamage of microsomal and lysosomal fractions. *Virchows Arch* 1989; 56: 247-257.

Ookhtens M, Hobdy K, Corvasce MC, Aw Ty, Kaplowitz N. Sinusoidal efflux of glutathione in the perfused rat liver. Evidence for a carrier-mediated process. *J Clin Invest* 1985; 75: 258-265.

Osmundsen H, Bremer J, Pedersen JI. Metabolic aspects of peroxisomal β -oxidation. *Biochem Biophys Acta* 1991; 1085: 141-158.

Palmer HJ, Paulson KE. Reactive oxygen species and antioxidants in signal transduction and gene expression. *Nutr Rev* 1997; 55: 353-361.

Pardini RS. Toxicity of oxygen from naturally occurring redox-active pro-oxidants. *Arch Insect Biochem Physiol* 1995; 29: 101-118.

Patel KD, Zimmermann GA, Prescott SM, McEver RP, McIntyre TM. Oxygen radicals induce human endothelial cells to express GMP-140 and bind neutrophils. *J Cell Biol* 1991; 112: 749-759.

Pelleymounter MA, Cullen MF, Baker MB, Hecht R, Winter D, Boone T, Collins F. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* 1995; 269: 540-543.

Peralta C, Prats N, Xaus C, Gelfi E, Rosello-Catafau J. Protective effect of liver ischemic preconditioning on liver and lung injury induced by hepatic ischemia-reperfusion in the rat. *Hepatology* 1999; 30: 1481-1489.

Phillips MS, Liu Q, Hammond HA, Dugan V, Hey PJ, Caskey CJ, Hess JF. Leptin receptor missense mutation in the fatty Zucker rat. *Nat Genet* 1996; 13: 18-19.

Post S, Gonzalez AP, Palma P, Rentsch M, Stiehl A, Menger MD. Assessment of hepatic phagocytic activity by in vivo microscopy after liver transplantation in the rat. *Hepatology* 1992; 16: 803-809.

Post S, Palma P, Rentsch M, Gonzalez AP, Menger MD. Differential impact of Carolina rinse and University of Wisconsin solutions on microcirculation, leucocyte adhesion, Kupffer cell activity and biliary excretion after liver transplantation. *Hepatology* 1993; 18: 1490-1497.

Poulsom R. Morphological changes of organs after sucrose or fructose feeding. *Prog Biochem Pharmacol* 1986; 21: 104-134.

Povlishock JT, Rosenblum WI, Sholley MM, Wei EP. An ultrastructural analysis of endothelial change paralleling platelet aggregation in a light/dye model of microvascular insult. *Am J Pathol* 1983; 110: 148-160.

Praaning – Van Daalen DP, Knook DL. Quantitative determination of in vivo endocytosis by rat liver Kupffer and endothelial cells facilitated by an improved cell isolation method. *FEBS Lett* 1982; 141: 229-232.

Pratt DS, Knox TA, Erban J. Tamoxifen-induced steatohepatitis. *Ann Intern Med* 1995; 123: 236-239.

Pringle J. Notes on the arrest of hepatic hemorrhage due to trauma. *Ann Surg* 1908; 48: 541-544.

Rashid A, Wu TC, Huang CC, Chen CH, Lin HZ, Yang SQ, Lee FY, Diehl AM. Mitochondrial proteins that regulate apoptosis and necrosis are induced in mouse fatty liver. *Hepatology* 1999; 29: 1131-1138.

Reddy JK, Goel SK, Nemali MR, Carrino JJ, Laffler TG, Reddy MK, Sperbeck SJ, Osumi T, Hashimoto T, Lalwani ND, et al. Transcriptional regulation of peroxisomal fatty acyl-CoA oxidase and enoyl-CoA hydratase/3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase in rat liver by peroxisomal proliferators. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83: 1747-1751.

Reddy MC, Koneru B, Soni S, Patel D. ³¹P nuclear magnetic resonance study of phospholipids in ischemia/reperfusion injury in a rat fatty liver model. *Transplantation* 1996; 61: 1151-1155.

Rogers AE, Newberne PM. Animal model: fatty liver and cirrhosis in lipotrope-deficient male rats. *Am J Pathol* 1973; 73: 817-820.

Saetzler RK, Jallo J, Lehr HA, Philips CM, Vasthare U, Arfors KE, Tuma RF. Intravital fluorescence microscopy: Impact of light-induced phototoxicity on adhesion of fluorescently labeled leukocytes. *J Histochem Cytochem* 1997; 45: 505-513.

Sato N, Eguchi H, Inoue A, Matsumura T, Kawano S, Kamada T. Hepatic microcirculation in Zucker fatty rats. *Adv Exp Med Biol* 1986; 200: 477-483.

Saugstad OD. Hypoxanthine as an indicator of hypoxia: its role in health and disease through free radical production. *Pediatr Res* 1988; 23: 143-150.

Schauer RJ, Bilzer M, Kalmuk S, Gerbes AL, Schildberg FW, Messmer K. Oxidized plasma glutathione: An indicator of microcirculatory failure after hypothermic liver preservation? *Transplantation* 1999; 67: 587A.

Schauer RJ, Vonier D, Gerbes AL, Schildberg FW, Messmer K, Bilzer M. Glutathione protects the rat liver against reperfusion injury after prolonged warm ischemia. *Hepatology* 2000a; 32: 498.

Schauer RJ, Bilzer M, Merz R, Pflederer T, Vonier D, Kalmuk S, Gerbes AL, Schildberg FW, Messmer K. Funktionell bedeutsame Reperfusionsschäden in nicht-ischämischen Lebersegmenten nach selektivem Pringle Manöver. *Z Gastroenterology* 2000b; 39: 485.

Schauer RJ, Bilzer M, Kalmuk S, Gerbes AL, Leiderer R, Schildberg FW, Messmer K. Microcirculatory failure after rat liver transplantation is related to Kupffer cell – derived oxidant stress but not involved in early graft dysfunction. *Transplantation* 2001; 72: 1692-1699.

Schemmer P, Schoonhoven R, Swenberg JA, Bunzendahl H, Thurman RG. Gentle in situ liver manipulation during organ harvest decreases survival after rat liver transplantation: role of Kupffer cells. *Transplantation* 1998; 65: 1015-1020.

Schlossberg H, Zhang Y, Dudus L, Engelhardt JF. Expression of c-fos and c-jun during hepatocellular remodeling following ischemia/reperfusion in mouse liver. *Hepatology* 1996; 23: 1546-1555.

Seifalian AM, Piasecki C, Agarwal A, Davidson BR. The effect of graded steatosis on flow in the hepatic parenchymal microcirculation. *Transplantation* 1999; 68: 780-784.

Selzner M, Clavien PA. Resection of liver tumors: special emphasis on neoadjuvant and adjuvant therapy. In: Clavien PA (ed.). Malignant liver tumors – current and emerging therapies. Malden: *Blackwell Science*, 1999: 137-149.

Selzner M, Rüdiger HA, Sindram D, Madden J, Clavien PA. Mechanisms of ischemic injury are different in the steatotic and normal rat liver. *Hepatology* 2000a; 32: 1280-1288.

Selzner M, Clavien PA. Failure of regeneration of the steatotic liver: disruption at two different levels in the regeneration pathway. *Hepatology* 2000b; 31: 35-42.

Selzner M, Clavien PA. Fatty liver in liver transplantation and surgery. *Sem Liv Dis* 2001; 21: 105-113.

Shimano H, Horton JD, Hammer RE, Shimomura I, Brown MS, Goldstein JS. Overproduction of cholesterol and fatty acids cause massive liver enlargement in transgenic mice expressing truncated SREBP-1a. *J Clin Invest* 1996; 98: 1575-1584.

Shimomura I, Hammer RE, Richardson JA, Ikemoto S, Bashmakov Y, Goldstein JL, Brown MS. Insulin resistance and diabetes mellitus in transgenic mice expressing nuclear SREBP-1c in adipose tissue: model for congenital generalized lipodystrophy. *Genes Dev* 1998; 12: 3182-3194.

Siegers CP, Younes M. Clinical significance of the glutathione-conjugating system. *Pharmacol Res Commun* 1983; 15: 1-13.

Singh I. Mammalian peroxisomes: metabolism of oxygen and reactive oxygen species. *Ann N Y Acad Sci* 1996; 804: 612-627.

Singh AK, Gulati S. Effect of ischemia-reperfusion injury on the morphology of peroxisomes. *Mol Cell Biochem* 1995; 144: 19-26.

Skulachev VP. Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1363: 100-124.

Slater TF, Delaney VB. Liver adenosine triphosphate content and bile flow rate in the rat. *Biochem J* 1970; 116: 303-308.

Soltys K, Dikdan G, Koneru B. Oxidative stress in fatty livers of obese Zucker rats: rapid amelioration and improved tolerance to warm ischemia with tocopherol. *Hepatology* 2001; 34: 13-18.

Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994; 76: 301-314.

Srivastava SK, Beutler E. Accurate measurement of oxidized glutathione content of human, rabbit and rat red blood cells and tissues. *Anal Biochem* 1968; 25: 70-76.

Srivastava SK. Metabolism of red cell glutathione. *Exp Eye Res* 1971; 11: 294-305.

Steinbauer M, Harris AG, Abels C, Messmer K. Characterization and prevention of phototoxic effects in intravital fluorescence microscopy in the hamster dorsal skinfold model. *Langenbecks Arch Surg* 2000; 385: 290-298.

Steinhoff G, Behrend M, Schrader B, Duijvestijn AM, Wonigeit K. Expression patterns of leukocyte adhesion ligand molecules on human liver endothelia. Lack of ELAM-1 and CD62 inducibility on sinusoidal endothelia and distinct distribution of VCAM-1, ICAM-1, ICAM-2 and LFA-3. *Am J Pathol* 1993; 142: 481-488.

Stirpe F, Della Corte E. The regulation of rat liver xanthine oxidase. Conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O). *J Biol Chem* 1969; 244: 3855-3863.

Sugiura M, Inagami T, Kon V. Endotoxin stimulates endothelin release in vivo and in vitro as determined by radioimmunoassay. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 161: 1220-1227.

Sumida Y, Nakashima T, Yoh T, Furutani M, Hirohama A, Kakisaka Y, et al. Serum thioredoxin levels as a predictor of steatohepatitis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2003; 38: 32-38.

Sumimoto K, Inagaki K, Yamada K, Kawasaki T, Dohi K. Reliable indices for the determination of viability of grafted liver immediately after orthotopic transplantation. *Transplantation* 1988; 46: 506-509.

Sun CK, Zhang XY, Zimmermann A, Davis G, Wheatley AM. Effect of ischemia-reperfusion injury on the microcirculation of the steatotic liver of the Zucker rat. *Transplantation* 2001; 72: 1625-1631.

Suzuki H, Robinson MK, Rounds JD, Gatzen C, Wilmore DW. Glutathione deficiency accentuates hepatocellular fluid accumulation after ischemia-reperfusion. *J Surg Res* 1994; 57: 632-639.

Taneja C, Prescott L, Koneru B. Critical preservation injury in rat fatty liver is to hepatocytes, not sinusoidal lining cells. *Transplantation* 1998; 65: 167-172.

Teramoto K, Bowers JL, Kruskal JB, Clouse ME. Hepatic microcirculatory changes after reperfusion in fatty and normal liver transplantation in the rat. *Transplantation* 1993a; 56: 1076-1082.

Teramoto K, Bowers JL, Khettry U, Palombo JD, Clouse ME. A rat fatty liver transplant model. *Transplantation* 1993b; 55: 737-741.

Tietze F. Enzymatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione. *Ann Biochem* 1969; 27: 502-522.

Todo S, Demetris A, Teperman L, Podesta L, Shaver T, Tzakis A, Starzl TE. Primary nonfunction of hepatic allografts with preexisting fatty infiltration. *Transplantation* 1989; 47: 903-905.

Tsuchiya T, Abe T, Saito T, Miyazawa M, Kanno H, Ishii S, Suzuki M, Inoue H, Motoki R. Induction of immediate early genes and apoptosis after ischemia/reperfusion in fatty liver rats. *Transpl Proc* 1998; 30: 2919-2922.

Tsuchiya T, Miyazawa M, Abe T, Saito T, Kanno H, Ishii S, Suzuki M, Kenjo A, Yamada F, Gunji T, Kimura T, Gotoh M. Hepatic regeneration and ischemia/reperfusion injury in fatty-liver rats. *Transpl Proc* 2000; 32: 2324.

Tucker H, Eckstein H. The effect of supplementary methionine and cystine on the production of fatty livers by diet. *J Biol Chem* 1937; 121: 479.

Uhlmann S, Uhlmann D, Spiegel HU. Evaluation of hepatic microcirculation by in vivo microscopy. *J Invest Surg* 1999 ; 12: 179-193.

Underwood G. Prevalence of fatty liver in healthy male adults accidentally killed. *Aviat Space Environ Med* 1984; 55: 59-63.

Urena MA, Moreno Gonzalez E, Romero CJ, Ruiz-Delgado FC, Moreno Sanz C. An approach to the rational use of steatotic donor livers in liver transplantation. *Hepato gastroenterology* 1999; 46: 1164-1173.

Van Steenberg W, Lanckmans S. Liver disturbances in obesity and diabetes mellitus. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1995; 19: S27-S36.

Vollmar B, Lang G, Post S, Menger MD, Messmer K. Microcirculation of the liver in hemorrhagic shock in the rat and its significance for energy metabolism and function. *Zentralbl Chir* 1993; 118: 218-225.

Vollmar B, Glasz J, Leiderer R, Post S, Menger MD. Hepatic microcirculatory perfusion failure is a determinant for liver dysfunction in warm ischemia-reperfusion. *Am J Pathol* 1994a; 145: 1421-1431.

Vollmar B, Glasz J, Post S, Menger MD. Depressed phagocytic activity of Kupffer cells after warm ischemia-reperfusion of the liver. *J Hepatol* 1994b; 20: 301-304.

Vollmar B, Menger MD, Glasz J, Leiderer R, Messmer K. Impact of leukocyte-endothelial cell interaction in hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol* 1994c; 267: G786-G793.

Vollmar B, Glasz J, Menger MD, Messmer K. Leukocytes contribute to hepatic ischemia/reperfusion injury via intercellular adhesion molecule-1-mediated venular adherence. *Surgery* 1995; 117: 195-200.

Vollmar B, Richter S, Menger MD. Leucocyte stasis in hepatic sinusoids. *Am J Physiol* 1996; 270: G798-G803.

Wada K, Fujimoto K, Fujikawa Y, Shibayama Y, Mitsui H, Nakata K. Sinusoidal stenosis as the cause of portal hypertension in choline deficient diet induced fatty cirrhosis of the rat liver. *Acta Path Jap* 1974; 24: 207-217.

Wang CY, Mathews WR, Guido DM, Farhood A, Jaeschke H. Inhibition of nitric oxide synthesis aggravates reperfusion injury after hepatic ischemia and endotoxemia. *Shock* 1995; 4: 282-288.

Wanner GA, Ertel W, Müller P, Hofer Y, Leiderer R, Menger MD, Messmer K. Liver ischemia and reperfusion induces a systemic inflammatory response through Kupffer cell activation. *Shock* 1996; 5: 34-40.

Webster MH, Patterson J. The photo-electric plethysmograph as a monitor of microvascular anastomoses. *Br J Plast Surg* 1976; 29: 182-185.

Wefers H, Sies H. Oxidation of glutathione by the superoxide radical to the disulfide and the sulfonate yielding singlet oxygen. *Eur J Biochem* 1983; 137: 29-36.

Wendel A, Jaeschke H. Drug-induced lipid peroxidation in mice: Glutathione content of liver, kidney and spleen after intravenous administration of free and liposomally entrapped glutathione. *Biochem Pharmacol* 1982; 31: 3607-3611.

Westwick JK, Weitzel C, Leffert HL, Brenner DA. Activation of Jun kinase is an early event in hepatic regeneration. *J Clin Invest* 1995; 95: 803-810.

White B, Martin R. Evidence for central mechanism of obesity in the Zucker rat: role of neuropeptide Y and leptin. *Proc Soc Exp Biol Med* 1997; 217: 222-232.

Winterbourn CC, Metodiewa D. The reaction of superoxide with reduced glutathione. *Arch Biochem Biophys* 1994; 314: 284-290.

Yabe H, Koyama Y, Nishikawa M, Takakura Y, Hashida M. Hepatocyte-specific distribution of catalase and its inhibitory effect on hepatic ischemia / reperfusion injury in mice. *Free Radic Res* 1999; 30: 265-274.

Yamada S, Iida T, Tabata T, Nomoto M, Kishikawa H, Kohno K, Eto S. Alcoholic fatty liver differentially induces a neutrophil-chemokine and hepatic necrosis after ischemia-reperfusion in rat. *Hepatology* 2000; 32: 278-288.

Yang SQ, Lin HZ, Lane HD, Clemens M, Diehl AM. Obesity increases sensitivity to endotoxin liver injury: implications for pathogenesis of steatohepatitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 2557-2562.

Yao ZM, Vance D. The active synthesis of phosphatidylcholine is required for very low density lipoprotein secretion from rat hepatocytes. *J Biol Chem* 1988; 263: 2998-3004.

Yao ZM, Vance D. Head group specificity in the requirement of phosphatidylcholine biosynthesis for very low density lipoprotein secretion from cultured hepatocytes. *J Biol Chem* 1989; 264: 11373-11380.

Yokoyama I, Todo S, Miyata T. Endotoxemia and human liver transplantation. *Transpl Proc* 1989; 21: 3833-3841.

Yokoyama I, Beckman JS, Beckman TK, Wheat JK, Cash TG, Freeman BA, Parks DA. Circulating xanthine oxidase: potential mediator of ischemic injury. *Am J Physiol* 1990; 258: G564-G570.

Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 1994; 74: 139-162.

Zdolsek JM, Olsson GM, Brunk UT. Photooxidative damage to lysosomes of cultured macrophages by acridine orange. *Photochem Photobiol* 1990; 51: 67-76.

Zdolsek JM. AO-mediated photodamage to cultured cells. *APMIS* 1993; 101: 127-132.

Zeintl H, Tompkins WR, Messmer K, Intaglietta M. Static and dynamic microcirculatory video image analysis applied to clinical investigations. *Prog Appl Microcirc* 1986; 11: 10.

Zhang JX, Bauer M, Clemens MG. Vessel and target cell-specific actions of endothelin-1 and endothelin-3 in the rat liver. *Am J Physiol* 1995; 269: G269-G277.

Zhou W, McCollum MO, Levine BA, Olson MS. Inflammation and platelet-activating factor production during ischemia/reperfusion. *Hepatology* 1992; 16: 1236-1240.

Zhou YT, Shimabukuro M, Koyama K, Lee Y, Wang MY, Trieu F, Newgard CB, Unger RH. Induction by leptin of uncoupling protein-2 and enzymes of fatty acid oxidation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 6386-6390.

Zhou YT, Want ZW, Higa M, Newgard CB, Unger RH. Reversing adipocyte differentiation: implications for treatment of obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 2391-2395.

Zwacka RM, Zhang Y, Zhou W, Halldorson J, Engelhardt JE. Ischemia/reperfusion injury in the liver of BALB/c mice activates AP-1 and nuclear factor κ B independently of I κ B degradation. *Hepatology* 1998; 28: 1022-1030.

VIII. ABKÜRZUNGEN

ALT	Alanin-Aminotransferase
AP-1	Aktivator Protein 1
AST	Aspartat-Aminotransferase
ATP	Adenosintriphosphat
CINC	Cytokine-induced-neutrophil-chemoattractant 1
CMDD	Choline- and methionine-deficient diet
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTNB	5,5-Dithio-bis-nitrobenzoesäure
GP	Glutathion-Peroxidase
GR	Glutathion-Reduktase
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathiondisulfid
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HO·	Hydroxylradikal
HOCl	Hypochlorige Säure
HR	Herzfrequenz
IκB	Inhibitorisches κB
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1
IL	Interleukin
I / R	Ischämie / Reperfusion
IRS	Ischämie- / Reperfusionsschaden
IVM	Intravitale Fluoreszenzmikroskopie
KC	Kupffer-Zelle
KG	Körpergewicht
KO	Kontrollgruppe
LDH	Laktatdehydrogenase
LL	Linker Leberlappen
LPS	Lipopolysaccharid
LR	Rechte Lebersegmente

LT	Leukotrien
Ltx	Lebertransplantation
MAP	Arterieller Mitteldruck
MDA	Malondialdehyd
MinR	Minuten nach Beginn Reperfusion
MPO	Myeloperoxidase
MW	Mittelwert
MZ	Midzonal
NAD ⁺	Nicotinamid-adenin-dinucleotid (oxidiert)
NADH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid (reduziert)
NADP ⁺	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (oxidiert)
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (reduziert)
NALP	Nicht adhärenente Latexpartikel
NF _κ B	Nukleärer Faktor κB
NH ₂ Cl	Monochloramin
NO	Stickstoffmonoxid
O ₂ ⁻	Superoxidanion-Radikal
PAF	Plättchen-aktivierender-Faktor
PMN	Polymorphkerniger, neutrophiler Granulozyt
PP	Periportal
PPAR _α	Peroxisome proliferater receptor α
PSV	postsinusoidalen Venole
PZ	Perizentral
ROS	Reaktive Sauerstoff-Spezies
rRNS	Ribosomale Ribonukleinsäure
SEC	Sinusoidale Endothelzelle
SEM	Standard error of mean
SH	Sham-Gruppe
SOD	Superoxid-Dismutase
TauNHCl	Taurinmonochloramin
TF	Transkriptionsfaktor
TNB	Thionitrobenzoesäure

TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor α
tRNS	Transfer-Ribonukleinsäure
VLDL	Very low density lipoproteine
XDH	Xanthin-Dehydrogenase
XO	Xanthin-Oxidase
ZF	Zucker Fat
ZL	Zucker Lean

IX. ANERKENNUNG UND DANK

Mein Dank gilt zunächst meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. H. G. Rau für die Überlassung des Themas. Zu besonderem Dank bin ich auch Herrn Prof. Dr. med. Dr. h. c. mult. K. Meßmer sowie Herrn Prof. Dr. med. Dr. h. c. F. W. Schildberg verpflichtet für die Möglichkeit zur Verwirklichung meiner Dissertation am Institut für Chirurgische Forschung bzw. an der Chirurgischen Klinik des Klinikums Großhadern der LMU München.

Besonders möchte ich mich bei meinem Betreuer Herrn PD Dr. med. R. J. Schauer, Oberarzt und Leiter der Lebertransplantationsgruppe der Chirurgischen Klinik am Universitätsklinikum Großhadern der LMU München, bedanken. Unter seiner Anleitung und konstruktiven Kritik lernte ich wissenschaftliches Arbeiten, von der Durchführung und Auswertung der Experimente bis hin zur kritischen Interpretation der Ergebnisse und deren Bedeutung für den klinischen Alltag. Seine freundschaftliche Unterstützung sowie zahlreiche, konstruktive Diskussionen unterstützten das Gelingen dieser Arbeit maßgeblich.

Mein Dank gilt außerdem Herrn PD Dr. med. M. Bilzer aus der Medizinischen Klinik II des Universitätsklinikums Großhadern der LMU München sowie seiner Mitarbeiterin Frau I. Liß für die aufwendigen Bestimmungen der Glutathion-Konzentrationen. Herr PD Dr. med. M. Bilzer förderte mit zahlreichen, wertvollen Hinweisen sowie mit seinem fachkundigen Wissen ganz wesentlich das Entstehen der vorliegenden Arbeit.

Darüber hinaus möchte ich mich besonders bei Frau Dr. med. Dr. phil. R. Leiderer, Institut für Chirurgische Forschung der LMU München, für die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen sowie bei Herrn Dr. med. H. Meissner, Pathologisches Institut der LMU München, für die histologischen Untersuchungen der Leberproben bedanken.

Mein Dank geht außerdem – stellvertretend für alle Mitarbeiter des Instituts für Klinische Chemie des Klinikums Großhadern – an Herrn Dr. med. D. Mühlbayer für die Bestimmung der Lebertransaminasen.

Mein besonderer Dank gilt außerdem folgenden Personen, ohne deren Hilfe diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre: Dr. Sinan Kalmuk, Dr. Daniel Vonier und Robert Merz sowie der gesamten Belegschaft des Instituts für Chirurgische Forschung der LMU München, die mit vielen Gesprächen und Anregungen ganz wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

In tiefer Dankbarkeit wende ich mich an meine Eltern und Großeltern, die mir durch Ihre bedingungslose Unterstützung die Gelegenheit zum Studium der Humanmedizin gaben und damit das Entstehen der vorliegenden Arbeit überhaupt erst ermöglichten.

X. LEBENS LAUF

- Name:** Pflederer
- Vornamen:** Tobias Florian
- Geburtsdatum:** 20. Mai 1975
- Geburtsort:** Freilassing
- Eltern:** Dr. med. Wolfgang Pflederer; Internist, Kardiologe,
Umweltmediziner und Ärztlicher Direktor der Kreisklinik
Ottobeuren, Chefarzt der Inneren Abteilung
Mechtild Pflederer, geb. Gerber; diplomierte Dolmetscherin und
Übersetzerin
- Schulbildung:** 1981-85: Grundschulen in Langensendelbach, Senden und
Waldsassen
1985-94: Gymnasien in Tirschenreuth, Ottobeuren und
Memmingen
- Wehrdienst:** 1994-95: Gebirgssanitätsbataillon Kempten; BWK Berlin
- Studium:** 1995-96: Studium der Vor- und Frühgeschichte, der
Provinzialrömischen Archäologie und der Alten
Geschichte an der LMU München
1996-2003: Studium der Humanmedizin an der LMU München
- 1998: Abschluss des Vorklinischen Studienabschnitts
 - 1999: Abschluss des 1. Klinischen Studienabschnitts
 - 2000: United States Medical Licensing Examination I
 - 2002: Abschluss des 2. Klinischen Studienabschnitts

- 2002-03: Praktisches Jahr an der / dem:
University of the Witwatersrand Johannesburg,
Südafrika;
Kantonsspital in Basel, Schweiz sowie
Lehrkrankenhaus Traunstein der LMU München.
- 2003: Abschluss des Studiums der Humanmedizin