

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

**Prävention von frühen Ischämie- / Reperfusionsschäden in
Fettlebern durch Ischämische Präkonditionierung**

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

vorgelegt von
Robert Ian Merz

aus
München

2005

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter:

Priv. Doz. Dr. med. R. Schauer

Mitberichterstatter:

Prof. Dr. med. A. L. Gerbes

Priv. Doz. Dr. S.-S. Bolz

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dr. med. S. Kalmuk

Dekan:

Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung:

17.03.2005

INHALTSVERZEICHNIS

I. Einleitung	1
1.1 Ischämie-Reperfusionsschaden	1
1.2 Ischämische Präkonditionierung	5
1.3 Rolle der vorgeschädigten Leber	8
1.4 Fragestellung	11
II. Material und Methoden	12
2.1 Tiermodell	12
2.1.1 Versuchstiere	12
2.1.2 Tierhaltung	12
2.2 Präparation	13
2.2.1 Chirurgische Präparation und Narkose	13
2.2.2 Ischämische Präkonditionierung	15
2.3 Experimentelle Gruppen	15
2.4 Experimentelles Protokoll	17
2.5 Parameter und Meßmethoden	18
2.5.1 Systemische Hämodynamik	18
2.5.2 Hepatische Mikrozirkulation: Intravitale Fluoreszenzmikroskopie	18
2.5.3 Funktion der Kupfferschen Sternzellen	21
2.5.3.1 Applikation von fluoreszierenden Latexpartikeln	21
2.5.3.2 Beurteilung der Phagozytose-Aktivität der Kupfferschen Sternzellen	21
2.5.4 Hepatozelluläre Integrität	21
2.5.4.1 Leberenzyme	21
2.5.4.2 Leberhistologie	22
2.5.4.3 Elektronenmikroskopie der Leber	22
2.5.5 Hepatozelluläre Funktion	23
2.5.6 GSH- und GSSG-Bestimmung im Plasma	23

2.5.6.1 Gesamt-Glutathion	23
2.5.6.2 Glutathiondisulfid (GSSG)	24
2.5.6.3 Glutathion (GSH)	25
2.5.6.3 Bestimmung des intrazellulären Gesamt-Glutathion-Gehaltes	25
2.6 Statistische Analyse	25
III. Ergebnisse	26
3.1 Charakterisierung des Fettlebermodells	26
3.1.1 Systemische Hämodynamik	26
3.1.2 Glutamat-Pyruvat-Transaminase/ Alanin-Amino-Transferase	26
3.1.3 Histologie	27
3.1.4 Elektronenmikroskopie	29
3.2 Effekte Ischämischer Prækonditionierung auf die normale und die verfettete Leber	32
3.2.1 Hepatische Mikrozirkulation	32
3.2.1.1 Sinusoidale Perfusionsrate	32
3.2.1.2 Lobuläre Leukozytenadhärenz	34
3.2.1.3 Leukozytenadhärenz in postsinusoidalen Venolen	36
3.2.1.3.1 Temporäre Leukozytenadhärenz in PSV	36
3.2.1.3.2 Permanente Leukozytenadhärenz in PSV	38
3.2.1.3.3 Verhältnis von Stickern zu Rollern in PSV	40
3.2.1.4 Sinusoidweite im Leberazinus	41
3.2.1.5 Phagozytoseaktivität von Kupffer-Stern-Zellen	43
3.2.2 Hepatozelluläre Integrität	45
3.2.2.1 GPT-Aktivität im Serum	45
3.2.2.2 Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Leber	47
3.2.3 Hepatozelluläre Funktion	50
3.2.4 Bildung freier Sauerstoffradikale	53

IV. Diskussion	57
4.1 Diskussion von Material und Methoden	58
4.1.1 Tiermodell	58
4.1.2 Präparation	60
4.1.3 Intravitalmikroskopie	61
4.2 Diskussion der Ergebnisse	62
4.2.1 Mechanismen des Ischämie-Reperfusionsschadens in der steatotischen Leber	62
4.2.2 Hepatozelluläre Integrität	63
4.2.3 Mikrozirkulation	65
4.2.3.1 Sinusoidweite und -perfusionsrate	65
4.2.3.2 Sinusoidale Perfusionsrate	66
4.2.3.3 Leukozyten-Endothel-Interaktion in hepatischen Sinusoiden und postsinusoidalen Venolen	68
4.2.3.4 Phagozytoseaktivität von Kupffer-Stern-Zellen	71
4.2.4 Hepatozelluläre Funktion - Galleproduktion	72
4.2.5 Die Rolle von ROS am IRS	73
4.2.5.1 Rolle von ROS in normalen Lebern	74
4.2.5.2 Die Bedeutung von ROS in verfetteten Lebern	76
4.3 Ischämische Präkonditionierung als protektive Strategie gegen den frühen Ischämie-/ Reperfusionsschaden in der normalen und moderat verfetteten Leber	78
4.3.1 Hepatozelluläre Integrität (Leberenzym GPT)	78
4.3.2 Elektronenmikroskopische Untersuchung	78
4.3.3 Mikrozirkulation	79
4.3.3.1 Sinusoidweite und Sinusoidale Perfusionsrate	79
4.3.3.2 Leukozytenadhärenz	80
4.3.3.3 Phagozytoseaktivität von Kupffer-Stern-Zellen	81
4.3.4 Hepatozelluläre Funktionalität	83
4.3.5 Bildung freier Sauerstoffradikale	84

V. Zusammenfassung	85
VI. Literaturverzeichnis	88
VII. Abkürzungen	114
VIII. Anerkennung und Dank	116
IX. Lebenslauf	118

I. EINLEITUNG

Im Jahre 1908 wandte Pringle erstmals ein Verfahren zum temporären Verschluss der hepatischen Durchblutung an, um extensive Blutungen während Operationen an der Leber zu reduzieren (Pringle 1908). Das nach ihm benannte Manöver unter Abklemmung der portalen Trias bestehend aus Vena porta, Arteria hepatica und Ductus hepatocholedochus stellt bis in die heutige Zeit ein bewährtes Prinzip zur Blutungsvermeidung während Leberresektionen dar. Die Reduzierung des intraoperativen Blutverlustes erhöht die Sicherheit des operativen Vorgehens, dessen Mortalitätsrate 0-5% beträgt (Rees 1996). Limitierender Faktor in der Leberchirurgie ist neben den anatomischen Eigenheiten der Leber und der dadurch technischen und chirurgischen Herausforderung vor allem die Dauer der Durchblutungs-Unterbrechung. Obwohl die Leber als das Organ mit der höchsten Ischämietoleranz gilt und man heute davon ausgeht, dass 90 Minuten Abklemmung der hepatischen Blutzufuhr bei einer in ihrer Organstruktur nicht veränderten Leber gefahrlos durchgeführt werden kann, resultieren bereits bei diesen nicht-zirrhotischen Lebern hepatozelluläre Schäden (Hannoun 1993). Dies äußert sich funktionell in einem postoperativen Anstieg der Lebertransaminasenwerte bis zum 13-fachen des Ausgangswertes. Als schwerwiegendste Folge nach Leberresektion gilt deshalb die Leberinsuffizienz, die mit einer hohen Letalität von bis zu 90% vergesellschaftet ist (Habin 1995).

Bei der Unterbrechung der Blutzufuhr zu einem Organ wird dabei zwischen einer warmen und einer kalten Ischämie unterschieden. Verbleibt ein Organ während der Ischämiephase in seinem ursprünglichen Situs wie am Beispiel der Leberresektion, wird von warmer Ischämie gesprochen. Wird das Organ aus seinem Ursprungskörper entnommen und in einen anderen verpflanzt, wodurch es unter anderem längeren Transportzeiten in einer gekühlten Konservierungslösung (4°C) ausgesetzt wird, spricht man von kalter Ischämie, wie unter den Bedingungen der Lebetransplantation.

Die Lebertransplantation stellt heute die einzige mögliche Therapie bei Patienten mit einer Lebererkrankung im dekompenzierten Stadium dar. Mit mehr als 4000 Transplantationen jährlich (Bismuth 1987, First 1992, Starzl 1989), stellt dies eine inzwischen etablierte Methode dar. Dennoch muss bei einem Anteil von bis zu 20% aller transplantierten Organe mit einer unzureichenden oder gar fehlenden Transplantatfunktion gerechnet werden (Ploeg 1993). Meist stellt sich bei diesen Patienten bei hoher Mortalität die notfallmäßige Retransplantation als einzige lebenserhaltende Behandlungsmöglichkeit dar. Dies ist auch

insofern als kritisch zu betrachten, da der ohnehin zu kleine Pool an Spenderlebern dadurch zusätzlich belastet wird.

Der pathophysiologische Hintergrund sowohl für die Leberinsuffizienz nach Leberresektion, also warmer Ischämie, als auch nach Lebertransplantation, sogenannter kalter Ischämie, lässt sich durch das Phänomen des Ischämie-Reperfusionsschadens erklären.

1.1 Ischämie-Reperfusionsschaden (IRS)

Ursprünglich war man der Ansicht, dass nur eine zügig eingeleitete Reperfusion ein ischämisches Areal vor permanenten Schäden bewahren kann. In den vergangenen Jahren wurde jedoch mehrfach gezeigt, dass ein signifikanter Anteil des Schadens auf die Reperfusion zurückzuführen ist (Menger 1992b, Kerrigan 1993). Seither werden die so induzierten morphologischen und funktionellen Veränderungen als Ischämie-Reperfusionsschäden bezeichnet.

Charakterisieren lässt sich der Prozess des hepatischen Ischämie-Reperfusionsschadens durch sinusoidale Perfusionsausfälle, die Akkumulation und Adhärenz von Leukozyten in Sinusoiden und postsinusoidalen Venolen, den Verlust des endothelialen Zusammenhaltes und letztlich den Zusammenbruch der Lebermikrozirkulation. Im wesentlichen betroffen ist die Mikrozirkulation, da die Manifestation von mikrovaskulären Schäden, hier besonders der Verlust der endothelialen Integrität, der Ausbildung von parenchymalen Gewebeschäden vorausgeht (Menger 1991a).

In der Ischämiephase gilt vor allem die Hypoxie und deren Folgen als wesentlicher Pathomechanismus. So kommt es hypoxie-induziert zu einem Synthesemangel energiereicher Phosphate wie zum Beispiel des Adenosintriphosphats (Kerrigan 1993). Dies führt zu einer Aktivitätsminderung der ATP-abhängigen Na^+/K^+ -Kanäle entlang der Zellmembran und dadurch zu einer Verschiebung von Elektrolyten und damit auch Wasser in die Zelle. Die daraus resultierende Zellschwellung ist vor allem in der Endothelzelle beobachtet worden (Leaf 1973, Silver 1977). Gleichzeitig zieht Hypoxie eine Azidose nach sich, welche die viscoelastischen Eigenschaften von Leukozyten beeinträchtigt und damit zu einer Obstruktion von Kapillaren führen kann (Schmid-Schönbein 1987). Der in der Ischämiephase entstandene Gewebsschaden mit Zellschwellung, eingeschränkter Kapillarperfusion und mikrovaskulärer Thrombose führt folglich zu dem als "no-reflow phenomenon" bekannten Geschehen, bei welchem es auch nach einsetzender Reperfusion zum Fortbestehen der Hypoxie und deren

Folgen kommt und somit Ischämieschäden weiter aggraviert (Menger 1988, Menger 1989, Menger 1992d).

Durch die Reoxygenierung ischämischer Gebiete in der Reperfusionphase entstehen im sauerstoffreichen Blut Metabolite, die zu einer erhöhten Freisetzung freier Sauerstoffradikale führt. Freie Sauerstoffradikale oder deren Metabolite (Superoxidanionen, Hydroxylanionen, Hydrogenperoxid) gelten als toxisch, indem sie z.B. durch Lipidperoxidation Membran- und folglich auch Gewebsschäden induzieren (McCord 1985). Diese Gewebsschäden werden auch durch den auf Proteine denaturierend wirkenden Mechanismus von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS) unterstützt (Jaeschke 1995, Jaeschke 1997).

Die Rolle von ROS im Ischämie-Reperfusionsschaden ist dabei mehrfach demonstriert worden. Durch Verwendung antioxidativ wirkender Substanzen wie Superoxiddismutase, Katalase oder Vitamin E konnte die Bildung radikalbedingter biochemischer oder morphologischer Veränderungen verhindert und eine Reduktion des IRS beobachtet werden (Nagel 1997). Ein direkter Nachweis der Radikale gelang durch Verwendung der Elektronen-Resonanz-Spektrometrie und der Chemilumineszenztechnik (Kunz 1991, Nunes 1995). Über die Bildungsstätte dieser ROS ist viel diskutiert worden. Die Xanthinoxidase scheint als Quelle für die Synthese von ROS in Frage zu kommen, da Xanthin und Hypoxanthin während hepatischer Ischämie akkumulieren (Marzi 1989). Die Aktivität der Xanthinoxidase scheint besonders in solchen Endothelzellen erhöht zu sein, die Anoxie und anschließender Reoxygenierung ausgesetzt sind, da die Bildung ROS durch Xanthinoxidase-Inhibitoren wie Allopurinol deutlich eingeschränkt werden konnte (Zweier 1988).

Auch wenn ROS Hepatozyten Schaden durch Peroxidation von Membranlipiden zufügen können (Ito 1992), müsste die Leberzelle durch ihre antioxidative Enzymausstattung gegen oxidativen Stress während der Reperfusion jedoch relativ resistent sein. Deshalb wird der reperfusionsbedingte Schaden durch ROS hauptsächlich als nonparenchymaler Prozess betrachtet (Walsh 1990). Als mögliche Produzenten extrazellulärer Radikale werden Makrophagen, in der Leber die Kupffer-Stern-Zellen, und aktivierte Leukozyten (Polymorphkernige Granulozyten, PMN) angesehen. Als Mechanismus wird die durch Ischämie/Reperfusion induzierte Aktivierung der NADPH-Oxidase in der Plasmamembran dieser Zellen vermutet (Metzger 1988, Jaeschke 1991a, Rymsa 1991).

Diese extrazellulär freigesetzten Radikale haben neben den bereits genannten Effekten auf die Lipid-Peroxidation auch noch Mediatorfunktionen. So wurde ein Zusammenhang von ROS mit Vasokonstriktion während der Reperfusionphase beobachtet (Bilzer 1996). Eine weitere

Mediatorfunktion von ROS besteht eventuell in einer erhöhten Aktivierung von Leukozyten (Granger 1988) und einer vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen, was in einer Akkumulation von Leukozyten in Mikrogefäßen resultiert (Del Maestro 1982, Granger 1989, Menger 1992b).

Diese Endothel-Leukozyten-Interaktion ist als entzündlicher Prozess anzusehen, der besonders in den postsinusoidalen Venolen durch vermehrte Leukozytenadhärenz beobachtet werden konnte (Menger 1992c), und wird durch verschiedene weitere Mediatoren unterstützt. Auch hier wird wieder den Kupffer-Zellen eine zentrale Bedeutung beigemessen, indem sie an der Ausschüttung dieser Mediatoren teilnehmen. Neben den von immunkompetenten Zellen freigesetzten Faktoren wie Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF- α), Interleukin-2, IL-6, IL-10 und Nuclear transcription factor (Nf κ B) werden einerseits Adhäsionsmoleküle ausgebildet, nämlich ICAM-1 und ICAM-2 auf Endothelseite sowie CD11/ CD18 auf Leukozytenseite, andererseits Selektine wie LECAM-1 auf Leukozyten und ELAM-1 auf Endothelzellen. Durch den Einsatz von monoklonalen Antikörpern gegen diese Adhäsionsmoleküle mit einer daraufhin signifikanten Abnahme der Leukozytenadhärenz wurde diese Theorie gestützt (Hecht 1993). Dabei werden zwei Phasen der Adhärenz unterschieden, da es vor der permanenten („sticking“) zu einer temporären Adhärenz kommt, auch „rolling“ genannt (Bienvenu 1993). Schließlich kommt es durch Diapedese und Emigration von PMN durch das Endothel zu einer Schädigung des Leberparenchyms (Hernandez 1987). Diese sinusoidale Leukozytenadhärenz ist mehrfach in Versuchen demonstriert worden, sowohl während kalter (Marzi 1991) als auch warmer Ischämie (Menger 1991b). Hierbei scheinen jedoch weniger Adhäsionsmoleküle eine Rolle zu spielen als viel mehr mechanische Mechanismen wie Zellschwellung, sinusoidale Hämokonzentration oder die Akkumulation von Thrombozytenaggregaten (Kandhoga 2002).

Ein weiterer allgemeiner Faktor für die Akkumulation von Leukozyten sind die durch Leukozyten und Sauerstoffradikale freigesetzten chemotaktischen Wirkstoffe wie Leukotriene und Thrombozyten-aktivierender Faktor. Ein weiterer Effekt der Leukotriene (Lehr 1991, Björk 1982) und des Thrombozyten-aktivierenden Faktors (Björk 1983, Kubes 1990) ist die Erhöhung der Endothel-Permeabilität, die zu einem interstitiellen Ödem führt und damit zu einem ansteigenden Gewebedruck. Dies wiederum kann die kapilläre Perfusion zum Zeitpunkt der Reperfusion weiter verschlechtern und somit zu erhöhtem postischämischen Gewebsschaden aufgrund fokaler Ischämie führen.

All dies führt zu einem postischämischen Zusammenbruch der mikrovaskulären Perfusion und damit zur Ausbildung mikrovaskulärer Ischämie-/ Reperfusionsschäden. Dabei lassen

sich zusammenfassend zwei Phänomene beobachten. Ersteres gilt als das bereits erwähnte „no-reflow“ Phänomen, wo die primäre kapilläre Perfusion nach Ansetzen der Reperfusion ausbleibt (Menger 1992a). Dadurch wird die lokale Hypoxie der versorgenden Mikrogefäße prolongiert, was letztlich im Zelltod endet.

Zum anderen kommt es zum Phänomen des „reflow-paradox“, wo es im Gegensatz zum „no-reflow“ zu einer Reperfusion und dadurch Reoxygenierung des Gewebes kommt. Diese führt allerdings durch oben beschriebene Mechanismen zu einer inflammatorischen Leukozytenreaktion mit vermehrter Akkumulation und Adhärenz von Leukozyten, erhöhter mikrovaskulärer Permeabilität, Bildung von Sauerstoffradikalen und Freisetzung einer Reihe potenter Mediatoren, und letztlich zu postischämischen Gewebeschäden durch Lipidperoxidation und Membrandesintegration (Menger 1991a, Jaescke 1990b, Vollmar 1994).

In den letzten Jahren wurde auch dem programmierten Zelltod, der Apoptose, eine Beteiligung an der Entstehung des Ischämie-(/Re)perfusionsschadens zugesprochen. Motoyama et al (1998) sahen dabei einen Zusammenhang zwischen ROS-Bildung durch Kupffer-Zellen und der Initiierung des Apoptosemechanismus in Endothelzellen der Sinusoide und Gefäße innerhalb der Leber. Der zugrundeliegende Mechanismus hierbei könnte in einer Mitochondriendysfunktion liegen (Natori 1999). Vermutet wird, dass durch mitochondriale Dysfunktion freigesetztes Cytochrom C zu einer Aktivierung der proapoptotischen Kaspase führt. Diese Theorie wurde durch Kaspase-Inhibitoren und eine daraufhin beobachtete Reduktion des IRS gestützt (Cursio 1999). Als weiterer Initiator einer erhöhten Apoptoserate gilt das Calpain (Kohli 1997, Sindram 1999).

Die Prävention des IRS durch die Gabe von Antioxidantien wie zum Beispiel Glutathion, einem endogenen Antioxidans im Plasma (Schauer 2004a und 2004b), scheint ein effektiver therapeutischer Ansatz bei der Vermeidung Ischämie-Reperfusion-induzierter Schäden in der Leber zu sein. Eine weitere protektive Strategie ist das Prinzip der sogenannten „Ischämischen Präkonditionierung“.

1.2 Ischämische Präkonditionierung (IPC)

In seinen Versuchen zeigten Murry et al. 1986, dass die Größe eines Myokardinfarktes nach langer Ischämie durch vorhergehende solitäre oder multiple kurze Ischämie-Reperusionsperioden vermindert werden konnte. Dieses an sich paradoxe Phänomen, dass

eine zusätzliche Ischämie einen protektiven Effekt hat, erklärt sich durch eine Toleranzentwicklung gegen die nachfolgende prolongierte Ischämiephase. Das Vorgehen wird seither als ischämische Präkonditionierung bezeichnet und ist bereits mehrfach an verschiedenen Organsystemen im Tierversuch nachgewiesen worden (Ishida 1997). Am Menschen ist die ischämische Präkonditionierung mehrfach am Myokard untersucht worden (Yellon 1993, Ikonomidis 1994, Alkhulaifi 1994, Lee 1995), mit dem Ergebnis, dass der protektive Effekt der Ischämischen Präkonditionierung (IPC) aus einer verbesserten Erhaltung von ATP-Spiegeln, erhöhter Kapazität für die Produktion energiereicher Phosphatverbindungen und gesteigerter Erholung des Myokards zustande kommen könnte.

Am Modell der isoliert perfundierten Rattenleber konnte gezeigt werden, dass eine 10-minütige Ischämie mit anschließender 10-minütiger Reperfusion vor Ischämie-Reperfusionsschäden schützen kann (Peralta 1997). Funktionelles Korrelat war eine signifikante Verminderung des post-ischämischen Transaminasenanstiegs nach IPC. Wie der protektive Effekt der IPC gegen IRS zustande kommt, ist noch nicht vollständig geklärt. Die Befunde wurden jedoch dahingehend interpretiert, dass die während der Reperfusionsphase induzierten Mechanismen der ROS- und Zytokinfreisetzung letztlich zu einer Konzentrationszunahme des vasodilatatorisch wirkenden Stickstoffmonoxid (NO) führen und dadurch zytoprotektive Wirkung über eine verbesserte Mikrozirkulation entfalten. Für diese Theorie spricht auch, dass dieselben Effekte durch intravenöse Zufuhr von NO-Donatoren erreicht werden konnten. Die günstige NO-Wirkung auf IRS könnte dabei durch Inhibition der Endothelinsynthese, einem vasokonstriktorisches Protein, vermittelt werden, wie in einem in-vivo Modell der Rattenleber gezeigt werden konnte (Peralta 1996).

Darüberhinaus scheinen auch andere Mechanismen der Protektion zu wirken. Dem Adenosin, einem endogen anfallenden Stoffwechselprodukts aus dem ATP-Abbau, wird in diesem Zusammenhang eine Rolle zugeschrieben, da es nach Einsetzen von Ischämie in praktisch allen Gewebsarten innerhalb von Sekunden in großen Mengen nachgewiesen wurde (Hori 1993, Ely 1992). Durch experimentelle Infusion von Adenosinrezeptor-Blockern konnte die Wirkung von IPC aufgehoben (Liu 1991, Armstrong 1994) oder durch Erhöhung des endogenen Adenosins durch Adenosindesaminase-Inhibitoren oder Adenosinaufnahmehemmern der protektive Effekt von IPC kopiert oder gar potenziert werden (Toombs 1992, Urabe 1993). Es ist anzunehmen, dass die protektive Wirkung des Adenosins dabei multifaktoriell zustande kommt. IPC scheint zu einem geringeren Abbau des ATP während der Ischämiephase zu führen und damit zu einem erhöhten ATP-Spiegel in der Reperfusionsphase (Murry 1986). Adenosin gilt besonders in energiearmen Myozyten als

effizienteste Substanz, um ATP-Spiegel wieder aufzusättigen, indem es die Konversion von Adenosin zu ATP mittels der Adenosinkinase und anderen Enzymsystemen vorantreibt (Ely 1992). Bei der kurzen Halbwertszeit von Adenosin im Blut (2-10 Sekunden nach Ely 1992 und Belardinelli 1989) kann von einer Adenosintherapie, die vor der ischämischen Phase eingeleitet wird, (auf langer Basis) kein profitierender Effekt angenommen werden. Weitere Studien von Nolte (1991), Keller (1991) und Cronstein (1994) deuteten auf eine hemmende Wirkung von Adenosin auf die Produktion freier Sauerstoffradikale durch neutrophile Granulozyten hin. Desweiteren wurde Adenosin in Zusammenhang mit der Inhibition des Neutrophilen- und Thrombozyten-medierten Zellschadens gestellt. Der dilatierende Effekt des Adenosins, der sowohl an den großen Herzkranzgefäßen als auch in den Mikroarteriolen greift, trägt ebenfalls zur Erhaltung der Perfusion im Gefäßsystem nach Ischämie bei (Lee 1999). Ein weiterer Wirkmechanismus des Adenosins wird in der Hyperpolarisation von Zellen vermutet. Durch Aktivierung von Adenosinrezeptor-gekoppelten K^+ /ATP-Kanälen kommt es in der hyperpolarisierten Zelle zu verminderter Phosphorylierung langsamer Calciumkanäle durch reduzierte Protein-Kinase A- Aktivität und folglich zu einem verminderten Energiebedarf der Zelle (Hsu 1994, Cronstein 1994, Jerome 1995). Dies wurde bestätigt durch selektive Blockade der K^+ /ATP-Kanäle mittels Infusion von Glibenclamid bei gleichzeitiger Adenosingabe und daraufhin beobachteter Aufhebung der Effekte von Adenosin auf das Myokard (Van Winkle 1994).

Desweiteren wurde gezeigt, dass IPC die Bildung einer intrazellulären Azidose verlangsamt bei gleichzeitiger intrazellulärer Natriumkonzentrationssteigerung. Dadurch wird aufgrund eines Natrium-Calcium-Austauschmechanismus das intrazelluläre Calcium reduziert, mit dem Ergebnis einer verminderten Kontraktionsneigung und reduziertem ATP-Verbrauch der Zellen (Steenbergen 1993). Es gibt also mehrere plausible Hypothesen zur Partizipation von Adenosin an der Wirkungsweise der ischämischen Präkonditionierung, wobei Verringerung des Energiebedarfs der Zelle und verminderter Zellschaden durch Hemmung entzündlicher Mediatoren im Vordergrund stehen.

Einen Zusammenhang zwischen Hepatoprotektion durch IPC vor IRS und einer signifikant reduzierten Apoptoserate von Hepatozyten und Sinusoidzellen wurde von Yadav und Clavien (1999) nachgewiesen. Der zugrundeliegende Wirkmechanismus scheint hierbei in der Herunterregulation der Kaspase-Kaskade zu liegen.

Eine wesentliche Bedeutung in Hinsicht auf die verzögerte Protektion postischämischer Leberschäden wird auch der Induktion von heat shock-Proteinen (HSP) zugeschrieben. Der verantwortliche Mechanismus ist bislang nicht hinreichend bekannt, eine pathogenetische

Beteiligung beim IRS der Rattenleber konnte aber bereits gezeigt werden (Kume 1996; Terajima 1999). Dabei wurde zum einen die verstärkte Expression von HSP 70 bzw. 72 in der Leber sowohl nach IPC als auch nach Hitze-Exposition nachgewiesen, zum anderen führte dieses Vorgehen zu einer Reduktion des hepatozellulären Schadens nach anschließender warmer Ischämie mit signifikant reduzierten Zellschäden und verbessertem Überleben. Aber auch bei kalter Ischämie konnte die Wirksamkeit der IPC am Transplantationsmodell der Ratte bestätigt werden, wo neben einer funktionellen Verbesserung auch signifikant verlängerte Überlebenszeiten erreicht wurden (Yin 1998).

Zusammenfassend scheinen durch IPC Mechanismen in der Leber induziert zu werden, die zwar in ihrem Ablauf und in ihren Interaktionen nur unvollständig bekannt sind, letztlich jedoch postischämisch zu einer Hepatoprotektion führen können. Es ist jedoch völlig unbekannt, welches protektive Potential IPC auf die hepatische Mikrozirkulation von vorgeschädigten Lebern hat und ob die genannten Interventionen bei Fettlebern ebenfalls zur Reduktion von IRS führen.

1.3 Rolle der vorgeschädigten Leber

Mit entscheidend für die Inzidenz einer schweren postoperativen Leberdysfunktion bzw. eines Leberversagens ist die funktionelle Organreserve, d.h. die Organbeschaffenheit oder die Qualität des Leberparenchyms. Die klinische Realität zeigt, dass im Rahmen von Leberresektionen und Lebertransplantationen mit ganz erheblichen Einschränkungen dieser Leberfunktion gerechnet werden muss. In industrialisierten Gebieten gelten Fettlebern als häufiges Problem, mit einem Auftreten von 6,3 bis 21% bei Autopsien (Hilden 1977, Hornboll 1982; Underwood 1984, Teramoto 1993b).

Leberresektionen werden häufig bei Tumorerkrankungen durchgeführt. Dabei besteht eine Assoziation von bis zu 66% von chronischen Lebererkrankungen, z.B. Fibrose oder Zirrhose, mit bestimmten Tumortypen, z.B. dem hepatozellulären Karzinom (Takenaka 1990, Farges 1999). Auch wurde an Patientenkollektiven wiederholt eine direkte Abhängigkeit der Komplikationsraten nach Leberteileresektionen von der Organbeschaffenheit demonstriert (Huguet 1994; Pol 1999, Takenaka 1990; Farges 1999). Es gibt Hinweise, dass Fettlebern bereits ohne zusätzliche Schädigung durch Ischämie/Reperfusion eine eingeschränkte hepatische Mikrozirkulation aufweisen (Sato 1986, Seifallian 1999). Patienten mit chronischen Lebererkrankungen wie Fibrose oder Zirrhose weisen hingegen bereits ein 19-

32%iges Risiko auf, an den Folgen eines postoperativen Leberversagens zu versterben (Takenaka 1990, Behrns 1998, Farges 1999). Bei Patienten mit normaler Leberfunktion liegt dieser Wert unter 2% (Selzner und Clavien 1999). Auch bei der kalten Ischämie in Form von Lebertransplantationen bestimmt die Organqualität einer Spenderleber mit dem Grad der Verfettung entscheidend den Transplantationserfolg (Ploeg 1993), wobei bei bis zu 26% der Spenderlebern eine Verfettung festgestellt werden kann (D'Alessandro 1991). Die meisten Transplantationszentren lehnen trotz der kritischen Organspendersituation eine Transplantation ab, bei der die Spenderleber einen Verfettungsgrad von mehr als 50% aufweist (D'Alessandro 1991).

Zur besseren Klassifizierung des Steatosegrades einer Leber wurde eine Einteilung in milde, moderate und hochgradige Verfettung eingeführt (D'Alessandro 1991, Adam 1991). Seither wird eine Leberverfettung in unter 30% der Hepatozyten als „mild“ betrachtet, zwischen 30 und 60% als moderat und über 60% als hochgradig. Dabei zeigte sich, dass mild verfettete Lebern (Steatosegrad < 30%) nach Transplantation ähnlich gute Organfunktion und Empfänger-Überlebensraten zeigten wie es bei normalen Lebern der Fall war (Markin 1993). Als Kontraindikation für eine Transplantation werden hingegen Spenderlebern gesehen, die hochgradig verfettet sind, also einen Anteil von mehr als 60% steatotischer Hepatozyten aufweisen (Selzner 2001). Begründet wird dies vor allem durch den hohen Anteil der primären Nichtfunktion (PNF) solcher Lebern. Liegt dieser in der normalen Leber nach Transplantation noch bei ca. 3-6% (D'Alessandro 1991, Ploeg 1993), werden bei Verwendung hochgradig verfetteter Lebern Werte von inakzeptablen 40-60% beobachtet (Hayashi 1999, Canelo 1999). Was die moderat verfetteten Lebern angeht gibt es unterschiedliche Ergebnisse. So fanden Fishbein et al. 1997 beim Vergleich normaler mit moderat verfetteten Lebern ähnliche Einjahres-Überlebensraten von Patienten und Spenderorganen (Fishbein 1997). In einer ähnlichen Studie beobachteten hingegen Chui et al. eine signifikante Verschlechterung der Überlebensrate von 73% bei normalen Spenderlebern auf 58% bei moderat verfetteten Lebern (Chui 1998). Deshalb wird die moderat verfettete Spenderleber als relative Kontraindikation zur Transplantation gesehen (Selzner 2001). Da sie nach Untersuchungen jedoch einen nicht zu vernachlässigenden Anteil von ca. 10% der Fettlebern ausmacht, könnte der Zugang zu diesen moderat verfetteten Lebern den knappen Spenderpool um wertvolle Organe erweitern (Hornboll 1982).

In unseren Breitengraden kommt der Fettleber generell eine hohe Bedeutung zu. Wie sich Ischämie-/Reperfusionsschäden an ihr entwickeln ist hingegen nur ungenügend untersucht. Steatosis wird mit mitochondrialer Dysfunktion und erniedrigten intrazellulären

Energieverhältnissen in Form von erniedrigten ATP-Spiegeln in Verbindung gebracht (Letteron 1996, Fromenty 1997, Berson 1998). Welche Rolle die Kupffer-Zellen in der vorgeschädigten Leber einnehmen ist auch nicht vollständig geklärt, jedoch wird hochgradige Verfettung mit einer Dysfunktion dieser Zellen assoziiert (Thurman 1995). Diese Resultate sowie eigene Versuchsergebnisse wurden von Selzner und Clavien (2000) dahingehend interpretiert, dass der von ihnen beobachtete Abfall der Apoptoserate in verfetteten Lebern gekoppelt ist mit einer deutlich gesteigerten Nekroserate. Dies ließe sich durch die verminderte Kupffer-Zell-Aktivität miterklären, da diese Zellen normalerweise proapoptotische Faktoren wie Tumornekrosefaktor alpha oder freie Sauerstoffradikale freisetzen. Zusätzlich würde ein verminderter Energiegehalt der Zelle die Initiierung des energieaufwändigen Prozesses der Apoptose verhindern (Thurman 1995). Die hohe Nekroserate bei vorgeschädigten Lebern nach 60-minütiger Ischämie ging mit einer 100%igen Mortalität der Tiere einher, wohingegen Ratten mit normalen Lebern und einer höheren Apoptoserate dieselben Bedingungen zu 100% überlebten. Dies unterstreicht nochmals, dass Nekrose die schlechter tolerierte Form des Zelltodes ist, wohingegen selbst ausgedehnte Apoptoseraten mit dem Überleben der Tiere einhergehen können. In der normalen Leber kommt es nach Ischämie innerhalb weniger Stunden zur raschen Apoptose der vorgeschädigten Zellen, die im Anschluss ohne weitere Entzündung von Makrophagen abgebaut werden.

Es zeigen sich also unterschiedliche Mechanismen im Zelltod von verfetteten gegenüber nicht-verfetteten Lebern. Zusammen mit den anderen bislang festgestellten Reaktionen der steatotischen Leber auf IRS lassen sich verschiedene pathophysiologische Wege in beiden Lebertypen vermuten. Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass protektive Strategien, die bei normalen Lebern wirken, bei verfetteten Lebern anders oder gar nicht zur Geltung kommen und deutet somit auf die Schwierigkeiten bei der Prävention des IRS in der steatotischen Leber hin.

1.4 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit soll daher die normale mit der moderat verfetteten Leber verglichen werden, da hier noch am meisten Klärungsbedarf vorliegt. Zunächst soll dabei auf die Unterschiede in der Morphologie eingegangen werden, also ohne Einfluss von Ischämie/Reperfusion. Im Anschluss sollen die funktionellen Auswirkungen von ischämischer Präkonditionierung (IPC) auf vorgeschädigte Lebern, unter besonderer Berücksichtigung der hepatischen Mikrozirkulation, untersucht werden. Das Ziel dabei ist, den Weg für neue therapeutische Ansätze bei der Vermeidung des Ischämie-/Reperfusionsschadens sowohl in der normalen als auch in der verfetteten Leber zu weisen, unter spezieller Fokussierung auf die protektive Wirkung der ischämischen Präkonditionierung.

Aus den oben genannten pathophysiologischen Überlegungen ergeben sich somit folgende wesentliche Fragestellungen:

1. Welche funktionellen und morphologischen Charakteristiken zeigen sich nach warmer Ischämie von moderat verfetteten Lebern mit einem Verfettungsgrad von 30-60% gegenüber normalen Lebern?
2. Können IRS in moderat verfetteten Lebern durch IPC reduziert werden?

MATERIAL und METHODEN

Die im folgenden vorgestellten Untersuchungen wurden im Zeitraum April bis Dezember 2000 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).

2.1 Tiermodell

2.1.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten 36 männliche Zucker-Ratten mit einem Körpergewicht von 180 bis 280g und einem Alter von 8 Wochen. Zucker-Ratten gehören zu einem gut untersuchten Modell der durch Nutrition induzierten Fettleibigkeit und simulieren somit ziemlich genau die häufigste Ursache für Steatosis in der westlichen Hemisphäre (White B, 1997). Dabei wurden zum einen die heterozygoten Zucker-Lean-Ratten (ZL, nicht-verfettete Leber), zum anderen die homozygoten Zucker-Fat-Ratten (ZF, verfettete Leber) verwendet. Die homozygoten Zucker-Ratten besitzen im Gegensatz zu den heterozygoten Tieren keinen cerebralen Leptin-Rezeptor und entwickeln durch deutlich vermehrte Futteraufnahme und verminderten Energieverbrauch im Alter von 8 Wochen bereits eine Fettleber.

Die Entscheidung zugunsten dieses Tiermodells fiel auch durch den Nachteil anderer Steatosis-Gruppen, deren Modell auf Alkoholigestion oder einer Cholin-defizienten Diät beruht, welche mit entzündlichen Prozessen einhergehen und somit die Interpretation von Organschäden erschweren (Teramoto 1993b, Koneru 1995).

Alle Tiere stammten aus der Versuchstierzucht der Charles River GmbH in Sulzfeld, Deutschland.

2.1.2 Tierhaltung

Die Haltung erfolgte im 12-stündigem Hell-/ Dunkelzyklus bei einer autoregulierten Raumtemperatur von 21°C und einer Luftfeuchtigkeit von 60±5%. Es befanden sich jeweils drei Tiere in Käfigen der Abmessung 30 x 50 cm mit Einstreu und freiem Zugang zu Wasser und Standardfutter. Das Futter (ssnif rat diet, ssnif Spezialdiäten, Soest) enthielt folgende Inhaltsstoffe:

19% Rohproteine, 0,3% Methionin, 1,0% Lysin, 3,3% Rohfett, 4,9% Rohfaser, 6,7% Rohasche, 1,1% Calcium, 0,8% Phosphor, 0,25% Natrium, 0,2% Magnesium. Pro Kilogramm Futter waren folgende Zusatzstoffe beigemischt: 18000 I.E. Vitamin A, 1000 I.E. Vitamin D₃, 100mg Vitamin E. Die Ratten unterstanden der regelmäßigen Aufsicht durch das Tierpflegepersonal des Instituts für chirurgische Forschung.

2.2 Präparation

2.2.1 Chirurgische Präparation und Narkose

Um den zirkadianen Schwankungen im Stoffwechsel der Tiere ausweichen zu können, wurden sämtliche chirurgischen Eingriffe zwischen 7:00 und 10:00 durchgeführt. Zur Operation vorgesehene Tiere wurden einer 12-stündigen Nahrungskarenz unterzogen, jedoch mit Wasser ad libitum. Zur Operationseinleitungsvorbereitung wurden die Ratten im durchsichtigen Glastopf mit Äther (Äther für Narkose, Fa. Hoechst, Frankfurt) unter ständiger Kontrolle ihrer Vitalfunktionen (Atemmuster und Bewegungsverhalten) narkotisiert. Anschließend erfolgte die Rasur des Fells am Hals und am Bauchfell mit nachfolgender alkoholischer Hautdesinfektion (Kodan[®] Tinktur Forte, Schülke & Mayer GmbH, Norderstedt). Daraufhin wurden die Tiere für die nachfolgende Operation in tiefe Äthernarkose versetzt.

Die Operation erfolgte unter sauberen, jedoch nicht aseptischen Bedingungen in einem Operationssaal des Instituts für chirurgische Forschung des Klinikums Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität München 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) an allen vier Extremitäten über gesondert angefertigte Haltemagneten fixiert. Durch eine rektal eingeführte Thermosonde, die mit dem Wärmeaggregat der Heizplatte verbunden war, konnte eine kontinuierliche Messung der Körperkerntemperatur erfolgen und durch einen Rückkoppelungs-Steuermechanismus konstant zwischen 36,5 und 37,5°C gehalten werden.

Die Anästhesie wurde im offenen System mit Hilfe einer Atemmaske durchgeführt, die mit äthergetränkten Kompressen ausgekleidet war und dem Kopf des Tieres vorgelagert wurde. So konnte die Dosierung der Narkose manuell dem jeweiligen Atemantrieb angeglichen werden. Für das Auftreten eines Narkosezwischenfalles mit Atemantriebsverminderung oder gar –stillstand, lag auf dem Operationstisch eine Sauerstoffleitung mit 100%-igem O₂ bereit, um eine rasche arterielle Sauerstoffaufsättigung gewährleisten zu können.

Die Operation erfolgte standardisiert nach Protokoll und ließ sich in zwei Phasen aufgliedern. Die erste Phase beinhaltete die Präparation der Halsgefäße, die zweite Phase die Laparotomie.

Zur Operationsphase I:

Nach gründlicher Hautdesinfektion wurden jeweils die linke Vena jugularis externa und Arteria carotis communis dargestellt und mit Polyethylenkathetern (PE 50, Außen-/ Innendurchmesser 0,96/ 0,58mm, Portex, Hythe, England) versehen. Der Katheter in der Vena jugularis externa sinistra diente der Applikation der Farbstoffe Na-Fluoreszein und Rhodamin 6-G für die Intravitalmikroskopie und von Pharmaka (z.B. Humanalbumin oder Hydrogencarbonat). Die Insertion des Katheters in die Arteria carotis communis sinistra erfolgte zur kontinuierlichen Messung des arteriellen Mitteldruckes (MAP), der Herzfrequenz, der Injektion von fluoreszierenden Latexpartikeln (Beads), der Gewinnung arterieller Blutproben und der kontinuierlichen Zufuhr von steriler Tutofusin-Lösung (4ml/h). Diese Infusion gewährleistete auch eine Substitution des Laparotomie-bedingten Flüssigkeitsverlustes.

Zur Operationsphase II:

Die Laparotomie erfolgte durch einen transversalen Schnitt medial zwischen Xyphoid und Symphyse. Das Abdomen wurde mittels zweier Haken offengehalten. Zum Schutz vor Austrocknung wurden mit Ausnahme der Leber die übrigen Abdominalorgane mit Cuprophanfolie abgedeckt. Anschließend erfolgte die Durchtrennung der Leberhaltebänder zum Zwerchfell, zur Abdominalwand und zum Magen. Nach stumpfer Darstellung des Leberhilus und der portalen Trias erfolgte die Kanülierung des Ductus choledochus zur ständigen Ableitung von Galle. Entsprechend der modifizierten Technik nach Kawano et al (1989) wurden die selektiv zum linken und medianen Leberlappen führenden Arterien- und Pfortaderäste freipräpariert und zusätzliche arterielle Äste, die vom Oesophagus zum linken Leberlappen führen, koaguliert. Es folgte die selektive, reversible Abklemmung der dargestellten Leberhilusgefäße, d.h. ohne Okklusion der Gallengänge, mittels mikrovaskulärer Gefäßclips nach Biemer (Aeskulap, Tuttlingen, Deutschland), was in einer Ischämie des linken Leberlappens und medialer Teile des mittleren Lappens resultiert. Nachdem die restlichen Lappen der Leber keiner Ischämie unterzogen wurden, konnte eine portale Hypertension mit Kongestion im mesenterialen Strombett und nachfolgender systemischer Hypotension vermieden werden (Meer 1976). Durch Entfernen der Gefäßclips von Leberarterie und Pfortader nach Ablauf der Ischämiezeit, wurde die Reperfusion eingeleitet. Während der einstündigen Ischämiephase und der gesamten Reperfusionszeit wurde die Leber mit Cuprophanfolie und Kompressen abgedeckt, um hepatische Schäden durch Austrocknung und zu großen Lichteinfall zu verhindern. Nach entsprechender Ischämie- und Reperfusionszeit folgte die intravitale Fluoreszenzmikroskopie des linken Leberlappens durch Auslagerung auf eine speziell dafür

konstruierte Haltevorrichtung. Die Haltevorrichtung bestand aus einer 4 x 5 cm großen, rechteckigen Grundplatte, die an einem feineinstellbaren Schwenkarm befestigt war. Der Grundplatte aufgelagert war eine bis zu 0,5 cm dicke Schicht Modelliermasse, um der individuellen Anatomie des Leberlappens gerecht werden zu können und so einer mechanischen Obstruktion der afferenten und efferenten Gefäße entgegenwirken zu können. Der Leber aufgelagert war ein Deckglas (24mm x 32mm) zum Schutz vor Austrocknung und der Einwirkung atmosphärischen Sauerstoffs. Diese Methode ermöglichte eine in vivo Beurteilung der hepatischen Mikrozirkulation mittels der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie (Menger 1991c).

2.2.2 Ischämische Präkonditionierung

Der lobulären Leberischämie von 60 Minuten wurde eine jeweils 10-minütige Ischämie- und Reperfusionphase vorangeschaltet. Für dieses Zeitfenster entschieden wir uns, da es sich in vorangegangenen Studien, sowohl in vivo mit warmer Ischämie als auch in vitro mit prolongierter Hypoxie, als das günstigste erwiesen hatte (Peralta 1998, Carini 2000). Es wurden dafür entsprechend der zuvor beschriebenen Methode die zum linken und medialen ziehenden Hilusgefäße durch mikrovaskuläre Gefäßclips (Aeskulap, Tuttlingen) für 10 Minuten okkludiert und im Anschluss für 10 Minuten wiedereröffnet. Nach dieser Präkonditionierung erfolgte dann wie in den Kontrollgruppen eine 60-minütige Ischämie-Phase mit nachfolgender Reperfusion von 120 Minuten Dauer.

2.3 Experimentelle Gruppen

Die Experimente zur Ischämischen Präkonditionierung (IPC) wurden an Zucker-lean-Ratten und Zucker-fat-Ratten in jeweils drei Untergruppen durchgeführt. Diese Untergruppen gliederten sich bei den normalen und auch den verfetteten Tieren in eine scheinoperierte (=Sham-) Gruppe (SH), eine Kontrollgruppe (KO) und eine Interventionsgruppe mit Ischämischer Präkonditionierung (IP). Die heterozygoten Ratten mit schlankem Phänotyp (=lean) und somit normalen Leber wurden in der Folge als „ZL“ bezeichnet für Zucker-lean, homozygote Tiere mit verfettetem Phänotyp und einer steatotischen Leber als „ZF“ für Zucker-fat.

Die Tiere der Sham-Gruppen wurden dem normalen Operationsprogramm unterzogen, mit der Ausnahme, dass ihre Leber nach Laparatomie keiner Ischämie unterzogen wurde. Dadurch erhielten wir die Ausgangs- und Vergleichswerte für sämtliche zu messenden Parameter, also den Gallefluss, sämtliche Serumwerte, die Intravitalmikroskopie und die Elektronenmikroskopie.


Die Kontrollgruppe erhielt zusätzlich eine 60-minütige Ischämiephase, welcher bei der Interventionsgruppe mit Ischämischer Präkonditionierung eine jeweils 10-minütige Ischämie- und Reperfusionphase vorangeschaltet war. Die Wahl der Dauer der Ischämiezeit von 60 Minuten und einer Reperfusionzeit von 120 Minuten erfolgte einerseits aufgrund der Auswertung anderer experimenteller Arbeiten auf diesem Gebiet (Peralta 1999) und andererseits aufgrund der bereits vorliegenden Forschungsergebnisse der Arbeitsgruppe um Dr. Schauer (Schauer 1999, 2004a und 2004b). Auch die Zeiten der Ischämischen Präkonditionierung wurden unter Berücksichtigung derselben Experimente auf jeweils 10 Minuten Ischämie und anschließende Reperfusion festgelegt.

Gruppe:	<u>ZL-SH</u>	<u>ZL-KO</u>	<u>ZL-IP</u>	<u>ZF-SH</u>	<u>ZF-KO</u>	<u>ZF-IP</u>
Ischämie (60 Min):	nein	ja	ja	nein	ja	ja
Reperfusion (120 Min):	nein	ja	ja	nein	ja	ja
Ischämische Präkonditionierung:	nein	nein	ja	nein	nein	ja
Anzahl der Tiere:	6	6	6	6	6	6

Tab. 2.1: Anzahl der verwendeten Tiere in den einzelnen Gruppen und den jeweils durchgeführten Interventionen.

2.4 Experimentelles Protokoll

Zur Standardisierung der Versuche wurden die einzelnen Versuchsgruppen streng nach einem festgelegten Protokoll durchgeführt.



Ludwig-Maximilians-Universität München

Ischämische Präkonditionierung „fat“ Versuchsbezeichnung: **ZF-IP-**

Vorsuchsausschuss: Dr. Schauer
Versuchsreihe: 43/2000

Klinikum Großhadern
Institut für Chirurgische Forschung
Direktor: Prof. Dr. med. Des. h.c. K. Meißner

Datum: _____ Tier-Nr.: _____ Ratte: Zucker-fat. Geschlecht: ♂
 Gewicht (OP-Tag): _____ Nüchtern ab: _____ Operateur: _____ Assistent: _____

	Phase I <i>Preparation</i>	Phase II <i>0-Werte</i>	Phase III <i>Ischämische Präkonditionierung</i>		Phase IV <i>Ischämie</i>	Phase V <i>Reperfusion</i>	Phase VI <i>IRI</i>	Phase VII <i>Leberteilresektion</i>	
Zeitachse (Min.)		0 - - - - 15	0 - - - - 10	0 - - - - 10	0 - - - - 30 - - - - 60	0 - - - - 15 - - - - 30	- - - - - 60	- - - - - 90 - - - - 120	
Ereignisachse		G-1, S-0			G-2 G-3	S-1 G-4, S-2	G-5, S-3	G-6 G-7, S-4 (2x)	
MAP (mm Hg)									
Lebergewicht (g) und -teilresektion (am Versuchsende)								ε ZF-IP- -IL <input type="checkbox"/> ZF-IP- -LR <input type="checkbox"/>	
Blutabnahmen (S-0 bis S-4) (± S-4 nur Serum)		ZF-IP- -S0 <input type="checkbox"/> ZF-IP- -Sulf0 <input type="checkbox"/> ZF-IP- -NEM0 <input type="checkbox"/>	ZF-IP- -S1 <input type="checkbox"/> ZF-IP- -Sulf1 <input type="checkbox"/> ZF-IP- -NEM1 <input type="checkbox"/>	ZF-IP- -S2 <input type="checkbox"/> ZF-IP- -Sulf2 <input type="checkbox"/> ZF-IP- -NEM2 <input type="checkbox"/>	ZF-IP- -S3 <input type="checkbox"/> ZF-IP- -Sulf3 <input type="checkbox"/> ZF-IP- -NEM3 <input type="checkbox"/>	ZF-IP- -S4 <input type="checkbox"/> ZF-IP- -Sulf4 <input type="checkbox"/> ZF-IP- -NEM4 <input type="checkbox"/>			
Gallekollection (G-1 bis G-7)			ZF-IP- -G1 <input type="checkbox"/>	ZF-IP- -G2 <input type="checkbox"/>	ZF-IP- -G3 <input type="checkbox"/>	ZF-IP- -G4 <input type="checkbox"/>	ZF-IP- -G5 <input type="checkbox"/>	ZF-IP- -G6 <input type="checkbox"/>	ZF-IP- -G7 <input type="checkbox"/>
Gallekolektor									
Gallengew. (g)									
Rhodamin -6 G							<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein		
Na-Fluoreszein							<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein		
Latex - beads							<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein		
Besonderheiten / Verwendete Medikamente:									
Datum:	Unterschrift:								

Abb. 2.1: Experimentelles Protokoll, hier das für die Interventionsgruppe mit ischämischer Präkonditionierung bei Zucker-Fat-Ratten (ZF-IP).

Nach Abschluss der chirurgischen Präparation (siehe 2.2.1) wurden in einer kurzen Stabilisierungsphase der Hämatokrit-Wert und die Blutgas-Werte überprüft (s. 2.5.1).

Bei Einhaltung der Normwerte wurde weiter nach dem Protokoll verfahren und mittels der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie die hepatische Mikrozirkulation (siehe hierzu 2.5.1) untersucht sowie nach Applikation von fluoreszierenden Latexpartikeln die Funktion der Kupfferschen Sternzellen analysiert (siehe 2.5.3). Halbstündig wurden sowohl während Ischämie- als auch Reperusionsphasen Blutproben für die Glutathionmessung entnommen und Gallekolektoren ausgetauscht. Nach Ablauf der Reperusionszeit von zwei Stunden wurden die Versuche durch die Entnahme von Anteilen der Leber für licht- und elektronenmikroskopische Analysen beendet. Exitus durch Entblutung unter Vollnarkose.

2.5 Parameter und Meßmethoden

2.5.1 Systemische Hämodynamik

Der arterielle Mitteldruck (MAP) wurde über druckstabile Katheter auf einen Statham 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. Darüber erfolgte in regelmäßigen Abständen die Übertragung von Druckwerten in das Versuchsprotokoll.

Zur Bestimmung des arteriellen Sauerstoff- und Kohlendioxidpartialdruckes (p_aO_2 , p_aCO_2), des Säure-Base-Status, des Sauerstoffgehaltes und der Sauerstoffsättigung wurden arterielle Blutproben durch den arteriell liegenden Katheter gewonnen und in einem Blutgasanalysator (ABL 300, Radiometer Copenhagen, Dänemark) bestimmt.

2.5.2 Hepatische Mikrozirkulation: Intravitale Fluoreszenzmikroskopie (IVM)

Für die Beurteilung der sinusoidalen Perfusion der Leber und Leukozytendarstellung wurde den Tieren 30 Minuten vor Beginn der Mikroskopie zur negativen Kontrastverstärkung Natrium-Fluoreszein (1 $\mu\text{mol/kg}$, Merck AG, Darmstadt) und Rhodamin 6G (0,1 $\mu\text{mol/kg}$, Merck AG, Darmstadt) intravenös injiziert. Anschließend erfolgte die Auslagerung des linken Leberlappens auf eine speziell dafür konstruierte Haltevorrichtung. Die Haltevorrichtung bestand aus einem mehrgelenkigen und dadurch fein justierbaren Schwenkarm, an dem eine 2 x 3 cm große rechteckige Auflagefläche befestigt war. Zwischen der Platte und dem Leberlappen verhinderte eine spezielle Modelliermasse die mechanische Obstruktion der afferenten und efferenten Gefäße und konnte aufgrund ihrer guten Elastizität den anatomischen Gegebenheiten der jeweiligen Leber angepasst werden. Die nun ausgelagerte Leber wurde mit einem runden Deckglas (24mm x 32mm) vor Austrocknung und der Einwirkung des atmosphärischen Sauerstoffs geschützt. Anschließend konnte die Intravitalkroskopie unter ständiger Kontrolle der Vitalparameter unter einem Leitz-Orthoplan-Fluoreszenz-Mikroskop (Leitz, Wetzlar) nach der Epi-Illuminationstechnik durchgeführt werden (*Abb.2.2*).

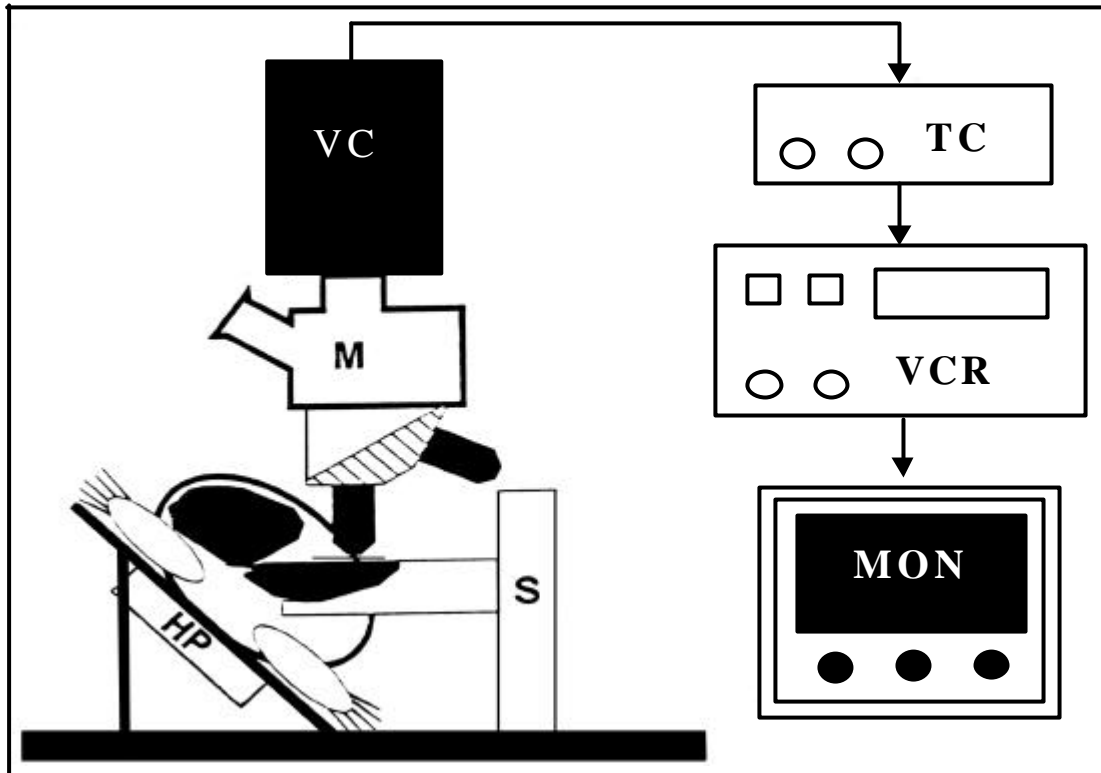


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der Intravital-Mikroskopie. Während der rechte und mittlere Leberlappen in situ verblieben, wurde der linke Leberlappen aus dem Situs heraus luxiert, so daß die untere Fläche oben zu liegen kam. HP=Heizplatte, M=Fluoreszenzmikroskop, VC=Video-Kamera, TC=Videozeitgenerator, VCR=Videorekorder, MON=Monitor, S=Schwenkarm.

Die Auflichtbeleuchtung erfolgte mit einer 100 W Quecksilber Hochdrucklampe. Das Ploemo-Pak-Illuminatorsystem (Leitz, Wetzlar) war mit den Filterblöcken $L_1/3$, N_2 und L_3 ausgestattet. Das mit den Wellenlängen 450-490 nm für Natrium-Fluoreszein und 530-560 nm für Rhodamin emittierte Licht wurde bei 525 bzw. 580 nm gefiltert.

Die Bilder des mikrovaskulären Strombettes wurden unter Verwendung einer CCD (charge coupled device)-Kamera (FK 6990, Prospective Measurements Inc., San Diego, CA, USA) nach Einblendung eines Videozeitgenerators (VTG 33, For.A Company Ltd., Tokyo, Japan) auf Videoband (S-VHS Panasonic AG 7330, Matsushita Electric Ind., Tokyo, Japan) aufgezeichnet. Als Objektive dienen für Übersichtsaufnahmen ein Leitz Fluotar 10/0.30 (Vergrößerung/numerische Apertur) und zur Beurteilung der sinusoidalen Perfusion und Leukozyten ein Wasser-Immersionsobjektiv Fluotar 25/0,60, wodurch auf einem 330 mm Monitor (PVM 1442 QM, Sony, München) 280fache bzw. 700fache Vergrößerungen erzielt werden konnten.

Zur späteren Auswertung der sinusoidalen Perfusion und Leukozytenadhärenz wurden pro Tier 10 Leberazini nach dem Zufallsprinzip ausgewählt und für 20 Sekunden aufgezeichnet. Für die

Beurteilung des Leukozytenverhaltens in den postsinusoidalen Venolen wurden von diesen ebenfalls 10 zufällig ausgewählt und aufgenommen.

Die Auswertung erfolgte off-line an Videoeinzelbildern am Computer unter Verwendung des CAMAS-Systems (=Cap-Image-System, Version 5.03; ©1995 C. Zeintl).

Die Abgrenzung der Azini erfolgte über vorgefertigte Schablonen, die eine Einteilung in die zonale Gliederung der Azini in periportal, midzonal und perizentral erlaubte (Abb. 2.3). Dadurch konnte eine Beurteilung der sinusoidalen Perfusionsrate innerhalb dieses Azinus erfolgen durch die Bestimmung der Anzahl der perfundierten Sinusoide und in Prozent zu allen sichtbaren Sinusoiden angegeben werden.

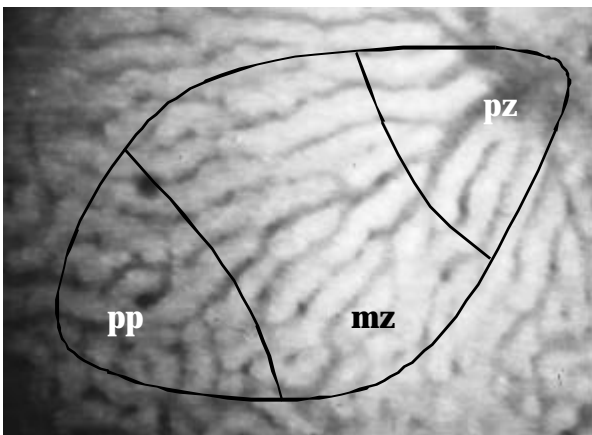


Abb. 2.3: *Intravitalmikroskopische Darstellung der zonalen Gliederung eines Leberazinus in der Mikrozirkulation unter Verwendung einer Schablone. Die Einteilung erfolgte in periportal (pp), midzonal (mz) und perizentral (pz) (700-fache Vergrößerung).*

Zur Messung der durchschnittlichen Sinusoidweite wurden in jedem Tier die Durchmesser sämtlicher midzonaler Sinusoide aller aufgenommenen Azini in μm bestimmt.

Aussagen über die permanente Adhärenz („sticking“) der polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) am sinusoidalen Endothel konnten über die Bestimmung der Anzahl der über den Beobachtungszeitraum von 20 Sekunden permanent adhärennten Leukozyten innerhalb der drei verschiedenen Segmente des Azinus gemacht werden. Für die Beurteilung der PMN-Adhärenz an postsinusoidalen Venolen wurden alle Leukozyten gezählt, die sich in den 20 Sekunden permanent am postsinusoidalen Endothel befanden. Bei den Venolen wurde zusätzlich noch die zeitweise Adhärenz („rolling“) als Anzahl der Leukozyten gemessen, die während der 20 Sekunden Beobachtungszeit nur vorübergehend adhärennt waren. Die adhärennten und rollenden Leukozyten in den postsinusoidalen Venolen wurden quantifiziert, indem die Anzahl der Sticker pro mm^2 Endotheloberfläche berechnet wurde [$p \times \text{Durchmesser} \times \text{Länge des Gefäßes}$] und in n/mm^2 angegeben.

Zu der präziseren Messung von Länge und Durchmesser der postsinusoidalen Venolen und von den Sinusoidweiten wurde das CAMAS-System genutzt.

2.5.3 Funktion der Kupfferschen Sternzellen (KC)

2.5.3.1 Applikation von fluoreszierenden Latexpartikeln

Im Anschluss an die Auswertung der Sinusoide und postsinusoidalen Venolen erfolgte die einmalige Gabe von fluoreszierenden Latexpartikeln (Polysciences Inc., Warrington, PA, USA) zur Aktivitätsbestimmung der Kupfferschen Sternzellen (KC) in der Leber. Die 1,1 µm im Durchmesser großen Latexpartikel („beads“) wurden im Bolus über den Verweilkatheter in die Arteria carotis communis injiziert in einer Konzentration von 3×10^8 /kg KG in 1 ml steriler 0,9%iger NaCl-Lösung. Das entspricht bei einem Körpergewicht von 200 g einer Absolutzahl von etwa 60 Millionen Partikeln. Aufgrund ihrer Fluoreszenz konnten die applizierten Latexpartikel mittels der intravitralen Fluoreszenzmikroskopie visualisiert und zu Auswertungszwecken verwendet werden. So konnte die Phagozytose-Aktivität der KC anhand der zirkulierenden Latexpartikel beurteilt werden.

2.5.3.2 Beurteilung der Phagozytose-Aktivität der Kupfferschen Sternzellen

Die Analyse der Phagozytose-Aktivität von Kupfferschen Sternzellen ist möglich, da die injizierten Latexpartikel aufgrund ihrer Größe vornehmlich von Kupfferschen Sternzellen aufgenommen werden (Baatz et al. 1995) bzw. an diese adhären (Dan and Wake 1985, Praaning-Van Dalen und Knoock 1982). Hierzu wurde für einen Zeitraum von 5 Minuten nach Injektion der Partikel in 10-15 Gesichtsfeldern für jeweils 10 Sekunden die Anzahl der freifließenden, also nicht adhären Latexpartikel, in Prozent aller im Gesichtsfeld sichtbaren Latexpartikeln bestimmt.

2.5.4 Hepatozelluläre Integrität

2.5.4.1 Leberenzyme

Als Maß der hepatozellulären Integrität diente die Bestimmung der leberspezifischen Enzyme Aspartat-Aminotransferase (AST/GOT) und Alanin-Aminotransferase (ALT/GPT).

Am Ende eines Versuches erfolgte die Probengewinnung, wobei circa 500 µl arterielles Blut in EDTA-beschichteten Probengefäßen abgenommen wurde. Die Blutproben wurden anschließend bei 4°C und 3000 Umdrehungen/ min für 10 Minuten zentrifugiert (Rotanta/K, Hettich, Tuttlingen) und

das so gewonnene Alliquot (EDTA-Plasma) bis zum Zeitpunkt der Bestimmung bei -80°C eingefroren. Die Enzym-Aktivitäten wurden von Dr. med. Mühlbeyer im Institut für klinische Chemie des Klinikums Großhadern in München spektrophotometrisch (Eppendorf PCP 6121, Eppendorf/Gerätebau Netheler+Hinz, München) entsprechend der "optimierten Standard-Methode" der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie (Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie 1970, 1972) bei einer Wellenlänge von 334 nm bestimmt.

2.5.4.2 Leberhistologie

Zur Beurteilung des Verfettungsgrades in der Leber heterozygoter und homozygoter Zucker-Ratten wurden zum Versuchsende Gewebeproben aus der Leber entnommen. Die Fixation erfolgte durch sofortiges Einlegen der Proben in 10%iger Formalinlösung. Im Anschluss wurden die Gewebeproben für 30 Minuten fließend entwässert und für 12 Stunden in 70%igem Ethanol eingebettet. Mit einer aufsteigenden Ethanolreihe wurde danach eine erneute Entwässerung durchgeführt und in den Intermedien Methylbenzoat und Benzol für vier Stunden inkubiert. Nach 24-stündiger Einlage in Paraffin erfolgte die Einbettung der Proben ebenfalls in Paraffin.

Unter Verwendung eines Schlittenmikrotoms (Mod Hn 40, Fa. Reichert-Jung/ Leica, München) konnten letztlich $3\ \mu\text{m}$ dünne Schnitte der Gewebeproben produziert werden. Die Anfärbung gelang in üblicher Weise mit Hämatoxylin-Eosin (Fa. Merck, Darmstadt). Auf einem Objektträger fixiert konnten die Leberschnitte lichtmikroskopisch durch einen von dem Projekt unabhängigen Pathologen des pathologischen Institutes der Ludwig-Maximilians-Universität München ausgewertet und beurteilt werden. Der Pathologe bekam mit den Gewebeproben keinerlei Information über die genetische Abstammung des Tieres, um einen statistischen Fehler zu vermeiden.

2.5.4.3 Elektronenmikroskopie der Leber

Zur Darstellung von ultrastrukturellen Veränderungen im Lebergewebe nach Ischämie und Reperfusion wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen durchgeführt. Hierfür wurde am Ende des Versuches die Aorta abdominalis mit einem zusätzlicher Katheter (PE 50) kanalisiert, nachdem oberhalb des Truncus coeliacus ein Gefäßclip eingesetzt worden war. So konnte das Lebergewebe über die Aorta zunächst mit steriler NaCl-Lösung gespült und anschließend mit Karnovsky-Puffer (2 ml Glutaraldehyd 25%, 5 ml Paraformaldehyd 4%, 3 ml Sörensen-Puffer) retrograd perfusionsfixiert werden. Zur Volumenentlastung erfolgte eine Inzision in die Vena cava inferior

und in die Seitenränder der Leberlappen. Um Perfusionsartefakte zu vermeiden, wurde der Perfusionsdruck kontrolliert unter 70mmHg gehalten (Frenzel 1976).

Anschließend wurden aus dem fixierten linken Leberlappen etwa 1 x 1 x 3 mm große Gewebeproben entnommen und nach Osmierung und Dehydrierung in Araldit-Harz eingebettet. Nach Aushärtung über 24h bei 60°C wurden 70nm-Ultradünnschnitte (Ultracut, Reichert-Jung/Leica, München) angefertigt. Nach Kontrastierung der Schnitte mit Bleicitrat und Uranylacetat erfolgte die elektronenmikroskopische (EM 900, Zeiss, Oberkochen) Untersuchung bei 80 kV durch Frau Dr. med. Leiderer.

2.5.5 Hepatozelluläre Funktion

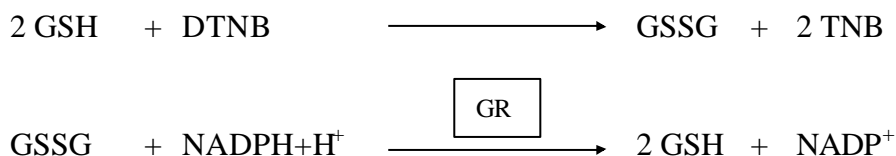
Als Parameter der hepatozellulären Exkretionsfunktion galt der Gallefluss, der durch einen Verweilkatheter (PE 50, Portex, Hythe, England) im Ductus choledochus kontinuierlich in Eppendorfgefäße abgeleitet wurde. Die in einem definierten Zeitraum (alle 30 Minuten) sezernierte und gesammelte Galle wurde anschließend gewogen und auf das Leberfeuchtgewicht bezogen [$\mu\text{l} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$]. Die Gesamtleber wurde zu diesem Zweck nach Beendigung des Versuchs entnommen und gewogen. Um den Verlauf während Ischämie und Reperfusion besser darstellen zu können, wurde der Gallefluß in Prozent zu einem vor der Ischämie gemessenen Ausgangswert (Messzeit: 15 Minuten) gesetzt.

2.5.6 GSH- und GSSG-Bestimmung im Plasma

Zur Bestimmung der Entstehung von Sauerstoffradikalen und anderen Oxidantien als wichtige Mechanismen bei der Pathogenese von Ischämie- und Reperfusionsschäden wurde aus dem Plasma das Gesamt-Glutathion (GSH) und das Glutathiondisulfid (GSSG) bestimmt.

2.5.6.1 Gesamt-Glutathion

Die Summe des oxidierten (GSSG) und reduzierten Glutathions (GSH) wurde dabei durch einen kinetischen Test bestimmt (Tietze F, 1969), der auf folgender Reaktion basiert:



Die Geschwindigkeit der Extinktionszunahme während der nichtenzymatischen Reduktion von 5,5'-Dithiobis(nitrobenzoesäure) (DTNB) durch GSH wurde bei 405nm aufgezeichnet. Das bei dieser Reaktion entstandene GSSG wurde enzymatisch durch die Glutathion-Reduktase (GR) reduziert, so dass die Reaktionsgeschwindigkeit der DTNB-Reduktion konstant blieb.

Testansatz:

- 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)

5 Minuten nach Beginn der Reaktion wurden dem Testansatz 50 µl GSH-Standard (4µM) zugeführt, um Testhemmungen auszuschließen.

2.5.6.2 Glutathiondisulfid (GSSG)

Sowohl im Leberperfusat als auch im Blutplasma beträgt das Verhältnis von GSH zu GSSG ungefähr 10:1 (Akerboom et al. 1981). Bei der Bestimmung der hepatischen GSSG-Freisetzung müssen deswegen Maßnahmen zur Vermeidung einer spontanen GSH-Autoxidation zu GSSG erfolgen. Hierzu dient die von Lauterburg beschriebene Methode der GSH-Konjugation mit N-Ethylmaleimid (NEM) (Lauterburg 1984a). 200 µl Blut wurden unmittelbar nach der Abnahme mit 200 µl NEM-Lösung (10 mM) versetzt. Durch die spontane Reaktion zwischen GSH und NEM zu einem Glutathionkonjugat wurde GSH gebunden und eine GSH-Autoxidation zu GSSG verhindert. Überschüssiges NEM wurde durch Trennung über Sep-Pak C₁₈ Kartuschen (Waters, Framingham, Ma, USA) eliminiert. Sep-Pak C₁₈ Kartuschen wurden hierzu mit 10 ml absolutem Methanol und 10 ml Aqua bidest konditioniert. Anschließend wurden 200 µl NEM-Plasma aufgetragen und mit 1 ml Phosphat/EDTA Puffer (pH 7,4) eluiert. Die GSSG-Konzentration der NEM-freien Eluate wurde mit dem beschriebenen kinetischen Test ermittelt. Die GSSG-Wiederfindung betrug 90%.

Ein Anstieg der Plasma-GSSG wird aufgrund oben dargestellter Formel als indirekter Parameter für oxidativen Stress gewertet (Jaeschke 1990a und 1991b).

2.5.6.3 Glutathion (GSH)

Die GSH-Konzentration wurde aus der Differenz zwischen Gesamt-Glutathion und Glutathiondisulfid-Konzentration (2.5.6.2) berechnet.

2.5.6.4 Bestimmung des intrazellulären Gesamt-Glutathion-Gehaltes

Neben der Bestimmung von GSH und GSSG im Plasma wurde auch der intrazelluläre Gesamt-Glutathion-Gehalt im Lebergewebe bestimmt. Hierfür wurde die Leber unmittelbar zum Versuchsende nach Ablauf der 120-minütigen Reperfusionphase in wenige millimeter kleine Würfel zerstückelt und in Stickstoff fixiert, bevor sie bei -80°C bis zu ihrer Auswertung gelagert wurden. Für die Auswertung 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 $5000 \times g$ 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 (siehe auch 2.5.6.1) 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.

2.6 Statistische Analyse

Sämtliche Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Zur Prüfung der Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen wurden t-Test und ein geeigneter Paarvergleich (Mann Whitney U-test) durchgeführt. Bei Vergleichen von mehr als zwei Gruppen wurde die „one-way ANOVA“-Varianzanalyse angewendet. Ein Unterschied galt dann als signifikant, wenn die Nullhypothese mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5% ($p < 0,05$) verworfen werden konnte. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des kommerziell erhältlichen Statistikprogrammes SigmaStat (Jandel Corp., San Rafael, CA, USA).

III: Ergebnisse

Zur besseren Übersicht werden zunächst im Kapitel 3.1 die Sham- und die Kontrolltiere jeweils der heterozygoten und homozygoten Zucker-Ratten einander vergleichend gegenübergestellt. In der Folge werden dabei die heterozygoten Tiere als „lean“ bezeichnet, die homozygoten als „fat“ aufgeführt.

Im Anschluss werden im Kapitel 3.2 die Ergebnisse der Interventionsgruppe mit Ischämischer Präkonditionierung im direkten Vergleich zwischen heterozygoten und homozygoten Tieren dargestellt.

3.1 Charakterisierung des Fettlebermodells

Im folgenden wird ein Vergleich zwischen heterozygoten und homozygoten Zucker-Ratten aufgeführt, um Unterschiede und Gemeinsamkeiten zwischen Ratten mit normalen und verfetteten Lebern aufzuzeigen. Hierzu werden jeweils die Sham- und Kontrollgruppen einander gegenübergestellt.

3.1.1 Systemische Hämodynamik

Der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) lag vor der Ischämie etwa zwischen 95 und 105 mmHg. Während in der kurzen IPC-Phase (10min/10min) so gut wie keine Veränderungen zu beobachten waren, ist ein geringer Anstieg des MAP zu Beginn der Ischämiephase auf Werte um die 110 mmHg zu erkennen. Bei Reperfusionbeginn fiel der MAP in allen Gruppen leicht ab, blieb aber jederzeit stabil. Zwischen den Gruppen gab es zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede.

3.1.2 Glutamat-Pyruvat-Transaminase/ Alanin-Amino-Transferase

Zur Beurteilung der hepatozellulären Integrität wurde die zum Versuchsende abgenommene plasmatische Aktivität der Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) herangezogen (siehe 2.5.4.1). Scheinoperierte Ratten wiesen hierbei zwischen den normalen, nichtverfetteten Lebern und den verfetteten Lebern keinen signifikanten Unterschied auf (ZL-SH $38,0 \pm 4,7$ U/l; ZF-SH: $45,2 \pm 7,4$ U/l).

Bei den Tieren, deren Leber einer 60-minütigen Ischämie und anschließend 120-minütigen Reperfusion ausgesetzt wurden, zeigte sich gegenüber den scheinoperierten Tieren sowohl bei den normalen Lebern als auch bei den steatotischen Lebern ein signifikanter Anstieg der GPT-Werte (ZL-KO: $210,4 \pm 51,17$ U/l; ZF-KO: $826,4 \pm 240,2$ U/l).

Dabei kommt es zu einem signifikant deutlichen Unterschied im direkten Vergleich der normalen mit der verfetteten Leber bei vergleichbarem Trauma durch Ischämie und Reperfusion ($p < 0,05$).

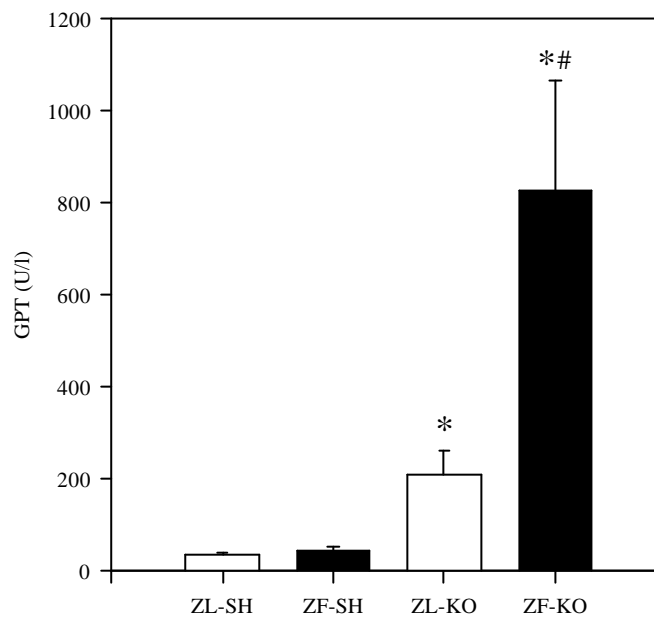


Abb. 3.1: Bei scheinoperierten Tieren zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen normalen (ZL-SH) und verfetteten Lebern (ZF-SH). Operierte Tiere entwickeln gegenüber den scheinoperierten Tieren eine signifikante Zunahme der Serum-GPT. Dabei stellt sich ein signifikanter Anstieg der GPT-Werte bei den verfetteten und operierten Lebern (ZF-KO) gegenüber den nichtverfetteten operierten (ZL-KO) dar.

$n =$ je 6; $MW \pm SEM$; * $p < 0,05$ vs. jeweilige SH; # $p < 0,05$ vs. ZL-KO.

3.1.3 Histologie

Das Ausmaß des Verfettungsgrades einer Leber ließ sich am deutlichsten histopathologisch nachweisen. Die Abbildung 3.2 zeigt das histologische Bild einer normalen, also nichtverfetteten Leber. Dem gegenüber steht in Abbildung 3.3 die Leber einer Zucker-fat-Ratte. Typisch sind hier die zahlreichen intrazellulären Fettvakuolen, die aufgrund der alkoholischen Ausspülung in der

Probenbearbeitung (siehe 2.5.4.2) als weiße Aussparungen in den Hepatozyten zu erkennen sind. Aufgrund der Zunahme des Zellvolumens erscheinen die Zellgrenzen verschwommen und das typische Bild des Leberazinus aus der Ordnung gebracht. Die Auswertung ergab eine Verfettung zwischen 30 und 60% und somit das Vorliegen eines moderat verfetteten Lebermodells.

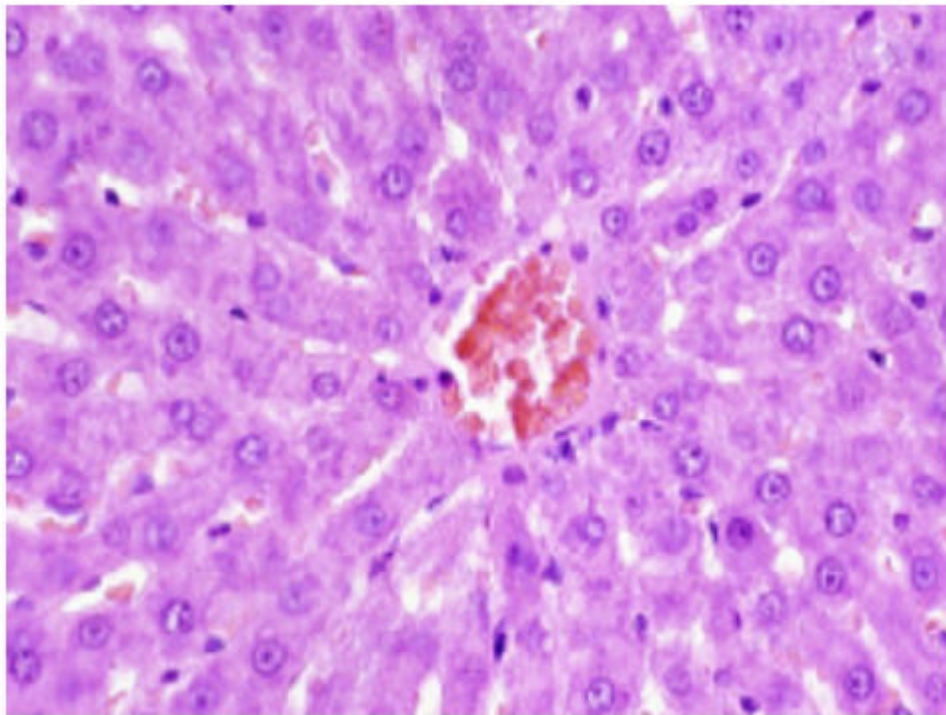


Abb. 3.2

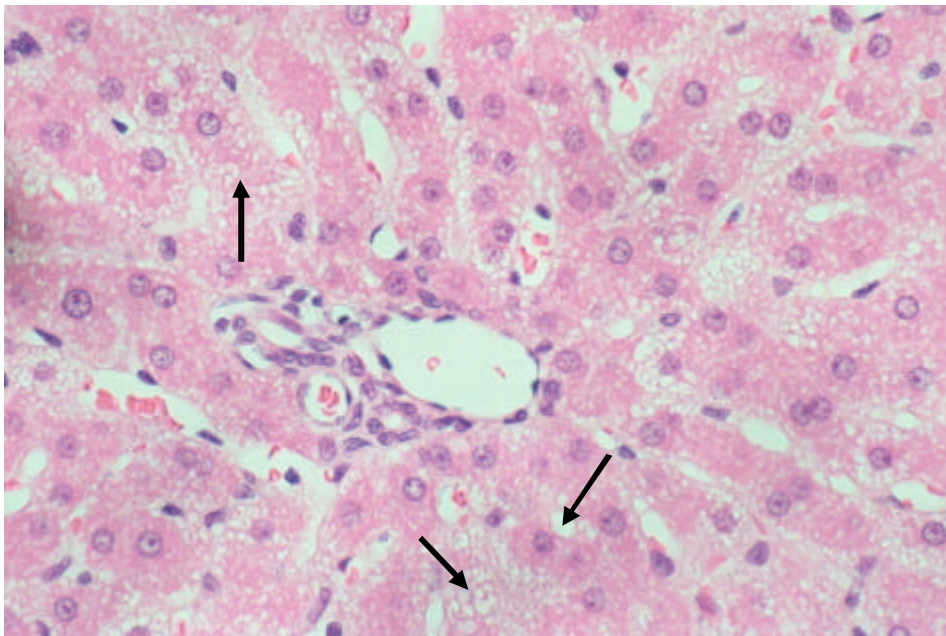


Abb. 3.2 und 3.3: Normale (Abb. 3.2) und verfette Leber (Abb. 3.3) in einer lichtmikroskopischen Aufnahme (HE-Färbung). Die Steatosis lässt sich anhand der Fettvakuolen in den Hepatozyten erkennen, deren Inhalt herausgelöst ist (Pfeile).

3.1.4 Elektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen die Ultrastruktur der normalen und der verfetteten Leber. Die Leber einer scheinoperierten Ratte vom heterozygoten Typ zeigt hierbei das normale Bild einer nicht geschädigten Leber (Abb. 3.4). Dagegen lässt sich bei nicht-operierten, verfetteten Lebern eine deutliche Zunahme von Peroxisomen und Lipidvesikeln beobachten (Abb. 3.5).

Die Auswirkung von IRS auf die normale, nicht-vorgeschädigte Leberzelle zeigt sich in einer vermehrten intrazellulären Vakuolenbildung und Peroxisomenzahl (Abb. 3.6). Den gleichen Bedingungen ausgesetzte vorgeschädigte Lebern ließen das Charakteristikum der Vakuolisierung fehlen. Dafür kam es neben einer gesteigert auftretenden Peroxisomenzahl zu einer Endothelzellschwellung, wie in Abbildung 3.7 zu sehen ist. Dieses Phänomen konnte weder in scheinoperierten Fettlebern noch in normalen Lebern gefunden werden, ob scheinoperiert oder Ischämie und Reperfusion ausgesetzt.

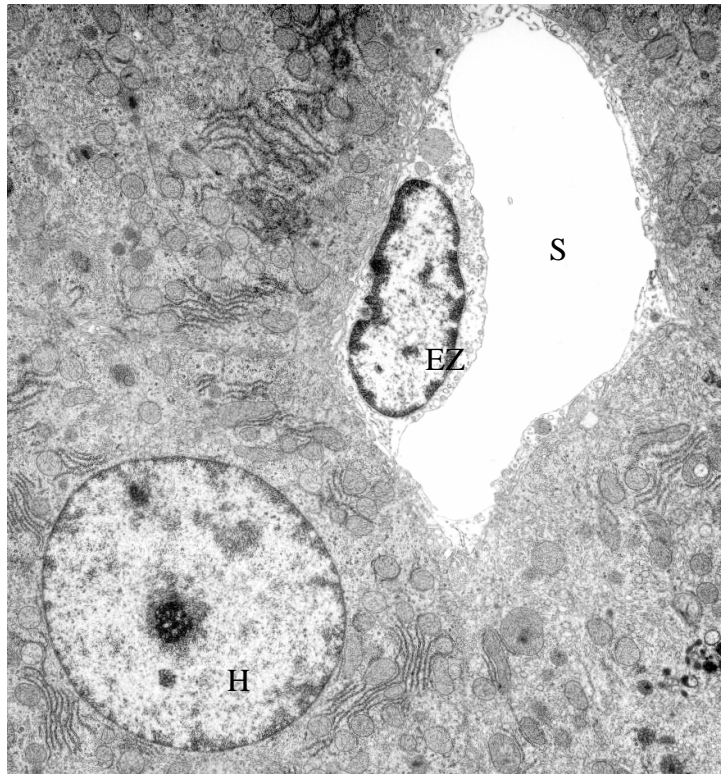


Abb. 3.4

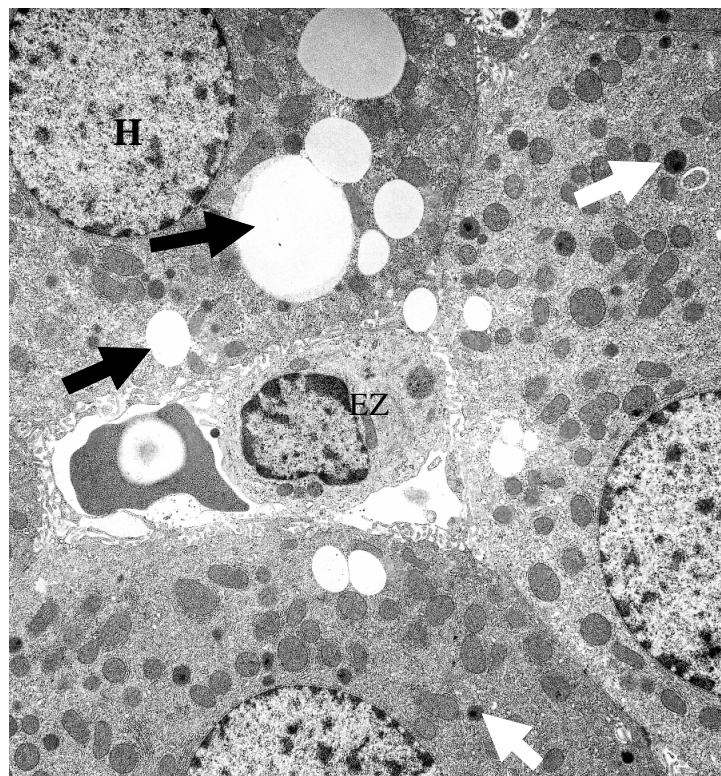


Abb. 3.5

Abb. 3.4 und 3.5: Die elektronenmikroskopische Aufnahme einer scheinoperierten, normalen Leber zeigt eine gewöhnliche Ultrastruktur der Zellen (Abb. 3.4). Nach I/R (Abb.3.5) zeigt sich in normalen Lebern eine deutliche Zunahme der Peroxisomenzahl (weisser Pfeil) und eine gesteigerte Vakuolisierung (schwarzer Pfeil) in den Hepatozyten. (H= Hepatozyt; EZ= Endothelzelle; S= Sinusoid)

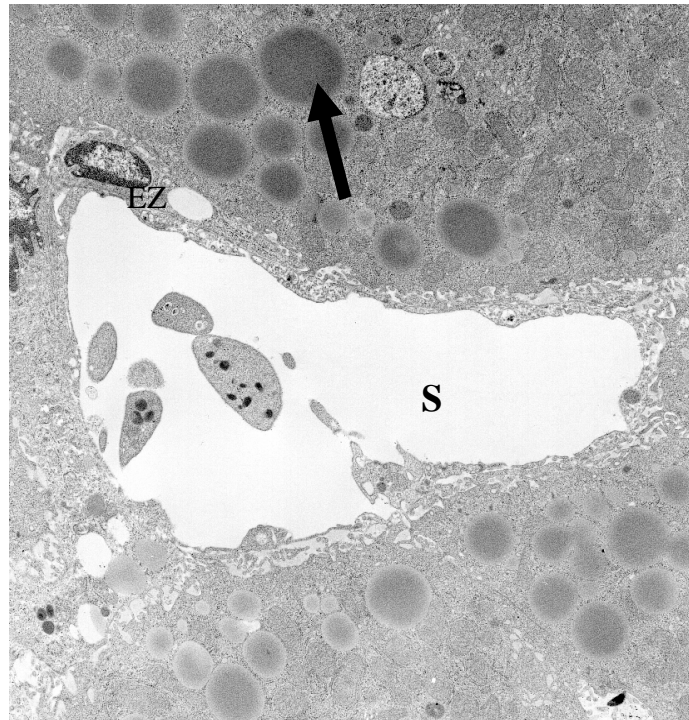


Abb. 3.6

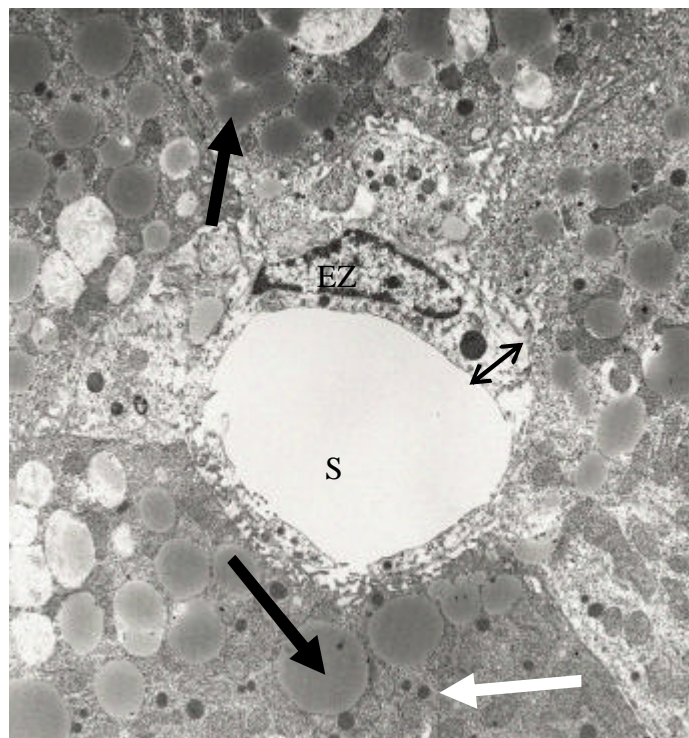


Abb. 3.7

Abb. 3.6 und 3.7: Elektronenmikroskopische Aufnahmen verfetteter Lebern: Auf beiden Aufnahmen zeigt sich die mikrovesikuläre Verfettung (schwarzer Pfeil). Im Gegensatz zu scheinoperierten Tieren (Abb. 3.6) konnte nach I/R eine Endothelzellschwellung (Doppelpfeil) nachgewiesen werden neben der erneuten Zunahme der Peroxisomenzahl (weisser Pfeil).

Es lassen sich also morphologische und funktionelle Unterschiede zwischen normalen und verfetteten Lebern aufweisen, sowie Abweichungen in der Intensität und Reaktion auf IRS. Im folgenden werden nun die protektiven Effekte der ischämischen Präkonditionierung auf diese beiden Gruppen einander gegenübergestellt.

3.2 Effekte Ischämischer Präkonditionierung auf die normale und die verfettete Leber

3.2.1 Hepatische Mikrozirkulation

In diesem Abschnitt sind die Ergebnisse der Auswertung der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie zusammengefasst (siehe 2.5.2). Dabei werden jeweils die Parameter der normalen (=heterozygoten) Tiere mit denen der verfetteten (=homozygoten) verglichen.

3.2.1.1 Sinusoidale Perfusionsrate

Wie unter 2.5.2 bereits beschrieben, wurde hier der prozentuale Anteil der nicht perfundierten hepatischen Sinusoide festgelegt.

Bei den normalen Tieren ließ sich ein dramatischer Anstieg der nichtperfundierten Sinusoide nach IRS von $29,3 \pm 1,9$ % gegenüber $7,5 \pm 1,5$ % bei den scheinoperierten Tieren beobachten. Ischämische Präkonditionierung mit einer jeweils 10-minütigen Ischämie- und Reperfusionperiode konnte den Anteil der nicht durchbluteten Sinusoide signifikant ($p < 0,05$) auf $14,1 \pm 1,7$ % senken.

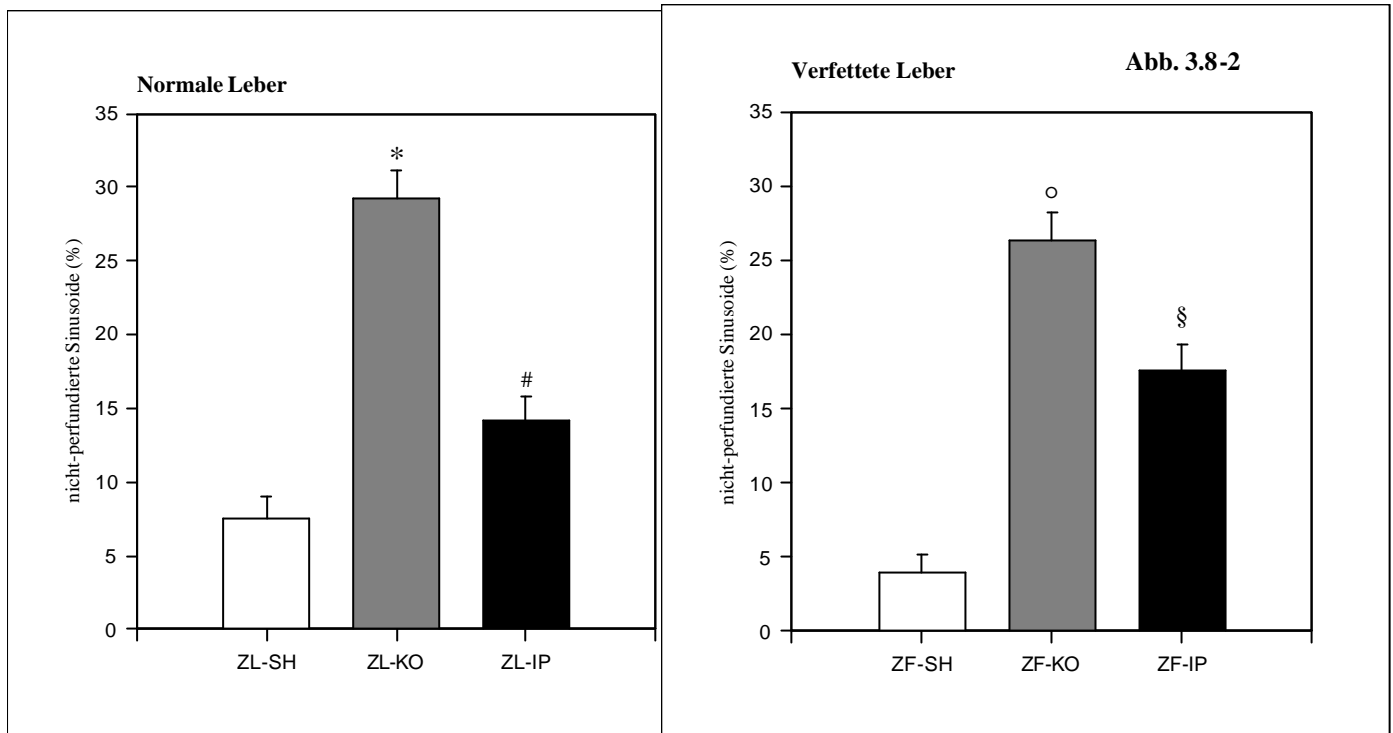


Abb. 3.8-1 und -2: Anteil nicht-perfundierter Sinusoide: Sowohl bei normaler als auch verfetteter Leber kommt es gegenüber den scheinoperierten Gruppen nach I/R zu einem deutlichen Anstieg nicht-perfundierter Sinusoide, welcher durch Ischämische Präkonditionierung signifikant reduziert werden kann.

MW±SEM; * $p < 0,001$ vs. ZL-SH; # $p < 0,05$ vs. ZL-KO; o $p < 0,01$ vs. ZF-SH; § $p < 0,05$ vs. ZF-KO.

Ähnliches ließ sich auch bei den verfetteten Tieren beobachten: Der Anteil nicht perfundierter Sinusoide in der scheinoperierten Gruppe ZF-SH betrug $3,9 \pm 1,2$ %. In der Kontrollgruppe ZF-KO wurden eindrucksvolle $26,3 \pm 1,9$ % nicht durchbluteter Sinusoide gefunden. Mit IPC ließ sich der Schaden der einstündigen Ischämie und zweistündigen Reperfusion dann signifikant ($p < 0,05$ vs. ZF-KO) auf $17,6 \pm 1,6$ % reduzieren.

Zwischen den beiden Gruppen ließ sich jedoch kein signifikanter Unterschied nachweisen. Der Anteil der nicht perfundierten Sinusoide und der Effekt der ischämischen Präkonditionierung war also unabhängig vom Verfettungsgrad.

Unter Berücksichtigung der zonalen Aufteilung des Leberazinus in periportal, midzonal und perizentral (siehe auch Abb. 2.3 im Kapitel 2.5.2) konnte ein gehäufter Sinusoidperfusionsausfall periportal beobachtet werden, der bei normalen als auch steatotischen Lebern nur gegenüber den perizentralen Feldern signifikant verändert war (siehe Tabelle 3.1).

Azinusfeld	Scheinoperierte Tiere		Kontrolltiere		Ischämische Präkonditionierung	
	Normal	Verfettet	Normal	Verfettet	Normal	Verfettet
periportal	12,4±1,3	6,8±1,1	33,6±2,5*	28,5±2,3*	20,6±1,5#	22,7±2,2#
midzonal	6,8±1,6	3,7±1,4	30,0±2,7*	27,8±2,5*	13,6±2,0#	18,9±1,7#
perizentral	3,3±2,3°	1,2±1,2°	24,4±1,8*°§	22,7±1,4*°§	8,2±1,9#+§	11,4±2,2#°§

Tab. 3.1: Zonale Gliederung der Perfusionsausfälle im Leberazinus bei normalen und verfetteten Lebern, Angaben in %.

MW±SEM; * $p < 0,05$ vs. jeweilige Sham-Gruppe; # $p < 0,05$ vs. jeweilige Kontrollgruppe; ° $p < 0,01$ vs. jeweiliges periportales Feld; § $p < 0,05$ vs. jeweiliges midzonales Feld; + $p < 0,001$ vs. periportal ZL-IP.

3.2.1.2 Lobuläre Leukozytenadhärenz

Die Sticker im Lobulus waren festgelegt als die Anzahl der permanent adhärennten bzw. emigrierten Leukozyten pro Leberlobulus.

Normale Lebern zeigten eine signifikante Zunahme ($p < 0,001$) der Leukozytenadhärenz bei der Kontrollgruppe mit $137,2 \pm 11,3$ Leukozyten pro Lobulus gegenüber $11,9 \pm 0,9$ bei den scheinoperierten Tieren. Durch IPC konnte diese Zunahme deutlich, und mit $p < 0,01$ signifikant, auf $40,9 \pm 3,3$ Sticker pro Leberlobulus reduziert werden (siehe auch Abb. 3.9-1).

Verfettete Lebern wiesen eine ähnlich starke Zunahme der Sticker pro Lobulus von der Sham-Gruppe (mit $26,1 \pm 3,1$) auf die Kontrollgruppe auf ($172,7 \pm 8,1$). Auch hier zeigte sich eine signifikante Reduzierung durch IPC auf $43,3 \pm 2,2$ (Abb. 3.9-2).

Im direkten Vergleich der beiden Versuchsgruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen normalen und verfetteten Lebern. Auch der durch IRS verursachte Schaden in den beiden Kontrollgruppen bzw. der protektive Effekt durch IPC in beiden Interventionsgruppen zeigte keinen signifikanten Unterschied.

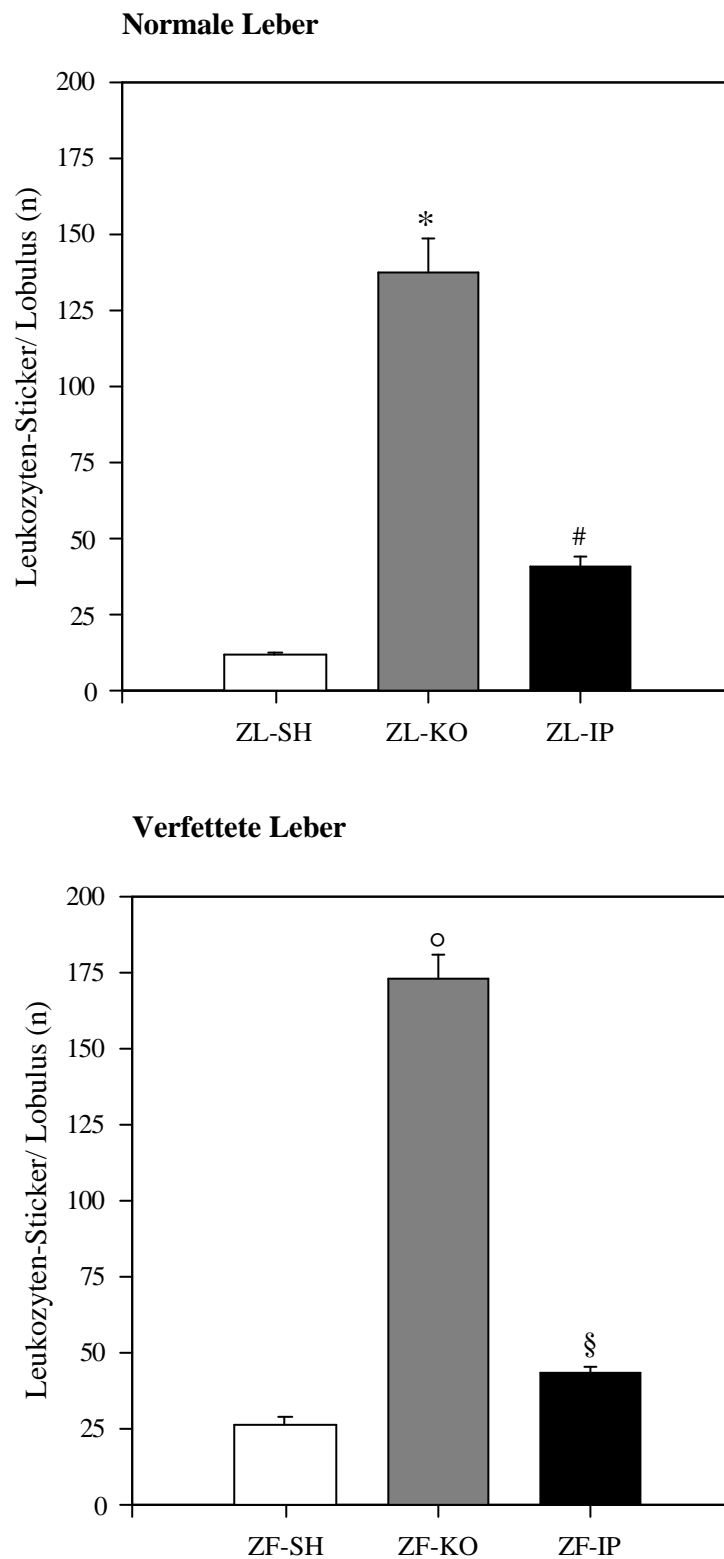


Abb. 3.9-1 und -2: Anzahl der Leukozyten-Sticker pro Leberlobulus bei normalen (-1) und verfetteten Lebern (-2): Durch die ischämische Präkonditionierung konnte in beiden Versuchsgruppen die Zahl der Sticker/ Lobulus signifikant reduziert werden.

*p bzw. °p<0,001 vs. jeweiliger SH-Gruppe. #p bzw. §p<0,01 vs. entsprechender Kontrollgruppe.

3.2.1.3 Leukozytenadhärenz in postsinusoidalen Venolen (PSV)

Wie unter 2.5.2 beschrieben, erfolgte in postsinusoidalen Venolen die Einteilung adhärenter Leukozyten in zwei Untergruppen, in Roller und Sticker. Die Gruppen definierten sich dabei über ihre Verbleibzeit bzw. Zeit der Adhärenz am PSV-Endothel.

3.2.1.3.1 Temporäre Leukozytenadhärenz in PSV (Roller)

Das Beobachtungsfenster für die Einteilung der Leukozyten in Roller und Sticker lag bei 20 Sekunden. Die Wertung eines Leukozyten als Roller erfolgte bei:

- Bewegung des Leukozyten entlang des Endothels einer PSV
- Vorzeitiger Lösung des Leukozyten vom Endothel innerhalb der beobachteten 20 Sekunden
- Adhärenz eines Leukozyten, wenn dies erst im Verlauf des Beobachtungszeitraums geschah.

In normalen Lebern ließ sich bei den scheinoperierten Tieren eine durchschnittliche Anzahl von 154 ± 23 Rollern feststellen. Dieser Wert lag bei den Kontrolltieren mehr als doppelt so hoch (650 ± 62). Durch IPC konnte die Anzahl der temporär adhärenenten Leukozyten wieder signifikant auf 522 ± 46 reduziert werden.

Bei verfetteten Tieren zeigten sich ähnliche Ergebnisse. Es konnte ein Anstieg von 236 ± 38 Rollern bei Sham-Tieren auf 613 ± 35 bei den Kontrolltieren beobachtet werden, der mit $p < 0,001$ signifikant war. Unter der Behandlung mit IPC wurde ein signifikanter Rückgang des Wertes der Kontrollgruppe auf 429 ± 39 Roller pro mm^2 endothelialer Oberfläche erhoben.

Zwischen normalen und verfetteten Lebern zeigte sich in den scheinoperierten (ZL-SH, vs. ZF-SH) und den kontrolloperierten Tieren (ZL-KO vs. ZF-KO) erneut kein signifikanter Unterschied. Auch der Effekt der ischämischen Präkonditionierung war in normalen und verfetteten Lebern nicht signifikant unterschiedlich.

Der Verfettungsgrad einer Leber hatte somit keinen Einfluß auf die Anzahl der Roller pro mm^2 endothelialer Oberfläche in postsinusoidalen Venolen. Siehe hierzu auch die Abbildungen 3.10-1 und 3.10-2.

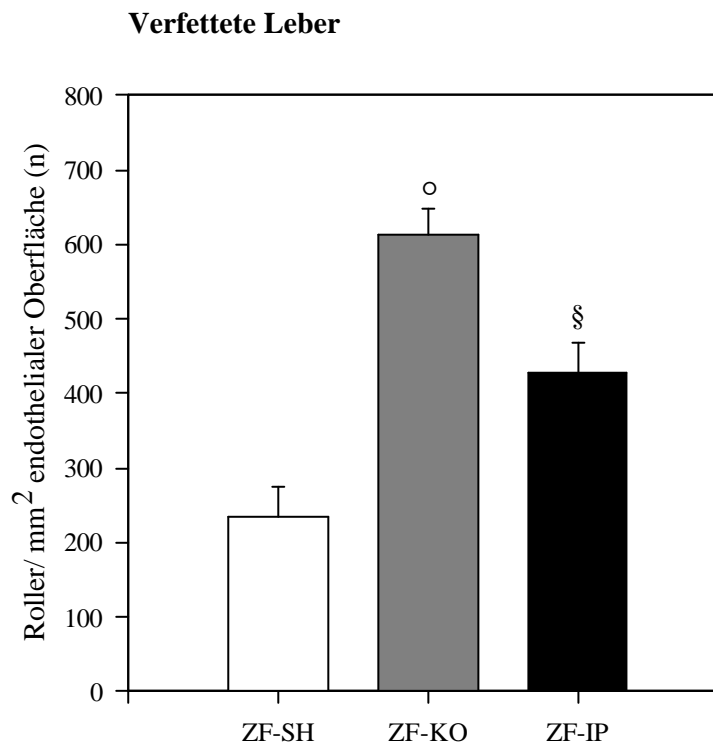
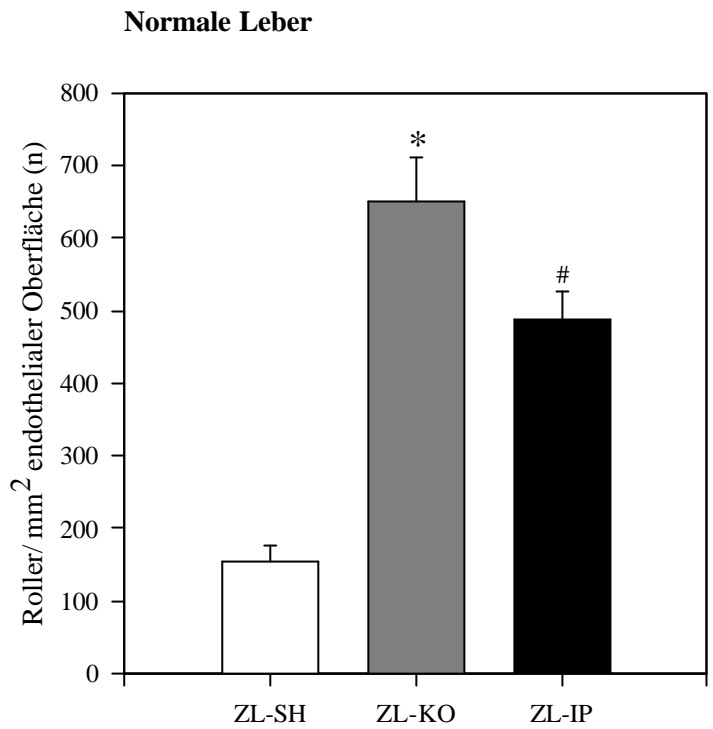


Abb. 3.10-1 und -2: Anzahl temporär adhärenter Leukozyten (Roller) pro mm² endothelialer Oberfläche in postsinusoidalen Venolen bei normalen (-1) und verfetteten (-2) Lebern: Nach Ischämie/Reperfusion konnte ein signifikanter Anstieg der Roller beobachtet werden, der mit IPC wieder signifikant reduziert werden konnte.

* $p < 0,01$ vs. ZL-SH, # $p < 0,05$ vs. ZL-KO, ° $p < 0,001$ vs. ZF-SH, § $p < 0,01$ vs. ZF-KO.

3.2.1.3.2 Permanente Leukozytenadhärenz in PSV (Sticker)

Ein Leukozyt, der innerhalb des gesamten vorgegebenen Zeitrahmens von 20 Sekunden an ein und derselben Stelle am Endothel einer postsinusoidalen Venole adhärent blieb, galt als Sticker. Die Angaben über die Zahl der Sticker erfolgte dabei im Verhältnis zur endothelialen Oberfläche der postsinusoidalen Venolen [mm²].

Bei normalen Lebern waren in scheinoperierten Tieren im Mittel 66 ± 14 Sticker pro mm² PSV-Endothelfläche nachweisbar. In der Kontrollgruppe nach Ischämie/Reperfusion konnte ein signifikanter Anstieg auf 469 ± 35 Sticker beobachtet werden. Unter Anwendung der IPC konnte die Anzahl permanent adhärenter Leukozyten auf ein signifikant geringeres Maß (345 ± 38) reduziert werden ($p < 0,01$).

Am Endothel postsinusoidaler Venolen verfetteter Lebern zeigten sich bei den scheinoperierten Tieren durchschnittlich 77 ± 26 permanent adhärenente Leukozyten. Nach zusätzlichen 60 Minuten Ischämie in der Kontrollgruppe kam es ebenfalls zu einem signifikant deutlichen Anstieg der Sticker auf 718 ± 105 während der Reperfusionsphase. Bei vorangeschalteter IPC konnte eine drastische Reduktion der permanent adhärenenten Leukozyten auf 274 ± 23 beobachtet werden.

Steatotische und nonsteatotische Lebern zeigten im Hinblick auf das Auftreten von leukozytären Stickern bei den unbehandelten und den 60-minütiger Ischämie ausgesetzten Gruppen keine signifikanten Unterschiede. Die Ergebnisse bei den normalen Ratten, die mit IPC behandelt wurden, zeigten zu den verfetteten Tieren keinen signifikanten Unterschied.

Siehe dazu auch die folgenden Abbildungen 3.11-1 und -2.

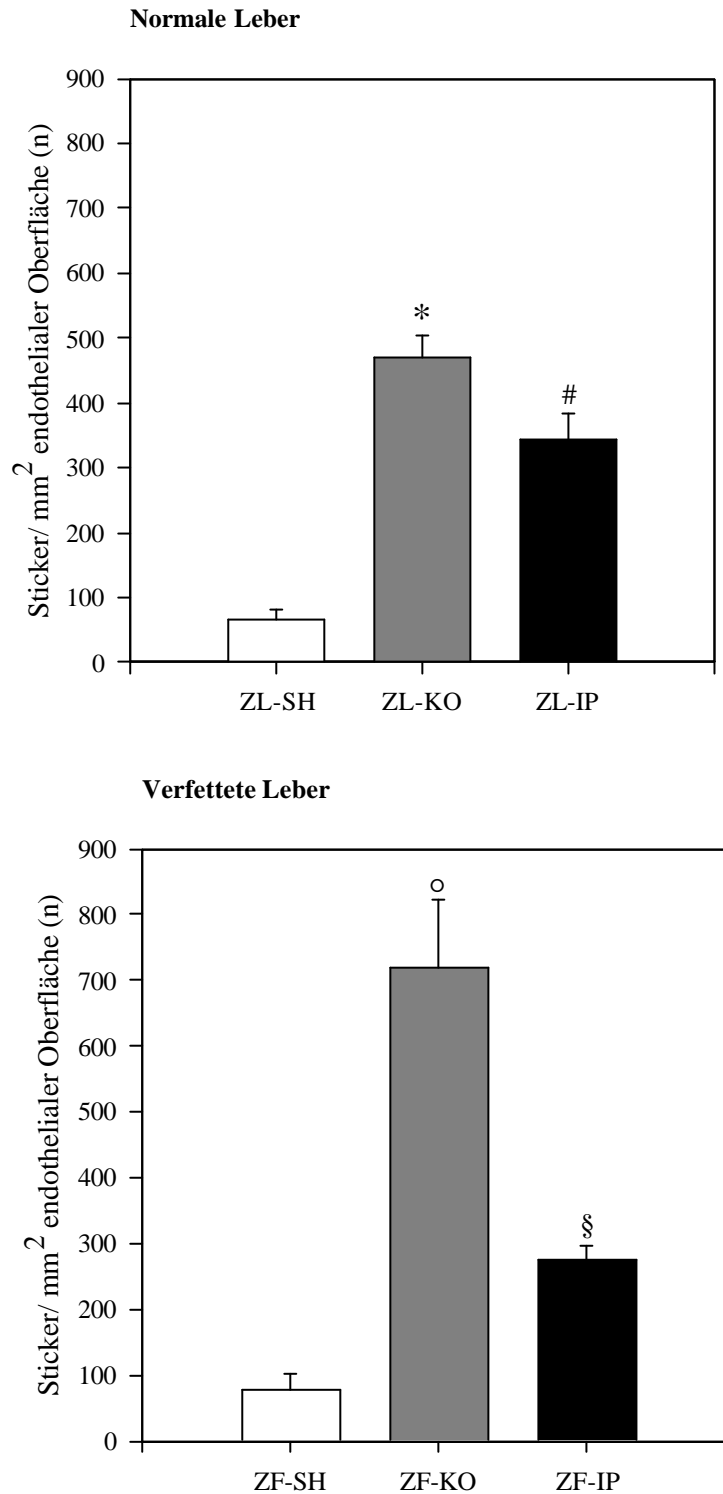


Abb. 3.11-1 und -2: Permanent adhärenente Leukozyten (Sticker) pro mm² endothelialer Oberfläche in postsinusoidalen Venolen in normalen (-1) und verfetteten Lebern (-2): Der signifikante Anstieg bei den Kontrollgruppen gegenüber den scheinoperierten Tieren kann durch IPC sowohl bei normalen als auch bei verfetteten Lebern signifikant reduziert werden.

* $p < 0,001$ vs. ZL-SH; # $p < 0,05$ vs. ZL-KO; ° $p < 0,01$ vs. ZF-SH; § $p < 0,01$ vs. ZF-KO.

3.2.1.3.3 Verhältnis von Stickern zu Rollern in PSV

Die Unterteilung der Adhärenz von Leukozyten am venösen Endothel in zwei Phasen dieses entzündlichen Prozesses, in temporäre und permanente, erlaubt eine Differenzierung des selbigen. Die Phase der Roller gilt als einleitende Phase der Adhärenz, bevor die Phase der Sticker die letzte Adhärenz mit der Folge der Immigration in den Hepatozyten darstellt. Erst dadurch wird der IRS ausgelöst. Das Verhältnis von Stickern zu Rollern spiegelt demnach die Ausprägung des entzündlichen Prozesses wider und wird hier auf die Auswirkung in normaler und steatotischer Leber untersucht.

Nicht-verfettete Lebern zeigten im scheinoperierten Zustand ein Verhältnis permanent zu temporär adhärenter Leukozyten von 1:2 ($0,51 \pm 0,10$). Dieses Überwiegen von Rollern schlägt in der Kontrollgruppe signifikant zugunsten der Sticker um. Hier lassen sich fast genauso viele Sticker wie Roller beobachten ($0,86 \pm 0,10$). In der Behandlung mit IPC nimmt die Anzahl der Sticker unter den Leukozyten wieder deutlich, jedoch nicht signifikant, ab ($0,69 \pm 0,06$).

Am Modell der verfetteten Rattenleber ist bei den Tieren, die keiner Ischämie unterzogen wurden, ein ähnliches Verhältnis von Stickern zu Rollern zu vermerken, mit einem mittleren Wert von $0,34 \pm 0,07$. Nach 60-minütiger Ischämie steigt dieser Wert deutlich auf $1,65 \pm 0,23$, mit einem Überwiegen der Sticker gegenüber den Rollern. Mittels IPC lässt sich die Anzahl der Sticker dann wieder signifikant auf $0,61 \pm 0,10$ reduzieren.

Der Grad der Verfettung einer Leber hat bei scheinoperierten Tieren keinen relevanten Einfluss auf das Verhältnis von Stickern zu Rollern. Erst nach 60 Minuten Ischämie zeigt sich zwischen den Kontrolltieren der normalen Leber und denen der verfetteten Leber ein signifikanter Unterschied. Während bei der normalen Leber das Sticker/Roller-Verhältnis $0,86 \pm 0,10$ beträgt und somit mehr temporär als permanent adhärenter Leukozyten zu finden sind, finden sich bei der steatotischen Leber ein Überwiegen der Sticker bei einem Verhältnis von $1,65 \pm 0,23$.

Mit IPC fand sich sowohl in nicht-verfetteten als auch in verfetteten Lebern ein Sticker/Roller-Verhältnis von $0,60 \pm 0,06$ bzw. $0,61 \pm 0,10$. In Anbetracht der unterschiedlichen Ergebnisse in den Kontrollgruppen sollte dies beachtet werden.

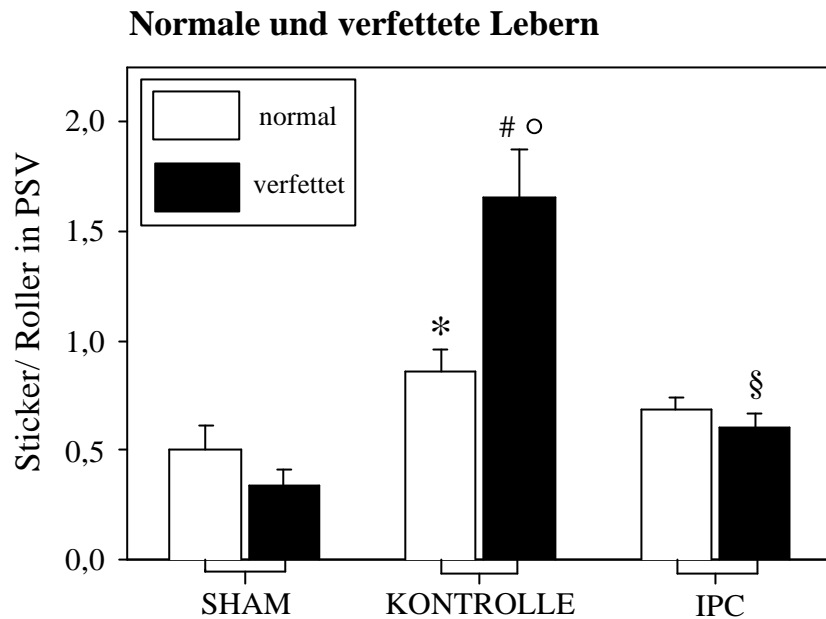


Abb. 3.12: Verhältnis von Stickern zu Rollern in PSV. Das Überwiegen von Rollern in beiden Sham-Gruppen wird nach 60-minütiger Ischämie zugunsten der Sticker verschoben, wobei in der Kontrollgruppe der steatotischen Leber signifikant mehr adhärenz gegenüber temporären Leukozyten vorhanden sind. Durch IPC wird das Verhältnis wieder in Richtung der Roller verschoben, im Falle der normalen Leber jedoch nicht signifikant.

* $p < 0,05$ vs. Sham normal; # $p < 0,001$ vs. Sham verfettet; ° $p < 0,05$ vs. Kontrolle normal; § $p < 0,01$ vs. Kontrolle verfettet.

3.2.1.4 Sinusoidweite im Leberazinus

Die Sinusoidweite wurde nach dem in Kapitel 2.5.2 beschriebenen Verfahren ausgewertet. Der bei scheinoperierten Tieren gemessene Mittelwert der midzonal gemessenen Sinusoidweite lag bei normalen Lebern bei $8,8 \pm 0,2 \mu\text{m}$. In der Kontrollgruppe zeigte sich eine signifikante Abnahme des sinusoidalen Durchmessers auf $6,2 \pm 0,1 \mu\text{m}$. Bei zusätzlicher Vorschaltung von IPC konnte mit durchschnittlich $9,1 \pm 0,1 \mu\text{m}$ ein Rückgang auf die ursprüngliche Sinusoidweite beobachtet werden.

Steatotische Lebern wiesen bei scheinoperierten Tieren eine durchschnittliche midzonale Sinusoidweite von $9,5 \pm 0,4 \mu\text{m}$ auf. Auch hier wurde bei Tieren, die in der Kontrollgruppe einer

60-minütigen Ischämiephase ausgesetzt wurden, eine deutliche Abnahme dieser Werte auf $6,7 \pm 0,2 \mu\text{m}$ festgestellt. Mit IPC ließ sich diese Abnahme der sinusoidalen Durchmesser verhindern und bei einem Mittelwert von $9,6 \pm 0,2 \mu\text{m}$ der beobachtete Ausgangswert in der scheinoperierten Gruppe wiederherstellen.

Der Vergleich von normalen mit verfetteten Lebern zeigt, dass sich durchgehend von der Gruppe der Scheinoperation aus über die Kontrollgruppe bis in die IPC-Gruppe die Leberazini unter den Bedingungen einer Steatosis eine leichte, jedoch nie signifikant höhere Sinusoidweite aufweisen. Letztlich ist die midzonale Sinusoidweite in Leberazini unabhängig vom Verfettungsgrad der Leber.

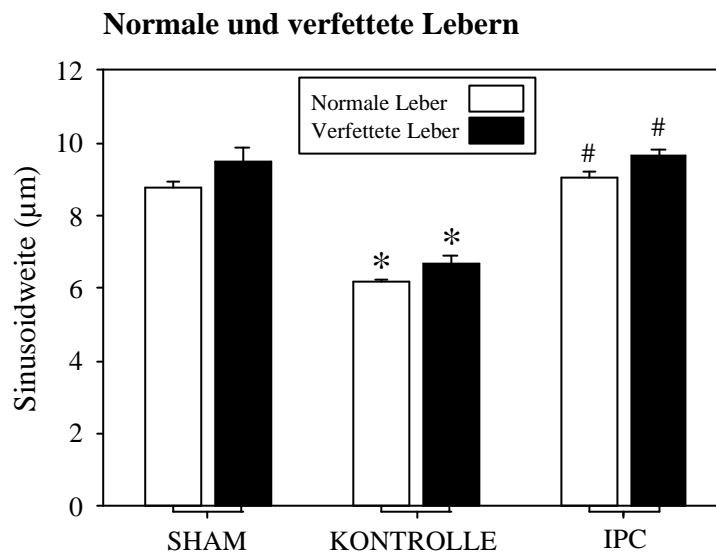


Abb. 3.13: Durchschnittliche Sinusoidweite im midzonalen Leberazinus [μm]: Bei Kontrolltieren zeigte sich eine signifikante Abnahme der Sinusoidweite im Vergleich zu den mit Scheinoperation behandelten Tieren. Mit IPC konnten die ursprünglichen Durchmesser wieder vollständig hergestellt werden.

* $p < 0,001$ vs. jeweiliger Sham-Gruppe; # $p < 0,001$ vs. entsprechender Kontrollgruppe.

3.2.1.5 Phagozytoseaktivität von Kupffer-Stern-Zellen

Die Phagozytoseaktivität von Kupffer-Stern-Zellen, den Makrophagen in der Leber, wurde nach der in Kapitel 2.5.3 beschriebenen Methode bestimmt. Dabei war die Zunahme der Anzahl nonadhärenter Latex-beads gleichzusetzen mit einer verminderten phagozytotischen Aktivität der Kupffer-Zellen.

In normalen Lebern verhielt sich die Phagozyten-Aktivität wie in Tabelle 3.14-1 dargestellt. Zwar konnte der in scheinoperierten Lebern beobachtete Mittelwert von $20,9 \pm 2,1$ % nichtadhärenter Latexpartikel zum Beobachtungszeitpunkt 5 Minuten nach Injektion in der Kontrollgruppe abgesenkt werden, jedoch war der Unterschied bei einem durchschnittlichen Wert von $14,6 \pm 3,6$ % nicht signifikant. Mit $17,0 \pm 1,4$ % beweglicher Latexpartikel war der dazu erhöhte Anteil in der IPC-Gruppe gegenüber den Kontrolltieren auch nicht signifikant.

Die steatotische Leber wies unter den Bedingungen einer Scheinoperation $29 \pm 5,4$ % nicht-adhärenente Latexpartikel 5 Minuten nach ihrer Applikation auf. Diese Anzahl sank in der Kontrollgruppe signifikant auf $11,5 \pm 1,1$ % ab, gleichzusetzen mit einer erhöhten Aktivität der Kupffer-Stern-Zellen. Unter Verwendung von IPC konnte diese Aktivität wieder signifikant erniedrigt und die Zahl der nicht-adhärenenten Latex-beads signifikant auf $21,9 \pm 1,9$ % gesteigert werden.

Der direkte Vergleich zwischen normalen und verfetteten Lebern bringt keine signifikanten Unterschiede zwischen den entsprechenden Gruppen zutage. Der Verfettungsgrad hatte also auf die Anzahl nonadhärenter Latexbeads 5 Minuten nach ihrer intraarteriellen Applikation in den Sham-, den Kontroll- und IPC-Gruppen keinen Einfluss.

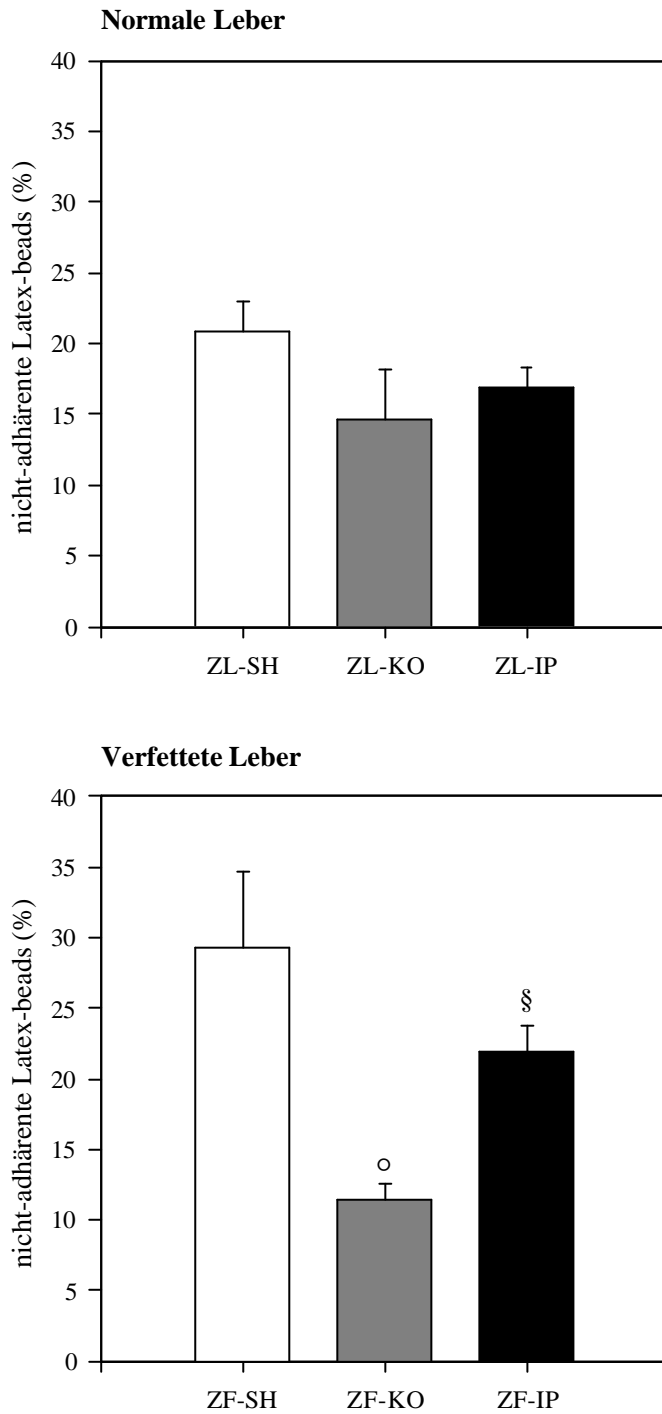


Abb. 3.14-1 und -2: Anteil nicht-adhärenente Latex-Partikel im Leberazinus, Angaben in %. Der in beiden scheinoperierten Gruppen beobachtete Anteil wird in den entsprechenden Kontrollgruppen nur in der verfetteten Leber signifikant abgesenkt. Der Schutzmechanismus der IPC durch Erhöhung der Anzahl nicht-adhärenente Latex-beads kommt ebenfalls nur bei den steatotischen Lebern signifikant zur Geltung.

$p^{\circ} < 0,05$ vs. ZF-SH; $p^{\S} < 0,001$ vs. ZF-KO.

3.2.2 Hepatozelluläre Integrität

Zur Charakterisierung des Einflusses der IPC auf die hepatozelluläre Integrität bei normalen und im Vergleich dazu bei verfetteten Lebern, wurde zum einen die Leberenzymaktivität herangezogen, zum anderen elektronenmikroskopische Aufnahmen der Lebern.

3.2.2.1 GPT-Aktivität im Serum

Als leberspezifisches Enzym wurde die Serumaktivität der GPT zur Eruiierung des hepatozellulären Schadens zwei Stunden postischämisch bzw. in der Scheingruppe zwei Stunden nach Laparotomie bestimmt.

Wie bereits im Abschnitt 3.1.2 beschrieben wurde, konnte in der Gruppe der heterozygoten Tiere mit normal-entwickelter Leber eine GPT-Aktivität im Serum von $38,0 \pm 4,7$ U/l beobachtet werden. Der Effekt einer 60-minütigen Ischämie auf den hepatozellulären Schaden zeigte sich in der Kontrollgruppe mit einem Anstieg des Leberenzym auf etwa das fünffache, mit einem gemessenen Mittelwert von $210,4 \pm 51,2$ U/l. IPC konnte mit einer durchschnittlichen GPT-Aktivität von $62,2 \pm 10,6$ U/l das Ausmaß dieses Schadens deutlich und signifikant reduzieren.

Die verfettete Leber zeigte ebenfalls eine eindruckliche Zunahme der GPT-Aktivität im Serum nach 60 Minuten Ischämie. Mit $826,4 \pm 240,2$ U/l in der Kontrollgruppe wurde der Wert bei den scheinoperierten Tieren $45,2 \pm 7,4$ U/l mehr als verzehnfacht. Der Einfluss der IPC auf die postischämische Enzymaktivität zeigte sich in einer signifikant deutlichen Verminderung dieses hohen Wertes auf $115,2 \pm 31,6$ U/l.

Der Vergleich der normalen mit der steatotischen Leber zeigte im Kapitel 3.1.2 eine signifikante Erhöhung der Serumaktivität des GPT beim verfetteten Modell. Der Unterschied nach IPC war jedoch zwischen beiden Gruppen nicht signifikant, auch wenn nach IPC die Resultate des GPT-Spiegels bei Vorliegen einer Fettleber etwas höher waren als in der Gruppe der normalstrukturierten Leber. Der Effekt der IPC war auch hier nicht abhängig vom Verfettungsgrad der Leber.

Siehe hierzu auch Abbildung 3.15-1 und -2.

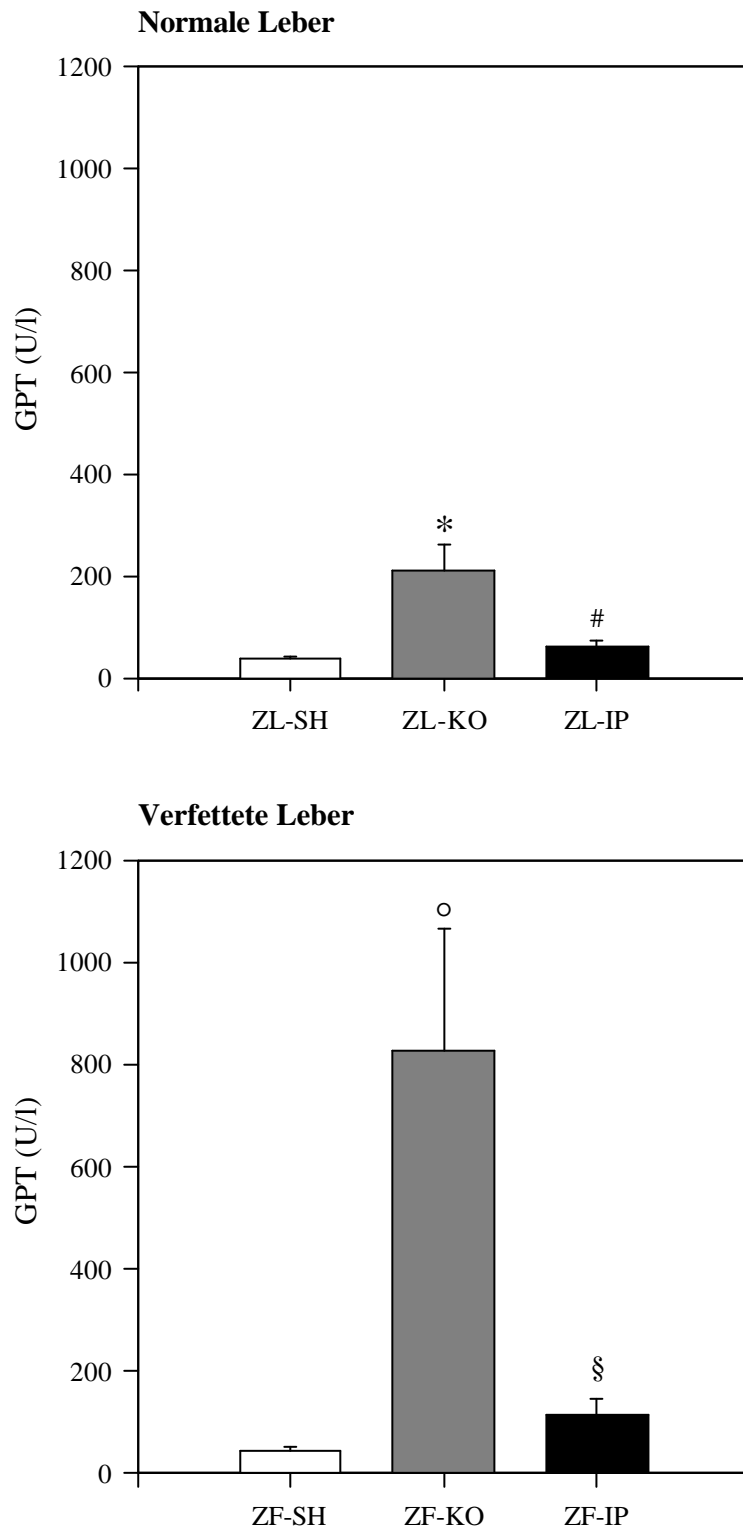


Abb. 3.15-1 und -2: Serum-GPT-Spiegel: Die Enzymaktivität konnte durch IPC in beiden Gruppen signifikant gesenkt werden. Signifikante Unterschiede im Bezug auf den hepatischen Verfettungsgrad zeigten sich dabei nur zwischen den Kontrollgruppen von normalen (ZL-KO) und verfetteten (ZF-KO) Lebern.

$p^* < 0,05$ vs. ZL-SH; $p\# < 0,05$ vs. ZL-KO; $p^\circ < 0,01$ vs. ZF-SH; $p\§ < 0,01$ vs. ZF-KO.

3.2.2.2 Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Leber

Die Elektronenmikroskopie ermöglichte durch 3000-fache Vergrößerung die Darstellung und Beurteilung des Leberschadens auf ultrastruktureller Ebene.

Wie bereits in 3.1.4 aufgeführt, zeigen normale Lebern in der Elektronenmikroskopie nach 60 Minuten Ischämie eine deutliche Vakuolenbildung und Steigerung der Peroxisomenzahl (Abb.3.5). In Aufnahmen der mit IPC-behandelten Tieren konnten diese Beobachtungen nicht gefunden werden und es zeigte sich eine mit den scheinoperierten Tieren gut vergleichbare Zellarchitektur ohne ultrastrukturelle Hinweise auf hepatozelluläre Schäden.

Das beobachtete Phänomen der sinusoidalen Endothelschwellung konnte bei steatotischen Lebern nach 60 Minuten Ischämie gefunden werden (siehe auch Abb. 3.7). Eine vermehrte Vakuolenbildung konnte zwar nicht festgestellt werden, dafür aber ebenfalls eine Vermehrung der intrahepatischen Peroxisomen.

Fettlebern, die hingegen mit IPC vorbehandelt wurden, zeigten keine Schwellung des sinusoidalen Endothels. Auch die Vermehrung intrahepatischer Peroxisomen konnte im Gegensatz zur Kontrollgruppe hier nicht beobachtet werden.

Der Vergleich steatotischer und normaler Lebern wurde bereits in Kapitel 3.1.4 aufgeführt. Die dort gefundenen Unterschiede in den Kontrolllebern konnten bei ischämisch-präkonditionierten Lebern nicht mehr gefunden werden.

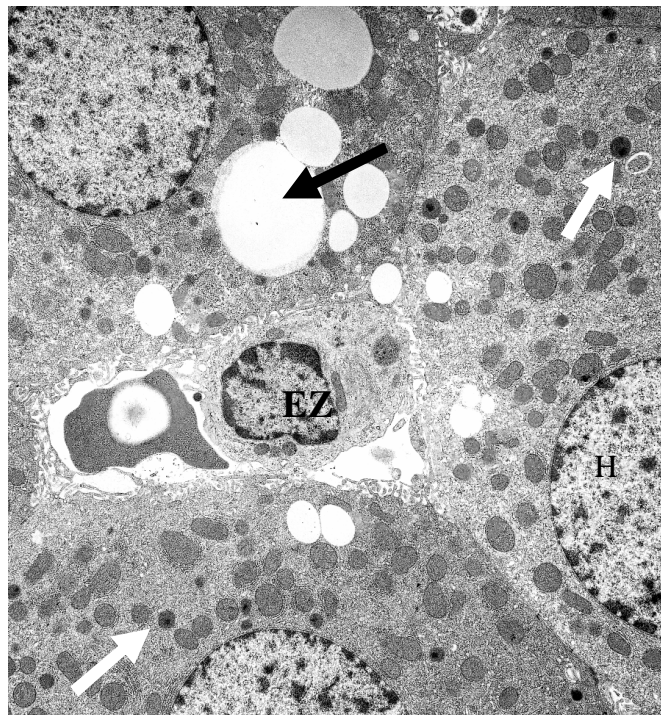


Abb. 3.16

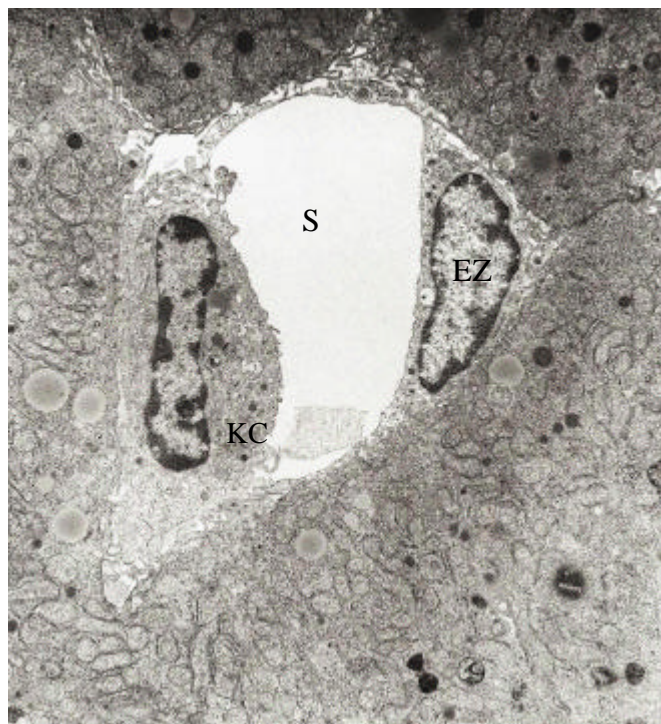


Abb. 3.17

Abb. 3.16 und 3.17: Elektronenmikroskopische Aufnahmen normaler Lebern jeweils nach I/R. Unbehandelte Tiere zeigten eine Vermehrung der Peroxisomenzahl (weisser Pfeil) und eine gesteigerte Vakuolenbildung (schwarzer Pfeil) in Abb. 3.16. Nach IPC lassen sich beide morphologischen Phänomene in dieser Ausprägung nicht nachweisen (Abb. 3.17). (S= Sinusoid; EZ= Endothelzelle; KC= Kupffer-Zelle; H= Hepatozyt).

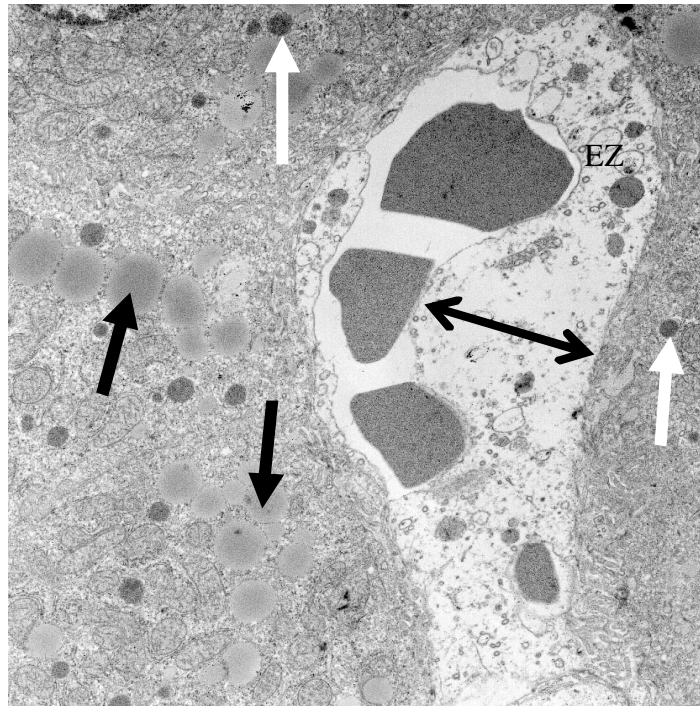


Abb. 3.18

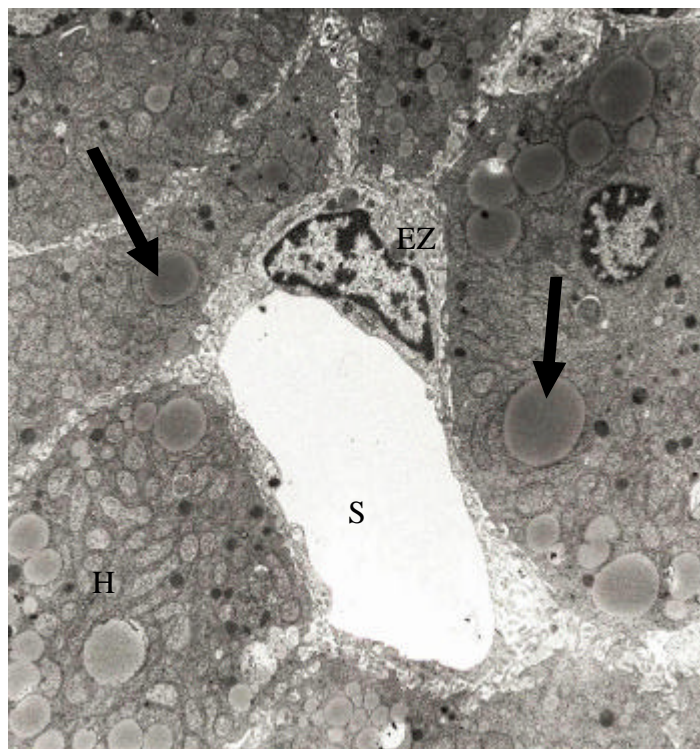


Abb. 3.19

Abb. 3.18 und 3.19: Elektronenmikroskopische Aufnahmen verfetteter Lebern nach I/R. In beiden Aufnahmen lässt sich die mikrovesikuläre Verfettung nachweisen (schwarzer Pfeil). Unbehandelte Tiere (Abb. 3.18) zeigen zusätzlich eine Schwellung der Endothelzellen (Doppelpfeil) und eine Zunahme der Peroxisomenzahl (weisser Pfeil). In der Gruppe der mit IPC vorbehandelten Tiere können diese Veränderungen auf ultrastruktureller Ebene nicht gefunden werden (Abb. 3.19).

3.2.3 Hepatozelluläre Funktion

Zur Einschätzung der Funktionalität der Leberzelle wurde der Gallefluss herangezogen. Dadurch konnte die Syntheseleistung und Exkretionsfunktion der Hepatozyten dargestellt werden. Zu diesem Zweck wurden zu im Protokoll fest bestimmten Zeiten Galleprobensammlungen vorgenommen und anschließend ausgewertet. Dabei galt der vor der Ischämie gemessene Gallefluss als Referenzwert für die nachfolgenden Bestimmungen (siehe auch Kapitel 2.5.5).

In der normalen Leber wurde bei scheinoperierten Tieren ein leichter Rückgang des Galleflusses beobachtet, der sich nach etwa einer Stunde offener Laparotomie ohne Ischämie bei $85,1 \pm 2,6$ % gegenüber dem Ausgangswert einstellte. Diese Werte fielen in der Kontrollgruppe während der 60-minütigen Ischämiephase auf $60,2 \pm 2,8$ % nach 30 Minuten und $58,7 \pm 3,1$ % nach 60 Minuten Ischämie ab. In der zweistündigen Reperfusionphase erholten sich diese Werte nicht mehr und erlangten $66,0 \pm 2,3$ % nach 120-minütiger Reperfusion. Zu allen Zeitpunkten war dabei der Gallefluss signifikant niedriger als in der Gruppe der scheinoperierten Tiere. Unter Behandlung mit IPC konnte nach Voranschaltung einer jeweils 10-minütigen Ischämie- und Reperfusionphase während der nachfolgenden Ischämie ebenfalls ein Abfall des mittleren Galleflusses beobachtet werden, wobei ein Minimum nach 60 Minuten Ischämie von $64,9 \pm 4,4$ % gemessen wurde. Im Gegensatz zur Kontrollgruppe erholten sich diese Werte in der Reperfusionphase allerdings relativ rasch und erreichten mit $84,6 \pm 2,7$ % nach zwei Stunden Reperfusion praktisch den gleichen Gallefluss wie in der Gruppe der scheinoperierten Tiere.

Bei verfetteten Tieren war bei scheinoperierten Lebern ein Rückgang des Galleflusses bemerkbar, der sich letztlich bei $85,0 \pm 3,7$ % einstellte. In der Kontrollgruppe sanken auch am steatotischen Modell die Werte zu allen beobachteten Zeitpunkten signifikant herab, mit einem Minimalwert von $50,6 \pm 2,9$ % nach einer Stunde Reperusionszeit. Im Gegensatz zum Modell der nicht-steatotischen Leber konnten hier durch IPC allerdings keine signifikant höheren Galleflussraten erzielt werden als in der Kontrollgruppe. Auch die leichte Erholung des Galleflusses am Ende der Reperusionszeit auf $60,1 \pm 5,3$ % war im Vergleich zu der Kontrollgruppe nicht signifikant unterschiedlich.

Der protektive Effekt war in Hinsicht auf den Gallefluss und somit der Syntheseleistung der Leber bei zunehmenden Verfettungsgrad der Leber nicht mehr zu beobachten.

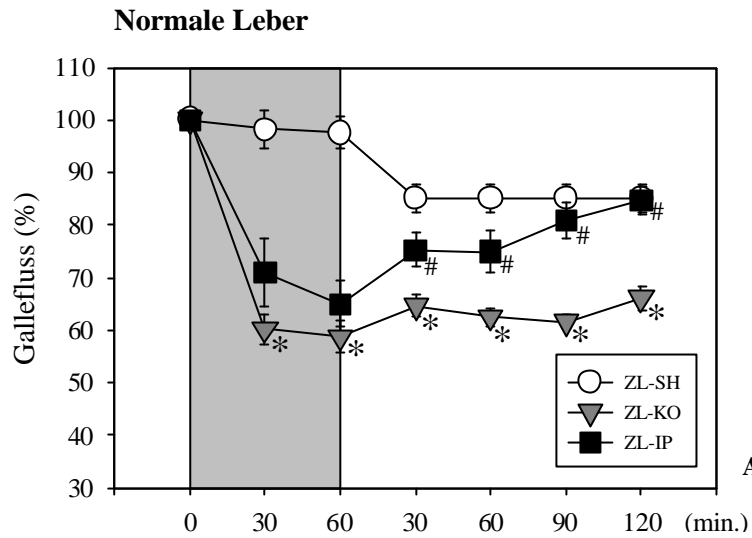


Abb. 3.20-1

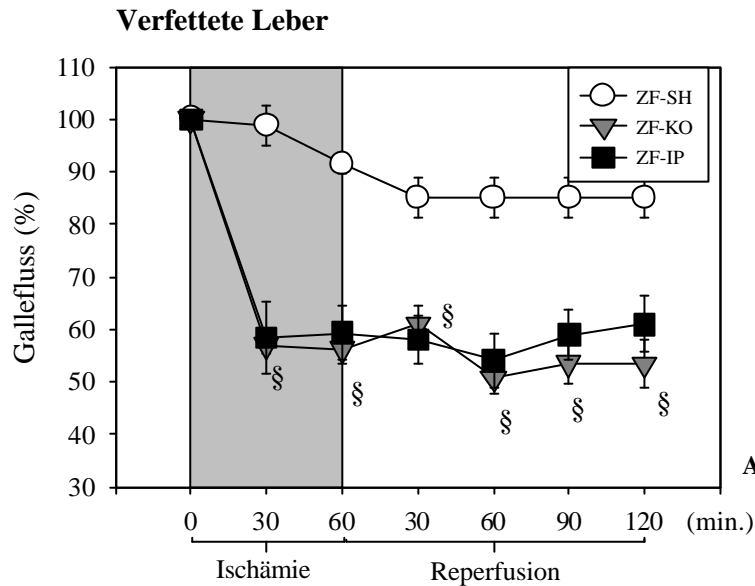


Abb. 3.20-2

Abb. 3.20-1 und -2: Mittlerer Gallefluss in Prozent zum Ausgangswert: Die zu beobachtende Abnahme der Galleproduktion nach 60-minütiger Ischämie in beiden Kontrollgruppen (ZL-KO bzw. ZF-KO) kann durch IPC nur in der nicht-steatotischen Leber (3.20-1) in der Reperfusionphase verhindert werden.

$p^* < 0,001$ vs. ZL-SH; $p\# < 0,05$ vs. ZL-KO; $p\§ < 0,001$ vs. ZF-SH.

Um die quantitativen Unterschiede im Gallefluss einmal ohne Ischämie, nach Ischämie oder mit IPC und nachfolgender Ischämie und zum anderen deren Abhängigkeit vom Verfettungsgrad einer Leber aufzeigen zu können, bedurfte es einer anderen Darstellung der Daten. Dies erfolgte in der Auswertung der pro Minute gesammelten μl Galle in der Reperfusionzeit, bezogen auf das Leberfeuchtgewicht.

Die normale Leber produzierte in der scheinoperierten Gruppe durchschnittlich $1,18 \pm 0,12 \mu\text{l}/\text{min}/\text{g}$. Nach 60-minütiger Ischämie wurde in der Kontrollgruppe ein signifikant reduzierter Gallefluss festgestellt, mit $0,93 \pm 0,06 \mu\text{l}/\text{min}/\text{g}$. Die mit IPC vorbehandelte Gruppe konnte nach 60 Minuten Ischämie wieder signifikant höhere Galleflussraten vorweisen, mit $1,21 \pm 0,08 \mu\text{l}/\text{min}/\text{g}$.

Bei der verfetteten Leber wurde unter den Bedingungen einer Scheinoperation ein mittlerer Gallefluss von $0,85 \pm 0,17 \mu\text{l}/\text{min}/\text{g}$ beobachtet. Auch hier zeigte sich eine signifikante Abnahme in der Galleflussrate in der Kontrollgruppe auf $0,63 \pm 0,03 \mu\text{l}/\text{min}/\text{g}$, die IPC konnte mit Werten von $0,59 \pm 0,03 \mu\text{l}/\text{min}/\text{g}$ den Gallefluss nach Ischämie nicht anheben.

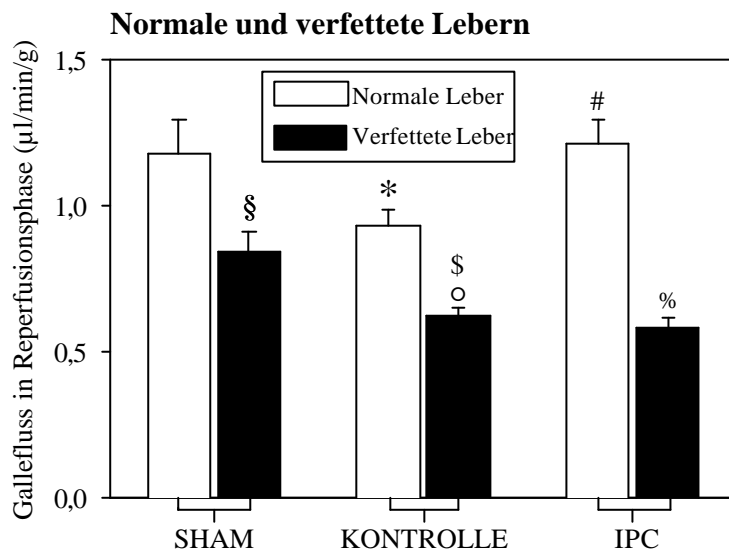


Abb. 3.21: Mittlerer Gallefluss in der Reperfusionzeit, Angaben in $\mu\text{l}/\text{min}/\text{g}$. Es zeigt sich in verfetteten Lebern generell ein signifikant geringerer Gallefluss gegenüber normalen Lebern. In beiden Kontrollgruppen zeigt sich eine signifikante Abnahme des Galleflusses gegenüber den entsprechenden scheinoperierten Tieren (SHAM). IPC vermag nur unter den Bedingungen einer nicht-steatotischen Leber die Galleflussrate gegenüber der Kontrollgruppe signifikant zu erhöhen. $p^* < 0,05$ vs. Sham-normal; $p\$ < 0,05$ vs. Sham-verfettet; $p\# < 0,05$ vs. Kontrolle-normal; $p\% < 0,05$ vs. Sham-normal; $p\$ = 0,001$ vs. Kontrolle-normal; $p\% < 0,001$ vs. Kontrolle IPC.

3.2.4 Bildung freier Sauerstoffradikale

Freie Sauerstoffradikale (ROS) werden an der Entstehung des Ischämie-/ Reperfusionsschaden als wesentlich angesehen, weshalb der Einfluss der ischämischen Präkonditionierung auf die freien Sauerstoffradikale und deren Abhängigkeit vom Verfettungsgrad der Leber untersucht werden sollte. Dies erfolgte, wie in 2.5.6 beschrieben, anhand der Bestimmung der Plasmakonzentration von GSH und GSSG.

Dabei zeigten sich beim Plasmaspiegel sowohl des GSH als auch des GSSG keine signifikanten Unterschiede zwischen normalen und verfetteten Lebern. Es konnte auch kein signifikanter Effekt durch IPC festgestellt werden, weder bei den steatotischen noch bei den nicht-steatotischen Lebern. Die Bildung freier Radikale unter den hier gewählten experimentellen Bedingungen war demnach unabhängig vom Verfettungsgrad einer Leber und auch durch IPC nicht signifikant beeinflussbar.

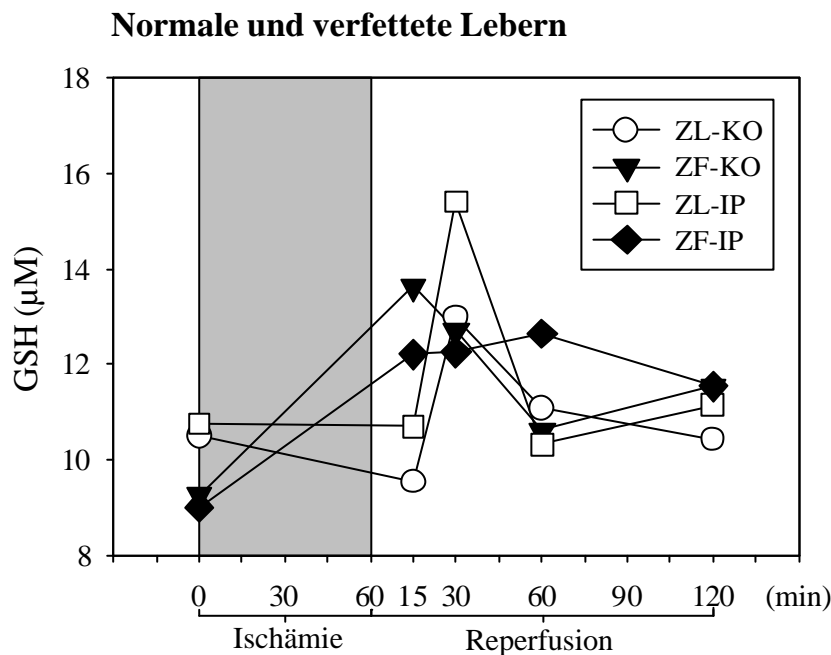


Abb. 3.22: GSH-Plasmaspiegel unter normalen (ZL) und verfetteten (ZF) hepatischen Bedingungen, nach 60-minütiger Ischämie ohne IPC (Kontrolle=KO) und mit IPC (IP). Um die Übersichtlichkeit der Grafik zu bewahren, wurde auf eine Angabe der SEM verzichtet. Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen gab es zu keinem Zeitpunkt.

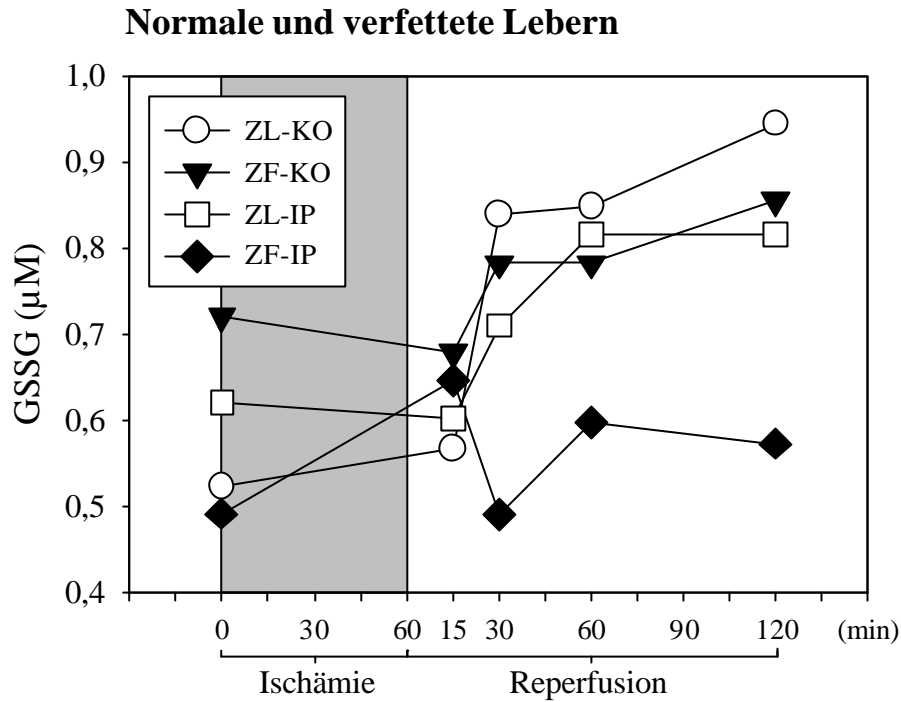


Abb. 3.23: GSSG-Plasmaspiegel [in μM] bei normalen (ZL) und verfetteten (ZF) Lebern. Aufgeföhrt sind hier die jeweiligen Kontrollgruppen (KO) und Interventionsgruppen mit Ischämischer Präkonditionierung (IP). Auch hier wurde auf die Darstellung der SEM verzichtet, da aufgrund der relativ großen Standardabweichungen sonst die Übersichtlichkeit der Grafik gelitten hätte.

Zu keinem Zeitpunkt gab es zwischen den Gruppen untereinander (ZL-KO vs. ZL-IP und ZF-KO vs. ZF-IP) und gegenüber einander (ZL-KO vs. ZF-KO und ZL-IP vs. ZF-IP) signifikante Unterschiede in den GSSG-Spiegeln.

Intrazellulärer Gesamt-GSH-Gehalt

Entsprechend dem unter 3.5.6 beschriebenen Verfahren wurde der intrazelluläre Gehalt des Antioxidans Glutathion (GSH) bestimmt. Da nur der linke Leberlappen (LL) eines Versuchstieres einer Ischämie und Reperfusion unterzogen wurde, konnte durch Bestimmung des GSH-Gehaltes des nicht von I/R betroffenen rechten Leberlappens (LR) ein direkter Vergleich des intrazellulären GSH-Gehaltes durchgeführt werden.

In normalen Lebern führte in den Kontrollgruppen die Ischämie / Reperfusion zu einer signifikanten Abnahme des intrazellulären GSH-Gehaltes im linken, postischämischen Leberlappen (LL) gegenüber dem rechten (LR), die keiner Ischämie / Reperfusion unterzogen worden waren. In der präkonditionierten Gruppe (IP) konnte diese Abnahme des intrazellulären GSH-Gehaltes im linken Leberlappen im Vergleich zum rechten Lappen zwar verhindert werden, es zeigte sich jedoch keine signifikante Besserung des intrazellulären GSH-Gehaltes gegenüber der Kontrollgruppe. Im Gegensatz ließ sich sogar eine Abnahme im rechten Leberlappen nach IPC gegenüber der Kontrollgruppe beobachten.

In normalen Lebern scheint demnach der intrazelluläre GSH-Gehalt unter I/R aufgebraucht zu werden. Nach Vorbehandlung mit IPC ist der intrazelluläre GSH-Gehalt jedoch vergleichbar zu dem nicht der Ischämie/ Reperfusion ausgesetzten rechten Leberlappen. Hier scheint der oxidative Stress also nicht durch I/R beeinträchtigt worden zu sein.

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 IPC-Vorbehandlung zeigten sich keine Veränderungen des intrazellulären GSH-Gehaltes.

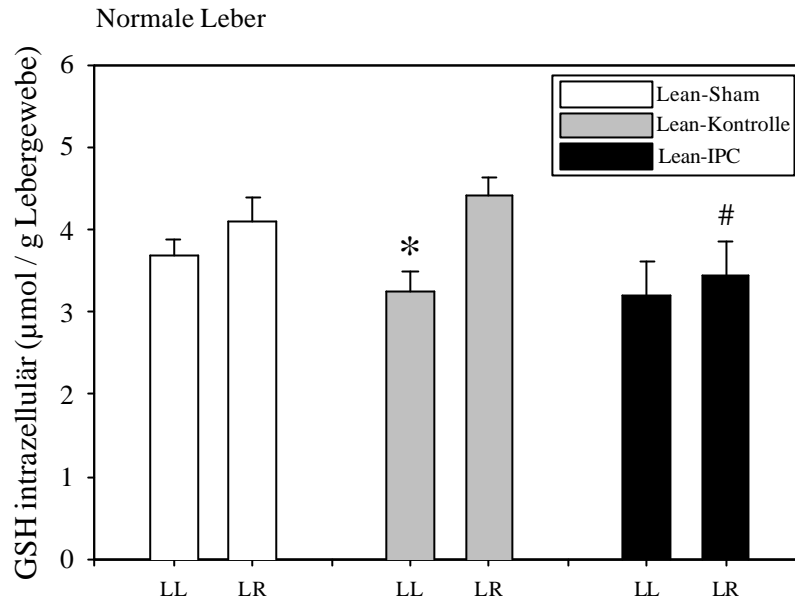


Abb. 3.24-1

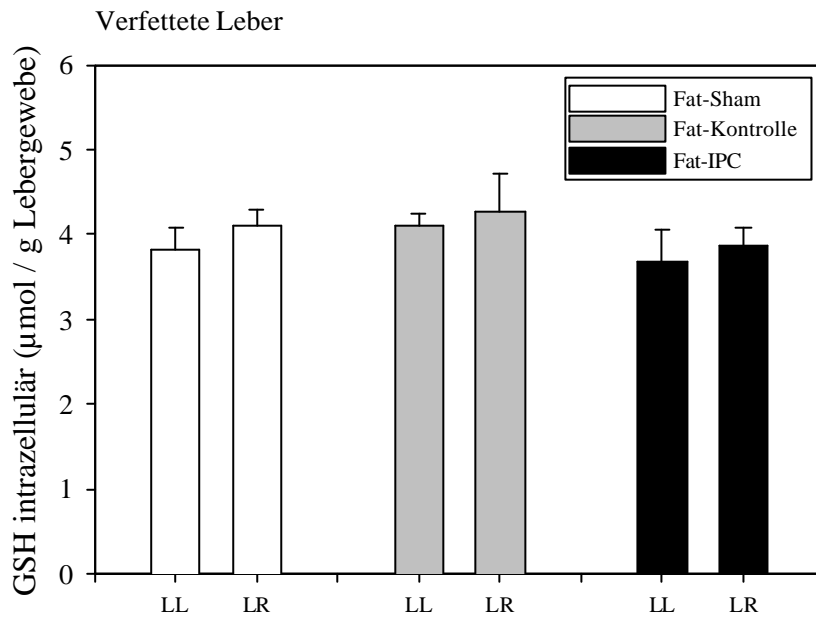


Abb.3.24-2

Abb. 3.24-1 und 3.24-2: Intrazellulärer Gesamt-GSH-Gehalt in Hepatozyten normaler Ratten (Abb. 3.24-1) zeigt nach I/R in der Kontrollgruppe eine signifikante Abnahme des intrazellulären GSH-Gehaltes im linken (LL) gegenüber dem rechten Leberlappen (LR). In verfetteten Lebern lassen sich im intrazellulären GSH-Gehalt keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen nachweisen. $p^* < 0,004$ vs. LR Lean-Kontrolle; $p\# < 0,04$ vs. LR Lean-Kontrolle.

IV. DISKUSSION

In der westlichen, industrialisierten Welt spiegelt die hohe Inzidenz der Fettleber deren wichtige Bedeutung für die Leberchirurgie wider. In Autopsien, die an tödlich verunfallten Personen mit eher jungem Durchschnittsalter durchgeführt wurden, machen verfettete Lebern einen Anteil von 6 – 11 % aus (Hilden 1977, Underwood 1984). Dieser Anteil ist bei Patienten in der Leberchirurgie nochmals erhöht, und wird auf 20 - 26 % eingestuft (Hornboll 1982, Miki 1998).

Für die Leberchirurgie haben diese hohen Zahlen deshalb Bedeutung, weil sich gezeigt hat, dass verfettete Lebern eine deutlich geringere Ischämietoleranz aufweisen als normale. So wird bei der Fettleber beispielsweise nach ausgedehnter Leberresektion ein postoperatives Leberversagen in 14 % beobachtet (Behrns 1998) gegenüber 2 - 4 % bei der normalen Leber (Behrns 1998; Selzner 1999).

Die hohe Inzidenz der steatotischen Leber wirkt sich auch auf die Zahl der potenziellen Spender für die Lebertransplantation aus. Die in der bereits zitierten Studie von Underwood et al. evaluierte hepatische Steatoserate von 15-20% bezieht sich beispielsweise auf bei Verkehrsunfällen tödlich verunglückte Spender, dabei jedoch relativ junge, gesunde Männer, und damit mögliche Kandidaten für Spenderlebern. Neuere Studien bestätigen das Vorliegen einer moderat bis hochgradigen Steatosis bei jeder fünften Spenderleber (Monsour 1994, Rinella 2001). Die meisten Transplantationszentren lehnen trotz der kritischen Organverfügbarkeit Lebern mit einem Verfettungsgrad von über 20 % ab, bei Kakizoe (1990) et al. machte dies beispielsweise 4 % der Spenderlebern aus. Andere Transplantationszentren werden die Operation ablehnen, wenn eine Spenderleber mehr als 50 % steatotischer Hepatozyten aufweist (D'Alessandro 1991). Zur Differenzierung und Quantifizierung des Steatosegrades wurde von D'Alessandro et al. und Adam et al. deshalb eine Klassifizierung der Leberverfettung eingeführt, in welcher zwischen milder, moderater und hochgradiger Verfettung zu unterscheiden ist (D'Alessandro 1991, Adam 1991). Mild entspricht dabei einem Anteil verfetteter Hepatozyten unter 30%, moderat 30-60 % und hochgradig setzt eine Hepatozytensteatoserate von mehr als 60 % voraus. Diese Einteilung fand Verwendung bei der Beurteilung des Risikos einer transplantierten Leber, in einer postoperativ gestörten oder gar fehlenden Funktion, der sogenannten primären Non-Funktion (PNF), zu enden. Liegt der Anteil der PNF eines transplantierten Organes in der normalen Leber noch bei akzeptablen 3 - 6 % (D'Alessandro 1991, Ploeg 1993), wird das Risiko einer PNF bei hochgradiger Verfettung des Spenderorgans auf 40-60 % veranschlagt (Hayashi 1999, Canelo 1999). Die Ergebnisse bei den moderat verfetteten Lebern gehen in verschiedene Richtungen. Im Vergleich mit

der normalen, nicht-verfetteten Leber werden bei der 1-Jahr-Überlebensrate identische Ziffern (Fishbein 1997) als auch signifikante Unterschiede beobachtet, zum Beispiel 58 % bei Verwendung moderat verfetteter Lebern gegenüber 73 % (Chui 1998). Strasberg et al. stellten eine Zunahme der PNF bei Transplantation moderat steatotischer Lebern im Vergleich zu nichtverfetteten Lebern von 3 auf 13 % fest (Strasberg 1994). Eine milde Verfettung der Leber (<30 % verfetteter Hepatozyten) zeigte nach Transplantation ähnliche Organfunktionsaufnahmeraten bzw. Empfänger-Überlebensraten wie bei normalen Lebern (Markin 1993). Die hochgradige Verfettung einer Leber wird demnach als absolute, die moderate Verfettung als relative Kontraindikation betrachtet. Lebern mit mildem Verfettungsgrad (<30%) sollten für die Transplantation nicht abgelehnt werden (Selzner 2001).

Aufgrund des mangelnden Verständnisses für die verminderte Toleranz der Fettleber gegenüber Ischämie-/ Reperfusionsschäden, galt es in dieser tierexperimentellen Arbeit ein vergleichendes Modell zwischen normalen und verfetteten Lebern aufzustellen und in Hinsicht auf die Reaktion von Ischämie und Reperfusion sowie den protektiven Effekt der ischämischen Präkonditionierung zu untersuchen. Da die größte Unklarheit bei Lebern mit moderater Verfettung lag und ihr Anteil mit ca. 10% der verfetteten Lebern in Autopsien eine wesentliche klinische Relevanz aufweisen, sollte folglich ein Modell mit einem Verfettungsgrad von 30 – 60 % herangezogen werden.

4.1 Diskussion von Material und Methoden

4.1.1 Tiermodell

Für diese Versuchsreihe fiel die Wahl auf die Verwendung hetero- und homozygoter Zucker-Ratten und somit auf ein genetisch induziertes Fettlebermodell. Bei homozygoten Zucker-Ratten liegt aufgrund einer Spontanmutation des für den Leptinrezeptor kodierenden Gens eine Fehlbildung desselben vor (Chua 1996, Phillips 1996). Dies hat zur Folge, dass der Rezeptor-medierte Transport in die Zelle am zerebralen Zielort im Hypothalamus nicht stattfinden kann und somit die intrazelluläre Signalwirkung des Hormons Leptin ausbleibt (Yamashita 1997, Crouse 1998). Zwei Wirkungen auf den Hypothalamus werden dem Leptin dabei zugeschrieben: zum Einen vermittelt es das Signal der Sättigung nach Nahrungsaufnahme, zum Anderen steigert es den Energieverbrauch (Campfield 1996, White 1997).

An der Entstehung einer verfetteten Leber in homozygoten Zucker-Ratten ist somit die fehlende Signalwirkung des Leptins grundlegend beteiligt. Dadurch zeigen die homozygoten Tiere ein

ungebremstes Fressverhalten und entwickeln aufgrund des zusätzlich verminderten Energieverbrauchs bereits im Alter von 8 Wochen Fettleibigkeit und auch -lebern aus.

Gleichzeitig spiegeln die Attribute des übermäßigen Essverhaltens und verminderten Energieverbrauchs zwei der häufigsten Ursachen für Steatosis in der westlichen Welt wider (Hilden 1977, Hornboll 1982). Dadurch waren wir der Meinung mit der Fettleberinduktion in Zucker-Ratten ein adäquates Tiermodell für die Gegebenheiten im Menschen zu verwenden.

Im Gegensatz zu den homozygoten besitzen heterozygote Zucker-Ratten funktionierende zerebrale Leptinrezeptoren und bewahren somit einen schlanken Phänotyp.

Außerdem hat sich das Modell mit den Zucker-Ratten in der Leberforschung mehrfach bewährt (Sato 1986, Sun 2001, Selzner 2001, Seifalian 2001).

Neben der genetisch induzierten Fettleber beruhen andere Versuchsmodelle auf einer nahrungsmittelinduzierten Hepatosteatoze. Diese beruhen auf der Ingestion von Alkohol oder auf einer Diät, die Cholin- und Methionin frei ist.

Die kontinuierliche Einnahme von Ethanol führt zu einer Aktivitätserhöhung lipogener Enzyme durch die Verschiebung des Verhältnisses der Katalysatoren NAD⁺ und NADH zugunsten des NADH, da NAD⁺ durch die Alkoholdehydrogenase vermehrt verbraucht wird (Koteish 2001). Diese zusätzliche Triglyzeridsynthese überschreitet dabei die zellulären Kapazitäten, die Lipide in den Mitochondrien zu oxygenieren (Gao 1995) oder das VLDL als Triglyzeridcarrier über zelluläre Transporter zu sezernieren (Blomstrand 1973, Scheig 1971), mit der Folge der intrazellulären Ansammlung von Triglyzeriden und letztlich hepatischer Zellverfettung (Lieber 1993).

Die Aufnahme Cholin- und Methionin-freier Nahrung (CMMD) führt neben einer ebenfalls erhöhten hepatischen Aktivität verschiedener lipogener Enzyme (Sawka-Verhelle 2000) außerdem zu einem Mangel des essentiellen VLDL-Bausteins Phosphatidylcholin (Yao Z, 1988 und 1989).

Die Folge ist auch hier eine Akkumulation von Triglyzeriden in den Hepatozyten,

Beiden Methoden gemeinsam ist neben der intrazellulären Zunahme der Triglyzeride auch eine entzündliche Komponente an der Entstehung der Steatosis. Koteish et al. beobachteten dies in der alkoholinduzierten Fettleber (Koteish 2001), Teramoto et al. in der CMDD- Gruppe (Teramoto 1993b). Da in der vorliegenden Arbeit Entzündungsreaktionen infolge des Ischämie-/ Reperfusionsschadens beobachtet und beurteilt werden sollten, hätten diese Modelle sicherlich zu Fehl- oder Missinterpretationen geführt.

Ratten wurden für diese Versuche anderen Tiermodellen, unter anderem mit Goldhamstern oder Mäusen, v.a. aus Gründen der Praktikabilität vorgezogen. So ließ die Größe der Tiere sowohl bei

der mikrochirurgischen Präparation als auch der in vivo Mikroskopie eine leichtere Handhabung zu. Auch die Entnahme verhältnismäßig viel Blutes ist bei diesen Tieren aufgrund des höheren zirkulierenden Blutvolumens möglich (Seifert und Meßmer 1971), die laborchemischen Bestimmungen sind weitestgehend etabliert. Ein weiterer Vorteil der Ratten gegenüber anderen Kleintieren lag in der Gewinnung von mehr Material für Leberproben. Gegenüber Großtieren war bei Ratten der Aufwand geringer und die Anschaffungs- und Unterhaltskosten günstiger.

4.1.2 Präparation

Aufgrund des für die Tiere relativ großen Eingriffs wurde der Versuchsablauf so weit wie möglich standardisiert. Die Präparation der Tiere erfolgte dabei in zwei Schritten. Nach Katheterisierung eines jeweils arteriellen und venösen Halsgefäßes links cervical wurde im zweiten Schritt eine Querlaparotomie durchgeführt, um Platz für die Präparation und spätere Auslagerung der Leber für die IVM zu haben.

Im Gegensatz zu vielen anderen Versuchsgruppen wurde in diesem Fall auf das klassische Pringle-Manöver mit Abklemmung der gesamten portalen Trias verzichtet. Trotz des chirurgisch aufwändigeren und anspruchsvolleren Verfahrens wurde die partielle Leberischämie (70%) durchgeführt. Durch selektives Abklemmen der zum linken Leberlappen führenden Gefäße aus Arteria hepatica und Vena porta konnten Leberschäden durch portale Hypertension mit mesenterialem Rückstau und nachfolgender Endotoxämie weitgehend verhindert werden, durch Erhaltung des Blutflusses über den rechten und caudalen Leberlobus (Urata et al. 1998). Durch Schonung des Gallenganges konnte ein Leberschaden durch Gallerückstau unterbunden und gleichzeitig die Galle als funktioneller Messparameter verwendet werden.

Um die Gefahr der Obstruktion zu- oder abführender Gefäße während der Auslagerung der Leber zu vermeiden, wurde die Leber auf eine spezielle Modelliermasse gebettet.

Das während der gesamten Ischämie- und Reperfusionzeit offene Abdomen birgt außerdem das Risiko des Flüssigkeitsverlustes durch Verdunstung und des Leberschadens durch Lichtexprimierung. Es zeigt sich jedoch, dass durch Abdeckung des offenen Bauchraumes mit Cuprophanfolie und Lichtschutz sowie des ausgelagerten Leberlappens mit einem Deckglas dem entgegen gewirkt werden konnte. Die kontinuierliche intraarterielle Infusion von Tutofusin-Lösung (4ml/h) diente neben der Volumensubstitution auch gleichzeitig zur Freihaltung des inserierten arteriellen Katheters.

4.1.3 Intravitalmikroskopie

Die Intravitalmikroskopie als direkte Methode zur Visualisierung des mikrovaskulären Strombettes der Leber wurde nach der Erstbeschreibung (Knisely 1936, 1939) zu unterschiedlichen Untersuchungszielen angewandt (Bloch 1955, Koo und Liang 1979, McCuskey 1986, Oda 1988). Durch Modifizierung des Modells trat anstelle der Trans-Illuminationstechnik die Epi-Illuminationstechnik (Gumucio 1981, Sherman und Fisher 1986), mit der eine weitere Methode bestand, nach zusätzlicher Applikation von fluoreszenzverstärkenden Farbstoffen die mikrovaskuläre Perfusionsdarstellung der quantitativen Auswertung zugänglich zu machen (McCuskey 1993, Menger et al. 1991b). Durch den parallel zur Leberoberfläche ziehenden Gefäßverlauf von Sinusoiden und postsinusoidalen Venolen können mittels der Intravitalmikroskopie Aussagen über die Mikrohäodynamik getroffen werden, in Bezug auf die sinusoidale Perfusionsrate, Sinusoidweite, mikrovaskuläre Leukozytenzahlen und Leukozyten-Endothel-Interaktion. Transillumination bietet dabei aufgrund einer erhöhten Tiefenschärfe potenziell eine Darstellung des gesamten hepatischen Mikrozirkulationssystems. Die Technik der Epi-Illumination erlaubt jedoch neben der Beurteilung von Morphologie und Perfusion des Mikrozirkulationssystems in der Leber außerdem noch die Analyse von Mechanismen auf zellulärer Ebene. Dazu zählen Leukozyten-Akkumulation, Leukozyten-Endothel-Interaktion und die Phagozytoseaktivität von Kupffer-Zellen (Menger 1991c). Da letztere Phänomene bei der Entstehung von Leberschäden eine Ursache spielen, stellt dieses Modell das zu favorisierende in der Beurteilung der Mikrozirkulation dar.

Im Vergleich zu indirekten Methoden zur Beurteilung der Lebermikrozirkulation wie z.B. der Laser-Doppler-Fluxmetrie (Arvidsson et al. 1988) kann mittels der Intravitalmikroskopie (Bloch 1955) das mikrovaskuläre Strombett der Leber direkt visualisiert und entsprechend analysiert werden. Nach der Erstbeschreibung wurde die Intravitalmikroskopie der Leber von verschiedenen Autoren mit unterschiedlichen Untersuchungszielen angewandt (Bloch 1955, Koo und Liang 1979, McCuskey 1986, Oda 1988), wobei mit Trans-Illuminationstechnik gearbeitet wurde. Benutzt man eine Epi-Illuminationstechnik kann nach Gabe von fluoreszenzverstärkenden Farbstoffen wie Natrium-Fluoreszein die mikrovaskuläre Perfusion der Leber quantitativ untersucht werden.

Ebenfalls in Epi-Illuminationstechnik kann nach Injektion von fluoreszierenden Latexpartikeln mittels der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie die Funktion der Kupfferschen Sternzellen in vivo beurteilt werden (McCuskey 1987, Post 1992, Vollmar 1994). Jedoch müssen bei dieser Methode

folgende Probleme berücksichtigt werden. Jede Kupfferzelle kann nur eine begrenzte Anzahl von Latex-Partikeln aufnehmen, d.h. es besteht die Gefahr einer Sättigung wodurch es unmöglich wäre die tatsächliche Phagozytose-Aktivität zu analysieren. Mit einer geringen Dosis an Latex-Partikeln, die weit unter der Zahl der Kupfferzellen in der Rattenleber liegt, kann man diesem Problem begegnen (Bouwens 1986). Es kann außerdem nicht ausgeschlossen werden, daß ein geringer Teil der Latex-Partikel von Endothel-Zellen aufgenommen wird. Dies kann auf ein zu vernachlässigendes Maß reduziert werden, indem Latex-Partikel mit 1,1 µm Durchmesser gewählt werden, die vorwiegend von Kupffer-Sternzellen aufgenommen werden (Praaning-Van Daalen und Knook 1982).

In eigenen Versuchen konnte keine Interferenz des intravenös applizierten Na-Fluoreszein mit den gemessenen Parametern (z.B. Gerinnungsparameter, Plasma-Glutathion) beobachtet werden. Ein photodynamischer Effekt wurde durch möglichst kurze Beobachtungszeiträume vermieden. In früheren Untersuchungen konnten für die Fluoreszenzfarbstoffe FITC-Dextran (Plasmamarker) und Rhodamin 6G (Leukozytenmarker) keinerlei phototoxische Effekte bei der IVM des quergestreiften Muskels beobachtet werden (Steinbauer 2000). Auch führten pathologische Bedingungen nicht zu einer Sensibilisierung des mikroskopierten Gewebes für phototoxische Effekte.

Allerdings erfordert die intravitale Fluoreszenzmikroskopie wie sie hier angewandt wurde einen erheblichen technischen und apparativen Aufwand.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Mechanismen des Ischämie-Reperfusionsschadens in der steatotischen Leber

Die für Leberresektionen notwendige Unterbrechung der hepatischen Durchblutung mittels Pringle-Manöver zur Minderung des operativen Blutverlustes führt ebenso zu einer Ischämie wie die zur Transplantation benötigte Extirpation und zwischenzeitliche Lagerung in einer Nährlösung. Dabei weisen Fettlebern eine deutlich verminderte Toleranz gegenüber IRS auf als die normalen Lebern. Zur Charakterisierung der hepatozellulären Integrität wurden die Aktivität des leberspezifischen Enzyms GPT bestimmt sowie licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt.

Die Intravitalmikroskopie diente als Verfahren zum Aufschluss des mikrozirkulatorischen Geschehens nach erfolgter Ischämie und Reperfusion.

Zur Darstellung der Syntheseleistung der Leber vor und nach I/R wurde die Galleproduktion herangezogen.

4.2.2 Hepatozelluläre Integrität

Unter den Leberenzymen gilt GPT als spezifischer und sensitiver Marker des hepatozellulären Schadens (Korsrud 1972, Clary 1973, Ghys 1975), während LDH leberunspezifisch ist und daher nicht mit einem hepatozellulären Schaden einhergehen muss.

Während wir bei den scheinoperierten Tieren zwischen normaler und verfetteter Leber keinen signifikanten Unterschied im Serum-GPT-Spiegel sahen, konnte nach 60-minütiger Ischämie und 120-minütiger Reperfusion ein eindrucksvoller Unterschied zwischen der normalen und der moderat verfetteten Leber festgestellt werden:

Kam es bei der normalen Leber noch zu einer etwa sechsfachen Anhebung des GPT-Levels im Serum in der Kontrollgruppe gegenüber der scheinoperierten Gruppe, so konnte bei den steatotischen Lebern eine Zunahme um das 18-fache gegenüber dem Ausgangswert beobachtet werden. Es ließ sich demnach eine deutliche Aggravation des hepatozellulären Schadens feststellen. Diese Beobachtung machten auch andere Arbeitsgruppen, ob in einem direkt vergleichbaren Modell mit Zucker-Ratten (Koneru 1995, Sun 2001) oder in anderen Fettlebermodellen (Hakamada 1997). Man kann also festhalten, dass die hepatozelluläre Integrität in moderat verfetteten Lebern gegenüber Ischämie und Reperfusion deutlich empfindlicher ist als im Modell der normalen, nicht-steatotischen Leber.

In der lichtmikroskopischen Untersuchung der histologischen Präparate von normalen und verfetteten Lebern konnte bei uns kein Unterschied hinsichtlich morphologischer Schäden festgestellt werden. Grund hierfür mag das in unserem Modell verwendete Zeitfenster von zwei Stunden Reperfusionszeit sein. Andere Arbeitsgruppen um Peralta et al. (2002) und Koneru et al. (1995) konnten nach einer Reperfusionszeit von 24 bzw. 48 Stunden eine deutliche Zunahme nekrotischer Veränderungen in steatotischen Lebern verzeichnen. Für die Beobachtung solcher Phänomene war unser Modell also nicht geeignet.

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigten allerdings auch nach zweistündiger Reperfusion bereits deutliche Veränderungen. Während normale Lebern auf Ischämie / Reperfusion mit Vakuolenbildung und Steigerung der intrazellulären Peroxisomenzahl reagierten, kam es in steatotischen Lebern neben der ebenfalls beobachteten Zunahme der Peroxisomen zu einem neuen Phänomen, einer Schwellung des sinusoidalen Endothels.

Andere Studien mit elektronenmikroskopischen Untersuchungen der Fettleber beschrieben ebenfalls morphologische Veränderungen der sinusoidalen Endothelzellen, jedoch mehr als diffuse Ablösung von den Hepatozyten und als „rounding“, also ebenfalls zunehmender Schwellung während kalter Ischämie (Nakano 1997; Fukumori 1999). Dabei ist allerdings unklar, ob diese Veränderungen primär ihren Ursprung in den Endothelzellen der Sinusoide haben oder in den ihnen benachbarten Hepatozyten. Diese gelten in normalen Lebern aufgrund ihrer ausgeprägten antioxidativen Ausstattung als relativ resistent gegen oxidativen Stress (Koneru and Dikdan 2002). In der steatotischen Leber zeigte sich jedoch eine Zunahme der Fettvakuolen und eine Abnahme der Mikrovilli während kalter Ischämie (Fukumori 1999). Diese Funde wurden dahingehend interpretiert, dass der aufgrund der in verfetteten Hepatozyten verminderten mitochondrialen Syntheseleistung bestehende ATP-Mangel zu einer Aktindepolymerisation führt (Soltys 2001). Störungen in Aktinzytoskelett und kortikalen Mikrofilamenten wiederum würden Ablösung und durch Aufhebung der osmotischen Barriere auch die Schwellung von sinusoidalen Endothelzellen erklären (Gores 1990).

Der Grund für die steigende Zahl von Peroxisomen sowohl in normalen als auch in verfetteten Lebern wird in der zunehmenden oxidativen Belastung nach Ischämie/Reperfusion gesehen. Der antioxidative Effekt der Peroxisomen beruht auf ihrem Katalasegehalt (Singh 1996). Eine weitere Aufgabe der Peroxisomen liegt in der β -Oxidation von Fettsäuren, vor allem, wenn die Kapazität mitochondrialer Oxidation überschritten wird. Da der Anteil von Fettsäuren in steatotischen Hepatozyten deutlich erhöht ist, leisten Peroxisomen einen erheblichen Anteil an deren Oxidation. Im Gegensatz zur mitochondrialen Oxidation entsteht jedoch bei der Oxidation durch Peroxisomen ein Nebenprodukt, Hydrogenperoxid, welches durch Katalase entgiftet wird (Day 1998). Wenn die Produktion von Hydrogenperoxid der Entgiftungswirkung der Katalase überwiegt, entsteht zusätzlicher chronischer oxidativer Stress (Soltys 2001, Reddy 1986).

Einige Arbeitsgruppen konnten in Fettlebermodellen zunehmende Zahlen von Produkten nachweisen, die durch Lipidperoxidation entstehen (Koneru 1995, Vendemiale 2001, Letteron 1996). Unter den Bedingungen der nicht vorgeschädigten Leber scheinen antioxidative Abwehrmechanismen mit der Peroxidation im Gleichgewicht zu stehen. In der Fettleber zeigt sich jedoch ein Überwiegen der Lipidperoxidation (Koneru 1995). Als Folge kommt es zu einem Verbrauch von Phospholipiden mit möglichen Membranschäden als Konsequenz (Reddy 1996). Darüber hinaus bestand die Vermutung, dass einige der Produkte der Lipidperoxidation chemokine Eigenschaften für neutrophile Granulozyten besitzen und letztlich Zellnekrose induzieren (Curzio 1985, Letteron 1996, Day 1998).

Dass Nekrose den wesentlichen Anteil am Zelltod in der Fettleber ausmacht und nicht die Apoptose wie es in der normalen Leber der Fall ist, wurde auch von Selzner und Mitarbeitern beobachtet (Selzner 2000). Die Hauptursache hierfür wird darin gesehen, dass Apoptose ein energieverbrauchender Mechanismus ist. In Fettlebern besteht jedoch eine eingeschränkte Fähigkeit zur Bildung von ATP. Ein Grund hierfür wird in den hohen Konzentrationen nicht-veresterter Fettsäuren gesehen, welche mit der Inhibition der β -Oxidation assoziiert werden (Fromenty 1997). Der somit durch Nekrose erfolgte Zelltod bewirkt jedoch im Gegensatz zur Apoptose eine stärkere Freisetzung zytoplasmatischer Mediatoren, die Entzündung und Zelluntergang weiter unterstützen und fördern.

Durch enzymatische Bestimmung als auch durch ultrastrukturelle Darstellung konnte eine eindrucksvolle Zunahme des durch Ischämie und Reperfusion entstandenen Schadens in der moderat verfetteten Leber im Vergleich zur nicht-steatotischen Leber nachgewiesen werden.

4.2.3 Mikrozirkulation

4.2.3.1 Sinusoidweite und -perfusionsrate

Es wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen beobachtet, dass die Akkumulation von Fett in Hepatozyten zu einem erhöhtem Zellvolumen führt (Fukuda 1982, Malewiak 1983). Teramoto und Mitarbeiter beschrieben als Folge dieser Hepatozytenschwellung eine partielle bis komplette Verlegung des sinusoidalen Raumes (Teramoto 1993a), wie andere Arbeitsgruppen bereits in den 70er Jahren (Rappaport 1970, Wada 1974).

Unsere Ergebnisse konnten dies nicht bestätigen. Trotz lichtmikroskopisch deutlich erkennbarer Zellschwellung im Fettlebermodell mit typischer Verdrängung des Nucleus an den Rand der Hepatozyten konnte in der intravitalmikroskopisch gemessenen Sinusoidweite kein signifikanter Unterschied zwischen steatotischen und nicht-steatotischen Lebern festgestellt werden. In beiden Gruppen konnte zwar eine jeweils signifikante Abnahme des sinusoidalen Durchmessers in der Kontrollgruppe gegenüber der scheinoperierten Gruppe festgehalten werden. Aber auch zwischen den Kontrollgruppen verfetteter und normaler Lebern bestand kein Unterschied in der Sinusoidweite.

Diese Beobachtung machten auch andere experimentelle Gruppen, die mit dem Modell der Zucker-Ratten arbeiteten (Sato 1986, Sun 2001). Mögliche Ursachen für die unterschiedlichen Ergebnissen

in Hinblick auf den sinusoidalen Durchmesser können zum Einen in der Wahl des Fettlebermodells liegen und zum Anderen in den jeweiligen Verfettungsgraden dieser Lebern.

So wurden beispielsweise in den Studien, die eine Verengung des sinusoidalen Raumes in steatotischen Lebern feststellten, jeweils CMDD-Fettlebermodelle für die Versuche genutzt (Wada 1974, Teramoto 1993a). Mit der Cholin-Methionin-defizitären Diät wurden dabei hohe Steatosegrade mit Verfettungsgraden von über 60% beobachtet, bei Hakamada et al. hatten 75% der Hepatozyten Fetteinschlüsse. Die dabei beobachtete Kompression und Verzerrung des sinusoidalen Lumens wurde allein durch das Vorliegen der fettigen Veränderung erklärt (Hakamada 1997). Neben den unterschiedlichen Verfettungsgraden und deren Auswirkung auf die Morphologie der Hepatozyten ist ein weiterer bereits angesprochener Nachteil dieses Tiermodells die entzündliche Komponente, die an der Induktion dieser Fettlebern beteiligt ist (Koneru 1995). So könnte an der Entstehung dieser Leberzellschwellung mit all ihren Konsequenzen auch eine inflammatorische Ursache beteiligt sein, ob nun primär oder sekundär.

Letztlich ist hier eine ausgeprägtere hepatozelluläre Schwellung mit daraus resultierender Sinusoidweitenbeeinträchtigung nachvollziehbar, wobei über deren alleinige Entstehung durch Ischämie/ Reperfusion sicherlich diskutiert werden darf. In unserem Fettlebermodell mit moderater Steatosis ließ sich jedenfalls keine zusätzliche Beeinträchtigung der Sinusoidweite im Vergleich zur normalen Leber feststellen.

4.2.3.2 Sinusoidale Perfusionsrate

Bei der Auswertung des regionalen Blutflusses in hepatischen Sinusoiden fand sich ebenfalls kein Unterschied zwischen verfetteten und normalen Lebern. In beiden Gruppen konnte zwar in den Kontrollreihen eine drastische Verschlechterung der sinusoidalen Durchblutung gegenüber der scheinoperierten Gruppe beobachtet werden, der Grad der Verfettung hatte hierauf jedoch keinen Einfluss.

Andere Arbeitsgruppen beschrieben deutliche Unterschiede in der sinusoidalen Perfusionsrate zwischen normalen und steatotischen Lebern. Dabei handelte es sich wieder um Rattenmodelle, deren Fettleberinduktion auf diätetischer Basis beruhte. So fanden Seifalian et al. unter Verwendung eines Laserdopplers eine Halbierung der sinusoidalen Durchblutung bei Lebern mit 30-60%iger Verfettung im Vergleich zu normalen Lebern (Seifalian1999). Dieses Phänomen erklärte man sich durch die bei einigen Autoren gefundene Abnahme der Sinusoidweite, wie bereits zuvor erwähnt. Ohhara und Mitarbeiter berichteten von einer Abnahme der Sinusoidweite um 50% bei Vorliegen

von Hepatosteatoses im Vergleich zur normalen Leber (Ohhara 1989). Wada et al. fanden eine Erhöhung des portalen Druckes bei Vorliegen einer höhergradigen Fettleber (Wada 1974).

Jüngere Untersuchungen bestätigen jedoch unsere Ergebnisse. Jeweils am Modell der Zuckerratte stellte sich zwischen normalen und verfetteten Lebern im Pfortaderdruck und in der hepatischen Perfusion kein signifikanter Unterschied dar (Selzner 2000, Seifalian 2002). Die hepatische moderate Verfettung hat also weder auf Sinusoidweite noch auf sinusoidale Perfusionsverhältnisse einen Einfluss in der frühen Reperfusionphase.

Auch wenn die Perfusionsverhältnisse unabhängig vom Steatosegrad der Leber sind, so entstehen unbestritten Einschränkungen im Durchblutungszustand nach erfolgter Ischämie und Reperfusion. In Kapitel 1.1 der Einleitung wurde darauf hingewiesen, dass es bereits in der Ischämiephase hypoxie-bedingt zu einer verminderten mitochondrialen Synthese energiereicher Phosphatverbindungen wie dem ATP kommt (Gutierrez 1991, Kerrigan 1993). Der ATP-Mangel macht sich beispielsweise am Elektrolytaustausch bemerkbar, da den ATP-abhängigen Na^+/K^+ -Kanäle entlang der basalen Zellmembran die notwendige Energie fehlt, um den osmotischen Gradienten aufrecht zu erhalten. Dadurch kommt es zu einer Verschiebung von Elektrolyten und folglich auch Wasser in die Zelle, resultierend in einer Zellschwellung, die vor allem in der Endothelzelle beobachtet worden ist (Leaf 1973, Silver 1977). Gleichzeitig zieht Hypoxie eine Azidose nach sich, welche die viscoelastischen Eigenschaften von Leukozyten beeinträchtigt und damit zu einer Obstruktion von Kapillaren führt (Schmid-Schönbein 1987).

Der in der Ischämiephase entstandene Gewebeschaden mit Zellschwellung, eingeschränkter Kapillarperfusion und mikrovaskulärer Thrombose führt folglich zu dem als „no-reflow phenomenon“ bekannten Geschehen, bei welchem es auch nach einsetzender Reperfusion zum Fortbestehen der Hypoxie und deren Folgen kommt (Menger 1988, Menger 1989, Menger 1992d).

Durch die Reoxygenierung ischämischer Gebiete in der Reperfusionphase entstehen im sauerstoffreichen Blut Metabolite, die zu einer erhöhten Freisetzung freier Sauerstoffradikale führen. Freie Sauerstoffradikale oder deren Metabolite (Superoxidanionen, Hydroxylanionen, Hydrogenperoxid) gelten als toxisch, indem sie durch Lipidperoxidation Membran- und folglich auch Gewebeschäden induzieren (McCord 1985). Diese Gewebeschäden werden gleichzeitig durch den auf Proteine denaturierend wirkenden Mechanismus von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS) unterstützt (Jaeschke 1995, Jaeschke 1997). Auf die Rolle der ROS soll später nochmals eingegangen werden.

Infolge dieser ROS-Bildung kommt es zum Phänomen des „reflow-paradox“, wo es im Gegensatz zum „no-reflow“ zwar zu einer Reperfusion und dadurch Reoxygenierung des Gewebes kommt, diese allerdings durch oben beschriebene Mechanismen zu einer inflammatorischen

Leukozytenreaktion mit vermehrter Akkumulation und Adhärenz von Leukozyten, erhöhter mikrovaskulärer Permeabilität, weiterer Bildung von Sauerstoffradikalen mit Freisetzung einer Reihe potenter Mediatoren, und letztlich zu postischämischen Gewebeschäden durch Lipidperoxidation und Membrandesintegration (Menger 1991a, Jaescke 1990b, Vollmar 1994). Unseren Ergebnissen zufolge geschieht dies in normalen und moderat verfetteten Lebern in annähernd gleichen Maßen.

4.2.3.3 Leukozyten-Endothel-Interaktion in hepatischen Sinusoiden und postsinusoidalen Venolen

Die Akkumulation von Leukozyten in Mikrogefäßen nach I/R ist mehrfach demonstriert worden (Del Maestro 1982, Granger 1989, Menger 1992b). In unserem Modell zeigte sich in den Kontrollgruppen von normalen und verfetteten Lebern jeweils ein deutlicher Anstieg der Sticker sowohl in Sinusoiden als auch in PSV gegenüber den scheinoperierten Tieren. Allerdings ließ sich dabei im direkten Vergleich normaler und verfetteter Lebern erneut kein signifikanter Unterschied im Auftreten von permanent adhärenenten Leukozyten („Sticker“) in Sinusoiden und PSV aufzeigen. Auch in der Anzahl der temporär adhärenenten Leukozyten, den „Rollern“, kam es zu vergleichbaren Ergebnissen. Lediglich im Verhältnis der Adhärenz permanenter zu temporären Leukozyten konnte zwischen normalen und steatotischen Lebern ein signifikanter Unterschied aufgewiesen werden. Das in normalen Kontrolltieren praktisch ausgeglichene Sticker- zu Roller-Verhältnis richtete sich bei den verfetteten Kontrolltieren signifikant zugunsten der Sticker aus (siehe auch Abb.3.12).

Dieses Phänomen ist in der Literatur noch nicht beschrieben worden. Ansonsten decken sich unsere Ergebnisse jedoch mit denen anderer Arbeitsgruppen. So folgerten auch Koneru et al. und Sun et al., dass die Leukozytenadhärenz in der Leber unabhängig von deren Verfettungsgrad ist und nicht als Erklärung für den höheren hepatischen Schaden nach I/R in Frage kommt (Sun 2001, Koneru 1995).

Dass die erhöhte Leukozytenadhäsion in beiden Kontrollgruppen, also normaler und verfetteter Lebern beobachtet wurde, lässt sich demnach mit bisherigen Forschungsergebnissen vereinbaren und stützt die Theorie, dass die Leukozytenadhärenz zum IRS beiträgt (Vollmar 1995).

Der der erhöhten Leukozytenadhärenz zugrundeliegende Pathomechanismus scheint dabei inflammatorischen Ursprungs zu sein (Granger 1994).

Während der frühen Reperfusionphase sind zwei Formen der Leukozyten-Endothel-Interaktion zu beobachten:

- eine *temporäre* Adhärenz am mikrovaskulären Endothel („Roller“),
- eine *permanente* Adhärenz der Leukozyten am Endothel von Sinusoiden und postsinusoidalen Venolen („Sticker“).

Als Roller werden diejenigen Leukozyten definiert, welche aufgrund von Margination und Endothelkontakt eine gegenüber dem Zentralstrom deutlich reduzierte Flussgeschwindigkeit aufweisen (Zeintl 1986, Menger 1992). Als Sticker werden diejenigen Leukozyten bezeichnet, die länger als 20 Sekunden ohne Positionsänderung dem Endothel anhaften.

Die Adhäsion der Leukozyten am Endothel lässt sich demnach in drei Schritte aufgliedern. Nach einer initialen lockeren Interaktion zwischen Endothel und PMN („rolling“) findet eine Aktivierung der PMN mit anschließender fester Bindung („sticking“) und schließlich eine Emigration in das perivaskuläre Gewebe statt. Die der Leukozyten-Endothel-Interaktion zugrunde liegenden Mechanismen scheinen jedoch unterschiedlich zwischen sinusoidalem Endothel und postsinusoidalem Endothel.

Der Adhäsionsprozeß an postsinusoidalen Venolen wird im wesentlichen über Oberflächenrezeptoren des Endothels und der Leukozyten vermittelt. Auf Endothelseite dient dabei das P-Selektin zur initialen Leukozyten-Endothel-Interaktion („rolling“) (Sawaya 1999). An der Oberfläche der Leukozyten befinden sich L-Selektin und β_2 -Integrine (CD11/CD18) (Granger 1994). Bis zu diesem Stadium bleibt die Adhärenz temporär und passiv. Erst nach der Aktivierung von Endothelzellen und zirkulierenden PMN durch proinflammatorische Mediatoren wie Superoxid, Histamin, Platelet activating factor (PAF), Endothelin, Interleukin-8 (IL-8) und Leukotrien B₄ (LTB₄) kommt es zum Übergang der temporären in eine permanente Adhärenz (Lehr 1991, Springer 1994, Jaeschke 1996). Die Ausschüttung dieser Mediatoren erfolgt einerseits aus den Endothelzellen selbst oder aus glatten Gefäßmuskulzellen. An der Ausbildung der permanenten Adhärenz sind dabei β_2 -Integrine auf den Leukozyten und ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) auf den Endothelzellen beteiligt (Kishimoto 1992).

Die adhärennten Leukozyten können nun über die Ausbildung von Pseudopodien das Gefäß verlassen und in den subendothelialen Raum und schließlich in das umgebende Gewebe emigrieren (Granger 1994). Dieser komplexe Vorgang der Adhäsion und Transmigration wird dabei wesentlich von Zytokinen (z.B. IL-1 und IL-8) mitbestimmt (Lentsch 1998). Die so in das Leberparenchym gelangten PMN prägen entscheidend das Bild in der späteren Reperfusionphase: Proteasen (z.B. Elastase, Cathepsin G, Kollagenase) und Sauerstoffradikale der PMN schädigen oder zerstören die Hepatozyten und führen letztendlich zu einer Organdysfunktion (Li 1993). Die Hypothese eines PMN-induzierten Reperfusionsschadens wurde bekräftigt durch die Tatsache, daß durch eine

Inhibition der PMN-Funktion der Reperfusionsschaden verringert werden konnte (Hernandez 1987, Vollmar 1995). Der von uns verwendeten Zeitrahmen von zwei Stunden Reperfuionszeit war für diese Phänomene freilich zu früh gewählt, weshalb wir uns auf den frühen Reperfusionsschaden beschränken mussten.

In den Sinusoiden spielt sich die Leukozyten-Endothel-Interaktion anders ab. Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 und P-Selektin scheinen hier keine Rolle zu spielen:

Die sinusoidalen Endothelzellen exprimieren weder unter physiologischen Bedingungen noch nach deren Aktivierung P-Selektin an der Zelloberfläche (Steinhoff 1993). Eine fehlende Expression von P-Selektin in den sinusoidalen Endothelzellen könnte erklären, warum es hier kein „rolling“ von Leukozyten gibt (Steinhoff 1993, Vollmar 1995). Andere Studien sahen jedoch eine mögliche Beteiligung des P-Selektins am IRS in den Sinusoiden in endothelunabhängigen Prozessen wie beispielsweise einer Triggerung der Thrombozyten-Leukozyten-Aggregation (Kurose 1994, Okada 1994).

Am in vivo Experiment mit monoklonalen Antikörpern gegen ICAM-1 konnte nur die Zahl der postischämischen Leukozytenadhäsion in Venolen verringert werden, nicht jedoch in Sinusoiden (Vollmar 1995). Da gleichzeitig durch die Blockade von ICAM-1 auch der hepatozelluläre Schaden signifikant gemindert werden konnte wurde vermutet, dass eine leukozytäre Interaktion mit Endothel in Venolen mehr zum IRS beiträgt als in hepatischen Sinusoiden.

Als andere Mechanismen für die Leukozytenadhärenz in den Sinusoiden wurden die Veränderungen der mikrovaskulären Bedingungen, der physiologisch gewundene Aufbau der Sinusoide und eine Schwellung der Endothelzellen diskutiert (Komatsu 1990, Vollmar 1994). Dies erklärt die Beobachtung, dass die sinusoidale Leukozytenadhärenz hauptsächlich in den periportalen und midzonalen Bereichen, die den kleinsten Durchmesser haben, vorgefunden wird.

Zusammenfassend ist also festzuhalten, dass Leukozyten-Endothelinteraktion nach I/R eher in PSV einen Einfluss auf die Höhe des IRS hat. Dabei scheinen die pathophysiologischen Mechanismen unabhängig vom Verfettungsgrad der Leber zur Geltung zu kommen.

Die Frage, warum in der steatotischen Leber das Sticker/Roller Verhältnis zugunsten der Sticker verschoben wird, bleibt noch zu klären. Eine mögliche Antwort könnte die in der Elektronenmikroskopie nur in der Kontrollgruppe der verfetteten Lebern beobachtete Endothelzellschwellung sein. Eine daraus resultierende Vergrößerung der Endothelfläche könnte eine Interaktion mit Leukozyten begünstigen, mögliche morphologische Veränderungen der Endothelzellen eine permanente Adhäsion begünstigen. Außerdem könnte eine vermehrte

Expression von Adhäsionsmolekülen auf den Endothelzellen steatotischer Lebern eine permanente Anlagerung begünstigen. Inwieweit diese bei Fettlebern anders ausgeprägt ist als bei normalen Lebern ist zum heutigen Zeitpunkt jedoch nicht geklärt.

4.2.3.4 Phagozytoseaktivität von Kupffer-Stern-Zellen

Die Kupfferschen Sternzellen (KC) kommunizieren mit den Sinusendothelzellen und Hepatozyten über ihre Fortsätze und üben wichtige Schutzfunktionen durch Phagozytose von Bakterien, Parasiten und Tumorzellen aus. Durch dabei freigesetzte Mediatoren kommt es zu einer Aktivierung von KC. Als weitere Ursachen hierfür gelten neben bakteriellen Endotoxine (LPS) auch Hypoxie und Komplementaktivierung (Ertel 1995, Jaeschke 1993). Eine Blockade von Kupffer-Sternzellen (KC) durch Gadolinium-Chlorid konnte diese akute Schädigung vermindern und die Beteiligung von KC am Mikrozirkulationsschaden aufweisen (Bremer 1994, Liu 1995, Schauer 1999).

Es gibt viele Studien, die eine Aktivierung von KC als einen zentralen Pathomechanismus des frühen Reperfusionsschadens in der Leber nach warmer (Jaeschke 1991a und 1991c; Vollmar 1996) und kalter Ischämie (Caldwell-Kenkel 1991, Mochida 1994, Brass 1995) sehen. Dabei kann allein eine Hypoxie mit nachfolgender Reperfusion zur KC-Aktivierung genügen (Ryma 1991), durch Komplementaktivierung konnte dies *in vivo* weiter verstärkt werden (Jaeschke 1993). Neben der Produktion von ROS (Jaeschke 1991c; Brass 1995) spielen auch noch andere pro-inflammatorische Mediatoren wie Zytokine (TNF- α , IL-1, IL-6), Eicosanoide, platelet activating factor (PAF), vasokonstriktorische Substanzen (Prostaglandine und Leukotriene) eine Rolle und führen darüberhinaus zu einer Aktivierung leukozytärer Proteasen und Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B und Aktivator-Protein-1 in Endothelzellen und Hepatozyten (Lemasters 1995, Vollmar 1994b, Wanner 1996, Le Moine 1997; Bilzer und Gerbes 2000). Diese Mechanismen führen zu einer sinusoidalen Akkumulation von Granulozyten und einem Versagen der Mikrozirkulation (Clemens 1997, Jaeschke 1996, Wanner 1996). Auch extrahepatische Mechanismen können zu einer KC-Aktivierung und subsequenter Gefäßentzündung führen, zum Beispiel durch Endotoxine (Jaeschke 1996, McCuskey 1996). Es wird vermutet, dass diese als Konsequenz der intestinalen Kongestion nach Pfortaderverschluss vermehrt freigesetzt werden (Urata 1998) und auch zu primärer Nonfunktion des Spenderorgans nach Transplantation führen kann (Peng 1995).

Welche Substanzen für die Freisetzung dieser pro-inflammatorischen Mediatoren aus KC letztendlich verantwortlich sind, bleibt weiterhin kontrovers diskutiert (Scales 1994, Jaeschke 1994, Scoazec 1997). Eindeutig etabliert ist aber der Zusammenhang zwischen der Entstehung von ROS

in der frühen Phase der Reperfusion und dem Ausmaß der Leberzell-Nekrose (Jaeschke 1993, Bremer 1994).

Zur Beurteilung der Bedeutung der KC-Aktivität auf den frühen Reperfusionsschaden in moderat verfetteten Lebern erfolgte in unserem Modell die intravitale fluoreszenzmikroskopische Auswertung durch Injektion von Latexpartikeln (Post 1992). Dadurch ließ sich eine direkte Visualisierung und Analyse der Phagozytoseaktivität der KC ermöglichen. Dabei gilt zu beachten, dass in Voruntersuchungen zwei Drittel der KC in den periportal Segmenten der Leber zu finden waren (Post 1992, Rüttinger 1996).

Unsere Ergebnisse zeigten dabei einen vom Verfettungsgrad abhängigen unterschiedlichen Grad der Phagozytose-Aktivität von KC. Während nicht-steatotische, normale Lebern nach Ischämie / Reperfusion keine signifikante Abnahme frei fließender, d. h. nicht-phagozytierter Latexpartikel aufwiesen (s. Abb. 3.14-1), war dieser Anteil an nicht-phagozytierten Latexpartikel in verfetteten Lebern signifikant abgesenkt (siehe Abbildung 3.14-2). Dies wurde dahingehend interpretiert, dass in steatotischen Lebern nach I / R eine erhöhte Anzahl aktivierter KC vorgefunden werden kann als in normalen Lebern.

In früheren Studien wurden ähnliche Beobachtungen gemacht. Teramoto et al. (1993a) beobachtete an einem Fettlebermodell mit kalter Ischämie ebenfalls erhöhte Phagozytoseaktivitäten der KC. Als Schlussfolgerung gilt daher, dass eine erhöhte Zahl an aktivierten KC einen wesentlichen Faktor für die Verstärkung des IRS in verfetteten Lebern darstellt.

4.2.4 Hepatozelluläre Funktion - Galleproduktion

Zur Beurteilung der hepatozellulären Funktion wird die Galleproduktion als geeignetster Parameter angesehen (Bowers 1987; Lee und Clark 1977). Wie in Kapitel 2.5.5 beschrieben wurde hierzu ein Katheter in den Ductus choledochus eingeführt und nach Protokoll zu festen Zeitintervallen die gesammelte Gallenmenge gemessen.

Unsere Ergebnisse können dabei nach zwei Phasen beurteilt werden. Da die Galleproduktion in verfetteten Lebern bereits in scheinoperierten Tieren im Verhältnis zur normalen Leber vermindert war, wurde dabei für einen anschaulicheren Vergleich die Flussrate der Galle im Verhältnis zur initial gemessenen Galleproduktion zu Versuchsbeginn gesehen.

In der Phase der einstündigen Ischämie konnte eine deutliche Reduktion der Galleproduktion gegenüber den Werten bei scheinoperierten Tieren beobachtet werden. Dies war sowohl bei normalen Tieren der Fall als auch bei den verfetteten, ohne signifikante Unterschiede. In der Reperusionsphase hingegen stellte sich ein vom Steatosegrad abhängiger Unterschied heraus:

während die Galleflussrate in der normalen, nichtverfetteten Leber sich mit zunehmender Reperfusionzeit zumindest leicht erholte, blieb das Level der Galleproduktion in der verfetteten Leber in den zwei Stunden der Reperfusion auf einem niedrigeren Niveau.

Eine andere Studie mit Zucker-Fat-Ratten, allerdings an einem Modell mit kalter Ischämie, berichtete von ähnlichen Ergebnissen. Nach 30 Minuten kalter Ischämie und 90 Minuten Reperfusion wurde von Taneja et al. in normalen Lebern eine dreifach höhere Galleproduktion gemessen als im gleichen Zeitraum bei verfetteten Lebern (Taneja 1998). Jedoch wurde in einem zweiten Zeitfenster von 24 Stunden Reperfusionzeit eine Annäherung der Galleproduktion der normalen Leber an die konstant schlecht bleibenden Werte der verfetteten Leber festgestellt. Eine weitere Arbeitsgruppe stellte nach einer Reperfusionzeit von sechs bzw. 24 Stunden ebenfalls eine Abnahme des Galleflusses gegenüber den präischämischen Werten fest und beobachteten dabei keine signifikanten Unterschiede zwischen normalen und verfetteten Lebern (Teramoto 1993a).

Bei den von uns gefundenen Resultaten scheint es sich also um einen Mechanismus in der frühen Reperusionsphase zu handeln, der nur bei nichtverfetteten Lebern zur Entfaltung kommt. Eine mögliche Erklärung dafür liegt im ATP-Gehalt der Hepatozyten. Die Galleproduktion ist ein energieverbrauchender Mechanismus (Sumimoto 1988). Wie bereits berichtet ist der ATP-Gehalt in Fettlebern vermindert, was das Ausbleiben der Galleproduktionserholung bei steatotischen Lebern erklärt. Scheinbar werden in normalen Lebern diese ATP-Reserven jedoch schnell aufgebraucht oder für andere Mechanismen zur Verfügung gestellt.

4.2.5 Die Rolle von ROS am IRS

Aufgrund vielfacher Studien mit antioxidativen Substanzen wie Superoxid-Dismutase und Katalase ist davon auszugehen, dass reaktive Sauerstoffspezies (ROS) in der Pathophysiologie des hepatischen Reperfusionsschaden eine Rolle spielen (Jaeschke 1995). Auch wenn an der Bildung von ROS das zytosolische Enzym Xanthinoxidase und Mitochondrien in geschädigten Hepatozyten beteiligt sein können (Jaeschke und Mitchell 1989), entsteht der relevante oxidative Stress intravaskulär und wird vornehmlich von Kupffer-Zellen gebildet (Jaeschke und Farhood 1991c; Brass 1995). Erst im weiteren Verlauf nach einigen Stunden kommt es auch durch akkumulierte neutrophile Granulozyten zur Genese von ROS (Jaeschke 1992). Diese entscheidende Rolle an der Entstehung des frühen oxidativen Stress durch aktivierte Kupffer-Zellen und des späten oxidativen Stress durch Neutrophile wurde in mehreren in vivo Modellen durch den protektiven Effekt der funktionellen Inhibierung dieser Entzündungszellen demonstriert (Jaeschke und Farhood 1991c, Liu

1995, Jaeschke 1993). Trotz dieser Beobachtungen wird weiterhin diskutiert, wie der durch ROS vermittelte Zellschaden zustande kommt. Lipidperoxidation ist quantitativ nicht ausgeprägt genug, um den Reperfusionsschaden in seinen beobachteten Ausmaßen erklären zu können (Mathews 1994). So werden auch anderen Mechanismen eine Beteiligung am Reperfusionsschaden durch ROS zugewiesen, unter anderem der oxidativen Inaktivierung von plasmatischen Antiproteasen (Jaeschke 1995 und 1997). Neuere Untersuchungen halten eine Beteiligung von durch Kupfer-Zellen gebildeten ROS an der Initiierung von endothelialer Apoptose (Motoyama 1998) und hepatozellulärer Nekrose für möglich (Bilzer 1999).

4.2.5.1 Rolle von ROS in normalen Lebern

Die Wirkung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) auf die Entwicklung vor allem von Reperfusionsschäden in der normalen Leber ist mehrfach beobachtet worden. Der Nachweis erfolgte entweder direkt durch Messung reaktiver O₂-Spezies (Brass 1995; Nunes 1995) und deren Oxidationsprodukte wie Glutathiondisulfid (GSSG) (Metzger 1988, Jaeschke 1991c) und Malondialdehyd (Mathews 1994), oder indirekt durch die Schutzwirkung von Antioxidantien wie SOD (Atalla 1985), Katalase (Nauta 1990), Vitamin E (Marubayashi 1986) und Glutathion-Gabe (Bilzer 1999b, Schauer 1999, 2004a und 2004b). Als Hauptquelle für die Bildung von ROS werden neben Hepatozyten, Endothelzellen und PMN vor allem die Kupfer-Zellen betrachtet (Essani 1996, 1997a und 1997b).

ROS werden dabei in den intrazellulären und extrazellulären Kompartimenten der Leber produziert, scheinen sich dabei aber unterschiedlich auf IRS auszuwirken. Intrazellulär werden Superoxidanionen in Endothelzellen hauptsächlich durch Xanthinoxidase (Engerson 1987), in Hepatozyten zusätzlich noch durch die mitochondriale Atmungskette gebildet (Jaeschke 1989). Neuere Untersuchungen zeigen jedoch keinen intrazellulären Xanthin-Oxidase-Anstieg nach Ischämie-Reperfusion der Leber (Kooij 1994, Frederiks 1996). An der perfundierten Rattenleber konnten außerdem nahezu unveränderte intrazelluläre Glutathiondisulfid (GSSG)-Gehalte nach normothermer Ischämie-Reperfusion gezeigt werden (Metzger 1988; Jaeschke 1988). Eine vermehrte ROS-Produktion, die mit einer Erhöhung der intrazellulären GSSG-Konzentration einhergeht, war damit nicht nachweisbar. Die Applikation hoher Oxidantien-Konzentrationen während der Leberreperfusion konnte ebenfalls zu keinen zusätzlichen Leberzellschäden führen (Jaeschke 1988). Diese Ergebnisse zeigen das enorme antioxidative Potential der Leberzelle auch während der Reperusionsphase auf. Die in früheren Studien nachgewiesene intrazelluläre ROS-Produktion kann deshalb höchstens in geringem Ausmaß für Reperfusionsschäden verantwortlich

sein. Sinusoidale Endothelzellen, die über geringere antioxidative Enzym Spiegel verfügen bei gleichzeitig erhöhter Xanthin-Oxidase-Konzentration, könnten gegenüber der Bildung reaktiver O₂-Spezies während der Reperfusion empfindlicher sein (Frederiks 1993; Hamer 1995).

Die Bildung von extrazellulären ROS, also im vaskulären Raum der Leber, wird hingegen als wichtiger Pathomechanismus des hepatischen Reperfusionsschadens nach warmer und auch kalter Ischämie gesehen (Jaeschke 1991c, Nunes 1995). So beobachtete Jaeschke nach normothermer Ischämie-Reperfusion der normalen Rattenleber unveränderte intrazelluläre GSSG-Gehalte bei drastischen Zunahmen der Plasma-GSSG-Konzentration. Da durch Blockade von Kupffer-Zellen die Plasma-GSSG-Konzentration reduzierbar war und umgekehrt durch Aktivierung der KC diese erhöht werden konnte, wurde der vaskuläre oxidative Stress auf aktivierte Kupffer-Zellen zurückgeführt (Jaeschke 1991a und 1991c). Hierfür scheint die Aktivierung der NADPH-Oxidase in der Plasmamembran Kupffer'scher Sternzellen verantwortlich (Jaeschke 1991a), die Superoxidradikale in die Lebersinusoiden freisetzt. Dabei wurde eine gesteigerte Aktivierung der Kupffer-Zellen durch Hypoxie-Phasen mit anschließender Reoxygenierung ausgelöst (Ryma 1991).

Weitere Produzenten reaktiver Sauerstoffspezies im Vaskulärraum wurden in neutrophilen Granulozyten gesehen, die während der Reperfusion in den Lebersinusoiden akkumulieren (Jaeschke 1991 a und 1991c). Auch hier beruht die Freisetzung von Superoxidanionen auf einer membranständigen NADPH-Oxidase. Aktivierte neutrophile Granulozyten induzieren in der perfundierten Rattenleber Zellschäden, die durch ROS-Bildung erklärt werden können (Bilzer 1994).

Die Freisetzung von Xanthin-Dehydrogenase während der Reperfusion mit anschließender Konversion zur Xanthin-Oxidase wird zwar als weitere Quelle extrazellulärer ROS-Produktion angenommen (Yokoyama 1990, Frederiks 1996), jedoch wird ihr aufgrund der sehr geringen Plasmakonzentration eine eher unbedeutende Rolle zugewiesen (Saugstad 1984, Parks 1988).

Beim zugrunde liegenden Pathomechanismus scheint weniger die direkte Toxizität der ROS auf die Lipidperoxidation, DNA- und Proteindenaturation eine Rolle zu spielen als vielmehr deren Wirkung auf bestimmte Signaltransduktionsprozesse (Mathews 1994). Eine stimulierende Wirkung von ROS auf die Sekretion von platelet activating factor (PAF), Interleukine und TNF α aus Endothelzellen und Monozyten wurde festgestellt (Zhou 1992, Le Moine 1997). Die ROS-vermittelte Freisetzung dieser Mediatoren erfolgt dabei durch Aktivierung redoxsensitiver Transkriptionsfaktoren wie activator protein-1 (AP-1) und NF- κ B (Bradham CA Hepatology 1997; LeMoine 1997). Beiden Faktoren werden jedoch in der Literatur sowohl proinflammatorische (Baeuerle 1994) als auch

protektive und regenerative Funktionen zugeschrieben (Westwick 1995, Taub 1996). Hier bedarf es also weiterer Klärung.

Neuere Ergebnisse lassen einen Einfluss von Kupffer-Zellen gebildeten ROS auf die Apoptose von Endothelzellen und Nekrose von Leberzellen vermuten (Motoyama 1998, Bilzer 1999).

4.2.5.2 Die Bedeutung von ROS in verfetteten Lebern

Für die Detoxifikation von reaktiven Sauerstoffspezies benötigt die Leber antioxidative Mechanismen wie in 2.5.6.1 aufgeführt. Entstandene Superoxidanionen (O_2^-) werden intrazellulär enzymatisch via Superoxid Dismutase (SOD) zu H_2O_2 umgewandelt. H_2O_2 -Detoxifikation kann entweder durch Katalase in Peroxisomen erfolgen, wobei Wasser entsteht, oder durch Glutathion (GSH)-Peroxidase, wobei oxidiertes Glutathion entsteht (GSSG). Fehlen diese antioxidativen Abwehrmechanismen, wird H_2O_2 über einen eisenabhängigen Mechanismus zu dem extrem toxischen Hydroxyl-Radikal umgewandelt ($OH\cdot$). In der normalen Leber liegt die intrazelluläre GSH-Konzentration jedoch im millimolaren Bereich sehr hoch im Vergleich zu den mykromolaren GSH-Spiegeln im Plasma (Lauterburg 1984b). Da der normale, nichtverfettete Hepatozyt auch über ausreichend Peroxisomen und Katalase verfügt, erklärt dies seine mehrfach beobachtete Resistenz gegenüber oxidativen Stress.

Der verfettete Hepatozyt zeigt gegenüber der normalen Leberzelle verminderte antioxidative Ressourcen. So konnten Soltys et al. im Zucker-Ratten-Modell im Vergleich zu normalen Lebern bei verfetteten Lebern sowohl einen verminderten intrazellulären GSH-Gehalt als auch reduzierte Katalase-Aktivitäten beobachten (Soltys 2001). Desweiteren wurden verminderte mitochondriale GSH-Werte in steatotischen Lebern gemessen als es in normalen Lebern der Fall war (Nakano 1998). Hierfür scheinen Mechanismen verantwortlich zu sein, welche die antioxidative Reserven der verfetteten Leberzelle aufbrauchen oder/ und die Produktion von ROS fördern. So führt ein gesteigerter Gehalt an freien Fettsäuren in steatotischen Hepatozyten zu einem erhöhten Verbrauch selbiger. Dabei entstehen in der mitochondrialen Atmungskette wieder ROS (Rashid 1999). Als weiteres Charakteristikum verfetteter Lebern gilt eine vermehrte Anzahl von Kupffer-Zellen (Teramoto 1993b), welche zu den potentesten Produktionsstätten von ROS zählen.

Infolge eines noch kaum geklärten Verbrauchs der antioxidativen Verteidigungsmechanismen der Leberzellen und einer erhöhten ROS-Produktion ließe sich auch die gesteigerte Empfindlichkeit der verfetteten Leber gegenüber IRS erklären. So stellten Koneru et al. in verfetteten Lebern im Vergleich zu normalen Lebern erhöhte Spiegel bei der Lipidperoxidation fest (Koneru 1995).

In unserem Modell zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im intrazellulären GSH-Gehalt zwischen scheinoperierten normalen und verfetteten Lebern.

Auch nach I/R kam es in beiden Gruppen zu keiner signifikanten Abnahme der GSH-Konzentration gegenüber den scheinoperierten Tieren. Eine Verschlechterung des intrazellulären GSH-Gehaltes in steatotischen Lebern gegenüber den normalen Lebern konnte ebenfalls nicht festgestellt werden. Bei den normalen Lebern zeigte sich sogar eine signifikant erniedrigte GSH-Konzentration im geschädigten linken Lappen gegenüber dem nicht-ischämischen rechten Leberlappen. In der Steatosegruppe konnte dies nicht beobachtet werden. Eine Begründung für die Diskrepanz zu den übrigen in der Literatur gefundenen Ergebnissen sehen wir vor allem in der Verwendung des moderat verfetteten Lebermodells sowie in der frühen Beobachtungszeit von zwei Stunden Reperfusion. Zum Vergleich verwendeten Soltys et al. Zucker-Ratten mit einem Gewicht von 480-560 g und damit einen höheren Steatosegrad der Leber.

Auch im extrazellulären Kompartiment ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen verfetteten und normalen Lebern beobachten, weder in der GSH-Konzentration noch in der GSSG-Konzentration.

Zum Zeitpunkt der frühen Reperfusion konnte folglich im moderaten Steatosemodell kein erhöhter Anteil gebildeter bzw. verbrauchter ROS nachgewiesen werden. Für den festgestellten gesteigerten Schaden in steatotischen Lebern müssen demnach andere Mechanismen verantwortlich sein.

4.3 Ischämische Präkonditionierung als protektive Strategie gegen den frühen Ischämie-/ Reperfusionsschaden in der normalen und moderat verfetteten Leber

Der Begriff der Ischämischen Präkonditionierung wurde 1986 von Murry und Mitarbeitern eingeführt (Murry 1986). Er umschreibt das Phänomen der endogenen Organkonditionierung gegen ischämischen Stress durch der Ischämie vorangehende, kurze Episoden von Ischämie und Reperfusion am Myokard. Dieses Phänomen ist inzwischen auch in anderen Organen als wirksam festgestellt worden, u.a. auch der Leber. Sowohl in Versuchen mit warmer als auch kalter Ischämie zeigten sich kurze Perioden von I/R von 5-10 Minuten Dauer vor einer längeren ischämischen Periode als wirksame protektive Strategie, um den IRS deutlich zu vermindern (Lloris-Carsi 1993, Peralta 1997, Yin 1998, Arai 1999). Dies konnte bislang sowohl in experimentellen als auch jüngst in klinischen Studien nachgewiesen werden (Chouker 2004).

Unsere Studie sollte nun die Anwendbarkeit der IPC auf moderat vorgeschädigte Lebern untersuchen. Hierzu wurden die hepatozelluläre Integrität und Funktionalität, die Mikrozirkulation und das Redoxsystem beurteilt.

4.3.1 Hepatozelluläre Integrität (Leberenzym GPT)

Im Hinblick auf die GPT-Spiegel zeigte die IPC eindruckliche Ergebnisse, sowohl bei den normalen als auch bei moderat verfetteten Lebern. Beachtenswert ist auch, dass der in der Kontrollgruppe der verfetteten Leber deutlich höhere Schaden durch IPC fast komplett verhindert werden konnte. Der zuvor signifikante Unterschied zwischen den normalen und verfetteten Lebern war zwischen beiden Gruppen nach IPC nicht mehr signifikant. Die IPC zeigte sich als potente Strategie auch in der moderat verfetteten Leber den sonst ausgeprägteren IRS deutlich zu verhindern.

4.3.2 Elektronenmikroskopische Untersuchung

Auch auf ultrastruktureller Ebene vermochte die IPC die hepatozelluläre Integrität wieder herzustellen. Der in der Kontrollgruppe normaler Lebern beobachtete Anstieg intrazellulärer Vakuolenbildung konnte in der IPC-Gruppe nicht mehr aufgefunden werden. Auch die in der Gruppe steatotischer Lebern beobachtete Schwellung sinusoidaler Endothelzellen konnte bei Tieren, die mit IPC vorbehandelt wurden, nicht mehr festgestellt werden. Die Schwellung der Endothelzellen und nicht der Hepatozyten beruht wohl auf der mangelnden antioxidativen Ausstattung der Endothelzellen. Durch vermehrten Anfall ROS könnte eine gesteigerte

Lipidperoxidation der Zellmembran stattfinden und dadurch der Flüssigkeitseinstrom in die Zelle begünstigt werden. Da die IPC dies zu verhindern vermag, scheint hier ein Effekt auf die verminderte Bildung von ROS oder ein gesteigerter Abbau derselben ausgeübt zu werden. Es gilt jedenfalls festzuhalten, dass IPC auch in verfetteten Lebern zytoprotektiv wirkt.

4.3.3 Mikrozirkulation

4.3.3.1 Sinusoidweite und Sinusoidale Perfusionsrate

Zu beiden Parametern war im Vergleich normaler und steatotischer Lebern kein signifikanter Unterschied in der Ausprägung des IRS gefunden worden. Ebenso verhielt es sich auch nach Anwendung der IPC. Sowohl normale als auch verfettete präkonditionierte Lebern zeigten Sinusoidweiten wie unter scheinoperierten, also präischämischen Bedingungen und im Vergleich zu den Kontrollgruppen deutlich verbesserte Perfusionsraten, die ebenfalls fast an die Werte der scheinoperierten Tiere herankamen.

Bezüglich der Mikrozirkulation verfetteter Lebern gibt es wenig Studien, jedoch fanden Selzner et al. keine signifikanten Unterschiede im Pfortaderdruck zwischen normalen und verfetteten Zucker-Ratten (Selzner 2000). Dies bestätigt unsere Ergebnisse, dass ein Reperfusionmangel einen Hauptfaktor für den vermehrten Schaden in Fettlebern darstellt.

In Bezug auf die Sinusoidweite kann also hier das elektronenmikroskopische Ergebnis bestätigt werden, da hier durch IPC eine Endothelzellschwellung vermieden werden konnte. Dadurch ließen sich auch die besseren Perfusionsverhältnisse erklären, da die Anlagerung von Leukozyten und Thrombozyten bei erweiterten sinusoidalen Durchmessern erschwert wird.

Wie der protektive Effekt der IPC dabei zustande kommt wird nach wie vor diskutiert. Eine entscheidende Rolle wird jedoch dem NO beigemessen (Hotter 1996, Bilinska 1996). So konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der NO-Synthese mit N-Nitro-L-Arginin Methylester (NAME) den schützenden Effekt der IPC auslöschte, wohingegen ein NO-Donor oder Administration von L-Arginin bei I/R den protektiven Effekt der IPC simulierte (Peralta 1997 und 1998, Yin 1998). Peralta et al. stellten dabei eine direkt nach Applikation von IPC auftretende Zunahme der NO-Synthese fest (Peralta 1996 und 1999). Als wahrscheinlichste Quelle hierfür gelten Endothelzellen, da diese die höchste Konzentration an NO-Synthase aufweisen. Der zugrundeliegende Pathomechanismus liegt dabei höchstwahrscheinlich in einer Reduzierung der hämodynamischen Alterationen und der Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle (Cottart 1999, Liu 1998). Eine NO-vermittelte Vasodilatation durch Adenosin würde die nach IPC beobachtete Erweiterung des

sinusoidalen Durchmessers erklären sowie die Verbesserung der postischämischen Reperfuionsverhältnisse (McKie 1994).

4.3.3.2 Leukozytenadhärenz

Die Betrachtung der Leukozytenadhärenz wurde gegliedert in temporär (Roller) und permanent adhärenente Leukozyten (Sticker) sowie deren Verhältnis zueinander. Dabei zeigten steatotische und normale Lebern im direkten Vergleich nach Aussetzung von 60 Minuten Ischämie und 120 Minuten Reperfusion lediglich im Verhältnis von Stickern zu Rollern unterschiedliche Ausprägung. So fanden sich in verfetteten Lebern zweimal soviel Sticker pro Roller als in normalen Lebern. Mittels IPC konnte dieses Verhältnis wieder in vergleichbare Werte zu normalen Lebern gerückt werden. Bei verfetteten Lebern konnte somit durch Vorbehandlung mit IPC eine signifikante Abnahme des Sticker/Roller-Verhältnisses beobachtet werden.

IPC vermochte ferner, die absolute Zahl von temporär und auch permanent adhärenenten Leukozyten im Vergleich zu den Kontrollgruppen in normalen und auch moderat verfetteten Lebern zu senken. IRS resultieren in einer Freisetzung inflammatorischer Mediatoren welche wiederum eine Steigerung endothelialer Adhäsionsmoleküle und Selektine bewirken, welche den Prozess des „rolling“ und der Adhäsion von Leukozyten mediiieren (Sawaya 1999). Im Anschluss daran kommt es zu vaskulärer Stase und auch Schaden, gefolgt von Leukozyten-Infiltration in das Gewebe, resultierend in Organschaden.

Den protektiven Effekt von IPC auf den Leukozyten-mediierten IRS haben auch andere Studiengruppen am Modell der normalen Rattenleber gesehen. So beobachteten Sawaya et al. nach Anwendung von IPC eine Abnahme sowohl der Roller als auch der Sticker nach 30 Minuten Reperfuionszeit um mindestens 50% gegenüber den Kontrollgruppen (Sawaya 1999).

Der zugrundeliegende Mechanismus der protektiven Wirkung der IPC in diesem Zusammenhang ist noch nicht geklärt, jedoch weisen multiple Studien auf eine zentrale Rolle des Adenosins hin. Zum Einen beruht dies auf den nach IPC gefundenen erhöhten intrazellulären Konzentrationen von Adenosin (Nakayama 1999), cAMP (Arai 2000) und NO (Peralta 1997). Zum Anderen führte die experimentelle Blockade von Adenosin-A₂-Rezeptoren zum Verlust des IPC-vermittelten Schutzes vor IRS (Wang 1997, Nilsson 2000). Die Interaktion von Adenosin mit A₂-Rezeptoren resultiert in einer Aktivierung von G-Proteinen, Phospholipase C und Diacylglycerol. Diese Moleküle führen zu einer Erhöhung der Phosphokinase C-Produktion, wodurch vermehrt NO und weniger P-Selektine freigesetzt werden. Da P-Selektin zur Initiierung der Leukozyten-Endothel-Interaktion eine entscheidende Rolle beigemessen wird und gleichzeitig NO als effektiver Mediator der Adenosin-

induzierten Vasodilatation wirkt (McKie 1994), wird der Ausbruch der Kaskade verhindert, der über leukozytäre Adhärenz letztlich zur Gewebeschädigung führt. Dies würde den protektiven Effekt der IPC in Bezug auf die Minderung des Leukozyten-verursachten IRS erklären. Unterschiede im protektiven Effekt der IPC und deren Wirkungsweise lassen sich dabei zwischen normalen und verfetteten Lebern auch hier nicht feststellen.

4.3.3.3 Phagozytoseaktivität von Kupffer-Stern-Zellen

Der Anteil nichtadhärenter Latexpartikel in verfetteten Lebern konnte in verfetteten Lebern durch IPC wieder signifikant gesteigert werden. Da dies mit einer Verringerung der Phagozytoserate der Kupffer-Zellen gleichzusetzen ist, kann folglich die Aktivität der Kupffer-Zellen durch IPC gesenkt werden.

Wie bereits mehrfach erwähnt, gelten KC als wesentlich beteiligt am IRS. Neben ihrer Rolle als Produzent von ROS wird ihnen aber des weiteren noch eine Beteiligung an der Bildung von TNF- α zugeschrieben. Es ist bekannt, dass die Kupffer-Zell-Population innerhalb der Leber die größte fixierte Makrophagen-Population im Körper repräsentiert und somit die wichtigste potentielle zelluläre Quelle für TNF- α darstellt (Colletti 1990, Strieter 1993). Peralta et al. konnten durch Verabreichung von Gadolinium-Chlorid (Gd) die Ausschüttung von TNF- α aus KC inhibieren und beobachteten dabei eine ähnlich ausgeprägte Prävention des IRS wie unter Applikation von IPC. Yin et al. stellten in ihrer Versuchsreihe an normalen Rattenlebern fest, dass IPC die Spiegel von TNF- α deutlich zu senken vermag im Vergleich zu den nicht mit IPC-behandelten Tieren (Yin 1998). Andere Studien haben gezeigt, dass NO die TNF- α vermittelte Apoptose inhibieren kann (Saavedra 1997). Kim et al. zeigten hierbei am in vitro-Modell, dass NO über Induktion von heat shock protein 70 Hepatozyten vor der Apoptose schützen kann (Kim 1997). Der genaue Mechanismus des präventiven Effekts der IPC auf den TNF- α bleibt jedoch ungeklärt, da nicht bekannt ist, ob dieser auf der beschleunigten Elimination des TNF- α besteht, einer Suppression in der Produktion von TNF- α in KC oder einer direkten Inhibition der TNF- α -induzierten Apoptose durch NO. Jedenfalls wird dem TNF- α eine wichtige Rolle in der Entstehung des IRS zugewiesen (Kimura 1998, Peralta 1999). Es induziert die Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 wodurch die Adhärenz von neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten am sinusoidalen Endothel ermöglicht wird, was in einer Verschlechterung der Mikrozirkulation und letztlich hepatozellulären Schaden resultiert (Essani 1997b). Zur Apoptose kommt es, indem sich TNF- α an den TNF-Rezeptor-1 bindet und über eine Aktivierung der Caspase 8- Kaskade zur DNA-

Fragmentation führt (Rath 1999). In normalen Lebern könnte die IPC ihre protektiven Effekte über diesen Mechanismus entfalten.

In verfetteten Lebern scheint dies unwahrscheinlicher. Apoptotische Faktoren wie Caspase -8 oder -3 waren in verfetteten Lebern signifikant vermindert verglichen zu den Werten bei normalen Tieren (Selzner 2000). Dass die energieaufwändige Apoptose in steatotischen Lebern nicht als primäre Art des Zelltodes vorliegt scheint in der mit Verfettung assoziierten mitochondrialen Dysfunktion und folglich erniedrigten intrazellulären ATP-Spiegeln begründet zu sein (Berson 1998, Fromenty 1997, Letteron 1996). Eine weiter diskutierte Möglichkeit für die verminderte Fähigkeit zur Apoptose in Fettlebern wird noch in der Dysfunktion der KC gesehen (Thurman 1995). Die mit I/R einhergehende KC-Dysfunktion würde mit verminderter Produktion von proapoptotischen Mediatoren wie TNF- α und auch ROS die Einleitung der Apoptose verhindern. In der Folge geht deshalb die verfettete Zelle den Weg des nekrotischen Zelluntergangs (Selzner 2000). Das rapide Eintreten von Apoptose als Reaktion auf den akuten ischämischen Ausfall ist jedoch die physiologische Reaktion. Geschädigte Zellen unterlaufen innerhalb weniger Stunden der Apoptose und werden anschließend durch Makrophagen schnell und ohne entzündliche Komponente abgebaut. Anders in steatotischen Lebern: die Nekrose ist eine unkontrollierte Form des Zelltodes und wird mit der Freisetzung zytoplasmatischer Inhalte und signifikanter Entzündungsreaktion assoziiert. Dadurch entsteht letztlich ein zusätzlicher Schaden, der sich auch in erhöhten Spiegeln der Leberenzyme und auch in einer verminderten Überlebensfähigkeit verfetteter Tiere gegenüber den normalen Tieren widerspiegelte (Selzner 2000).

Antiapoptotische Strategien in normalen Lebern zeigten dabei einen protektiven Wert gegen durch I/R verursachten hepatozellulären Schaden, resultierend in gesteigerten Überlebensraten der Tiere (Kohli 1999; Natori 1999; Yadav 1999). In verfetteten Tieren zeigte die Inhibition der Caspase als antiapoptotische Strategie jedoch keinen protektiven Effekt. Hingegen konnte mittels IPC in dieser Hinsicht auch in steatotischen Lebern eine antiapoptotische Wirkungsweise nachgewiesen werden. Clavien et al. präsentierten Ergebnisse einer klinischen Studie an Menschen, wo IPC eine Inhibition der Apoptose bewirkte und so zu einer Protektion des Reperfusionsschadens in mild bis moderat verfetteten Lebern (20-50%) führte (Clavien 2000). Unsere Ergebnisse stützen diese Theorie, da in der beobachteten Inhibition der KC-Aktivierung ein wesentlicher Produzent proapoptotischer Mediatoren in seiner Wirkungsweise gehemmt wird. Die Apoptose würde demnach in ihrer Initiierung bereits gehemmt und nicht erst nach bereits ausgelöster Kaskade wie im Modell mit der Caspase-Inhibierung.

Als möglicher Mediator der protektiven Wirkung der IPC auf KC wird auch in verfetteten Lebern wiederum das NO gesehen. Allerdings konnte experimentell durch NO die Synthese von TNF in

Makrophagen sowohl angeregt als auch inhibiert werden (Garcia Criado 1998, Eigler 1993). In dieser Hinsicht bedarf es folglich weiterer Klärung. Da jedoch auch weitere Faktoren wie die NO-vermittelte Vasodilatation durch Adenosin in unserer Arbeit beobachtet wurden, sehen wir in NO einen potentiellen Kandidaten.

Eine weitere Aufgabe der KC wird in der Abräumung erhöhter GOT-Spiegel vermutet (Thurman 1995, Clavien 1996). Dies unterstreicht einerseits die Theorie der Malfunktion von KC in verfetteten Lebern nach I/R, da hier drastisch erhöhte GOT-Spiegel vorgefunden wurden. Andererseits unterstreicht es erneut die Wirkung von IPC auf die KC, da in unseren Untersuchungen auch in steatotischen Lebern eindrucksvoll verminderte GOT-Spiegel festgestellt wurden und somit neben geringeren verursachten Schäden durch I/R auch die intakte Abräumfunktion von KC beobachtet werden konnte.

4.3.4 Hepatozelluläre Funktionalität

Der zur Beurteilung der hepatozellulären Funktionalität herangezogene mittlere Gallefluss in Prozent zum Ausgangswert ergab eine Verschlechterung um bis zu 40% nach I/R in normalen und steatotischen Lebern. Eine signifikante Verbesserung der Galleflussrate durch IPC zeigte sich dann aber nur in normalen Lebern. In verfetteten Lebern konnte im beobachteten Zeitraum von 60 Minuten Ischämie und 120 Minuten Reperfusion keine Erholung der Galleflussrate festgestellt werden. Die hepatozelluläre Funktionalität ließ sich damit durch IPC bei Vorliegen einer moderaten Lebersteatosis nicht verbessern.

In der Literatur wurde die Wirkung der IPC auf den Gallefluss bisher nur an normalen Lebern untersucht. Hier bestätigen sich unsere Ergebnisse der Lean-Gruppe, da auch Yoshizumi et al. eine rasche Erholung der Galleproduktion nach Vorbehandlung normaler Rattenlebern mit IPC beobachten konnte (Yoshizumi T 1998). Die Exkretion von Galle aus Hepatozyten ist ein aktiver, energieverbrauchender Transportprozess und korreliert mit hepatozellulären ATP-Spiegeln (Kamiiike 1985, Bowers 1987, Karwinski 1989). Deshalb wurde am Experiment mit Myokard im der IPC zugrundeliegenden Mechanismus eine Präservationsfunktion der energiereichen Phosphate wie ATP vermutet, eventuell bedingt durch verminderten Energieanspruch der Myozyten nach vorangegangener Präkonditionierung (Murry 1986).

In verfetteten Hepatozyten wird, wohl aufgrund mitochondrialer Dysfunktion, bereits unter scheinoperierten Bedingungen ein vermindertes intrazelluläres Energieniveau beobachtet (Berson 1998; Fromenty 1997; Letteron 1996). Die ATP-Reserven für die Galle-Exkretion aus den Hepatozyten in die Gallengänge sind folglich nach I/R noch geringer ausgeprägt. Die in normalen,

präkonditionierten Lebern gesehene Erholung des Galleflusses konnte in der verfetteten Leber nicht beobachtet werden. Dies kann entweder so interpretiert werden, dass die durch IPC gewonnenen Energiereserven für andere intrazelluläre Mechanismen bevorzugt verwendet werden und somit für die Galleproduktion nicht zur Verfügung stehen, oder dass IPC in der verfetteten Leber keinen Einfluss auf die Energiereserven nehmen kann.

4.3.5 Bildung freier Sauerstoffradikale

Hier konnte in den präkonditionierten Gruppen zu keinem Zeitpunkt der I/R ein signifikanter Unterschied zu den jeweiligen Kontrollgruppen vorgefunden werden. Auch der Grad der Verfettung spielte hier keine Rolle, weder bei den plasmatischen GSH- und GSSG-Spiegeln, noch bei den intrazellulären GSH-Spiegeln. Die IPC scheint demnach auf den Redox-Status keinen oder nur einen geringen Effekt auszuüben. Da die Spiegel von extrazellulärem GSH und GSSG in den präkonditionierten Gruppen keine signifikanten Unterschiede zu den Werten der Kontrolltiere ergaben, kann von annähernd gleicher Belastung durch ROS in mit IPC-behandelten Tieren ausgegangen werden wie in den unbehandelten Gruppen. Dies ist insofern erstaunlich, da mit der bereits berichteten Inaktivierung der Kupffer-Zellen durch IPC der potenteste Produzent von ROS ausgeschaltet wäre.

Die Daten, die bisher zu der Effektivität der Administration von Antioxidativa auf den schädlichen Einfluss von I/R in der steatotischen Leber vorliegen sind dabei kontrovers. Soltys et al. konnten durch Verabreichung von Tocopherol in verfetteten Zucker-Ratten eine Begrenzung des IRS nach warmer Ischämie verzeichnen (Soltys 2001). Eine andere experimentelle Gruppe um Nakano et al. beobachteten in einem CMDD-Rattenmodell nach Applikation der GSH-Vorstufe N-Acetylcystein zwar eine Wiederherstellung der hepatozellulären Integrität aber nicht die Zahl freier Sauerstoffradikale reduzieren (Nakano 1997). Serafin et al. beobachteten in einem Fettlebermodell mit Zucker-Ratten nach I/R eine vermehrte Lipidperoxidation in steatotischen Lebern als in normalen Lebern, welche durch Vorbehandlung mit IPC wieder reduziert werden konnte (Serafin 2002). Die Folgerung war, dass Präkonditionierung die Depletion von GSH während hepatischer Ischämie verhinderte und somit gegen ROS und letztlich hepatischen Schaden schützte.

Obwohl wir diese Beobachtung nicht machten schließen wir eine Beteiligung von ROS an der Entstehung von IRS und eine hierauf protektive Beeinflussung durch IPC nicht aus.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Der hohe Anteil verfetteter Lebern bei Patienten in der Leberchirurgie und unter potentiellen Spenderorganen für die Lebertransplantation verbunden mit der deutlich verminderten Toleranz dieser Organe gegenüber Ischämie im Kontrast zu normalen Lebern unterstreicht die klinische Relevanz, protektive Mechanismen gegen Ischämie-/ Reperfusionsschäden in vorgeschädigten Lebern zu entwickeln. Da zwischen dem Grad der Verfettung einer Leber und dem Ausmaß des IRS ein direkter Zusammenhang gesehen wird, sollte in dieser experimentellen Arbeit zunächst die Auswirkung des IRS auf die moderat verfettete Leber im Vergleich zur normalen Leber untersucht werden. Anschließend galt es, den Effekt der Ischämischen Präkonditionierung als protektive Strategie gegen den IRS an beiden Modellen einander gegenüberzustellen.

Modell:

Um normale und verfettete Lebern am besten miteinander vergleichen zu können, wählten wir das Modell der Zucker-Ratten. Diese Tiere unterscheiden sich lediglich in der Funktionsweise hypothalamischer Leptinrezeptoren. Im Gegensatz zu heterozygoten Zucker-Ratten ist dieser bei den homozygoten Tieren defekt, mit der Folge der ungehemmten Nahrungsaufnahme und schließlich der Ausbildung einer Fettleber. In dem von uns verwendeten Alter der Ratten hatte sich eine histologisch bestätigte moderate Verfettung der Leber ausgebildet, mit einem Steatoseanteil von 30-60% unter den Hepatozyten.

Jeweils 18 Ratten mit normalen und steatotischen Lebern wurden nun in experimentelle Untergruppen von je 6 Tieren aufgeteilt. Pro Lebermodell gab es drei Versuchsgruppen. Neben den scheinoperierten Tieren, der Sham-Gruppe, gab es eine Kontrollgruppe, in der die Leber 60 Minuten selektiver Ischämie des linken Leberlappens und 120 Minuten Reperfusion ausgesetzt wurde. In der IPC-Gruppe wurde vor der I/R noch eine jeweils 10-minütige Ischämie- und Reperusionsphase als protektive Strategie vorangeschaltet.

Das Hauptaugenmerk bei den Untersuchungen wurde auf die Mikrozirkulation durch Verwendung eines Intravitalmikroskops gerichtet. Hierdurch konnten Daten über Sinusoidweiten und –perfusionsraten, sinusoidales und venoläres Verhalten von PMN und die Aktivität von Kupffer-Zellen gewonnen werden. Für die Enzymdiagnostik zur Bestimmung der hepatozellulären Integrität und die Messung von GSH-/ GSSG-Spiegeln zur Beurteilung des Redoxstatus wurden zu festgelegten Zeitpunkten Blutproben entnommen. Die Kollektion von Galle direkt aus dem Ductus choledochus erlaubte eine Beurteilung der hepatozellulären Funktionalität. Zum Versuchsende

erfolgte die Entnahme von Leberproben für licht- und elektronenmikroskopische Aufnahmen und die Bestimmung des intrazellulären GSH-Gehaltes.

Ergebnisse:

Der Vergleich normaler Lebern mit moderat verfetteten Lebern brachte eine deutliche Aggravation des hepatozellulären Schadens nach I/R zutage. Die Parameter der hepatozellulären Integrität und Funktionalität belegen dies. Die Suche nach hierfür möglichen pathophysiologischen Hintergründen brachte zum Einen die Elektronenmikroskopie und zum Anderen die Intravitalmikroskopie. Auf ultrastruktureller Ebene ergab sich nach I/R bei verfetteten Lebern eine Schwellung des Sinusendothels, wohingegen bei normalen Lebern eine gesteigerte Vakuolenbildung beobachtet werden konnte. Bei der Beurteilung der Mikrozirkulation mittels IVM fiel jeweils in den moderat steatotischen Lebern neben einer Steigerung des Verhältnisses von Stickern zu Rollern in PSV zugunsten der Sticker eine vermehrte Aktivierung von Kupffer-Stern-Zellen auf. Die restlichen durch IVM beurteilten Parameter konnten jedoch keine weiteren Unterschiede zwischen normalen und moderat verfetteten Lebern aufweisen.

Das Prinzip der Ischämischen Präkonditionierung zeigte sich in beiden Modellen als wirksame Strategie zur Reduktion des durch Ischämie und Reperfusion verursachten hepatozellulären Schadens. Lediglich in Bezug auf die hepatozelluläre Funktionalität konnte die IPC in verfetteten Lebern keine schützende Wirkung ausüben. Hingegen zeigte sich in der Beurteilung der hepatozellulären Integrität eine beachtenswerte Reduktion des IRS durch IPC, auch bei den moderat verfetteten Tieren. Auf ultrastruktureller Ebene konnte dies durch Rückgang der in der Kontrollgruppe beobachteten Phänomene bestätigt werden. Auch sämtliche Parameter der Mikrozirkulation zeigten eine deutliche Reduktion des IRS nach Vorbehandlung mit IPC.

Interessant ist dabei der Einfluss der IPC auf die Aktivität der Kupffer-Zellen. War diese in Kontrolltieren verfetteter Lebern noch drastisch erhöht, konnte durch IPC mehr oder weniger der Ausgangswert von der scheinoperierten Gruppe wieder erreicht werden. Dies lässt sich zusammen mit den in der Elektronenmikroskopie gefundenen Ergebnissen als entscheidender Unterschied sowohl in der Entstehung von IRS in verfetteten Lebern gegenüber normalen Lebern als auch in der Entfaltung der protektiven Wirkung von Ischämischer Präkonditionierung festhalten.

Schlussfolgerung:

Diese Arbeit zeigt, dass bereits in mit 30-60% steatotischen Hepatozyten moderat verfetteten Lebern es zu einer beträchtlichen Steigerung des IRS gegenüber normalen Lebern kommt. Dabei zeichneten sich im Vergleich verfetteter und normaler Lebern auf Ebene der Mikrozirkulation

erstaunlich wenig Unterschiede. Sowohl Perfusionsraten, Sinusoidweiten, Leukozytenadhärenz und -immigration zeigten in den steatotischen Tieren keine signifikanten Abweichungen zum Verhalten in normalen Ratten. Lediglich im Aktivitätsverhalten von Kupffer-Zellen konnten deutliche Unterschiede registriert werden, mit einer höheren Aktivität in moderat verfetteten Lebern. Die ebenfalls beobachtete Schwellung sinusoidaler Endothelzellen kann mit diesem Phänomen in Zusammenhang gebracht werden. So wird eine Endothelzellschwellung durch Zerstörung der Zellmembran erklärt. Für diese Membrandestruktion kommen freie Sauerstoffradikale in Frage, als deren Hauptproduzent in der Leber die Kupffer-Zellen gesehen werden.

Auch wenn moderat verfettete Lebern für IRS empfindlicher scheinen, kann durch ischämische Präkonditionierung dieser signifikant reduziert werden, was sich in allen in dieser Arbeit beobachteten Parametern zeigte. Lediglich die hepatozelluläre Funktionalität in Form des Galleflusses konnte durch die Vorbehandlung mit IPC nach I/R nicht verhindert werden. Ischämische Präkonditionierung ist somit eine geeignete protektive Strategie gegen die Entwicklung von IRS in moderat verfetteten Lebern. Allerdings gilt zu bemerken, dass die in dieser Arbeit beobachteten Parameter nur in Bezug auf den frühen Reperfusionsschaden nach zwei Stunden untersucht wurden. Demzufolge sollten weitere Studien sich mit dem Langzeiteffekt von IRS und die Wirkung von IPC auf selbigen untersucht werden. Nach dieser Arbeit muss IPC als aussichtsreicher Kandidat für die Vermeidung von Ischämie-/ Reperfusionsschäden gesehen werden.

VI: LITERATURVERZEICHNIS

Adam R, Reynes M, Johann M, et al.:

The outcome of steatotic grafts in liver transplantation.

Transplant Proc 1991; 23: 1538-1540.

Akerboom T, Inoue M, Sies H, Kinne R, Arias IM:

Biliary transport of glutathione disulfide studied with isolated rat- liver canalicular-membrane vesicles.

Eur J Biochem 1984; 141:211-215.

Alkhulaifi AM, Yellon DM, Pugsley WB:

Preconditioning the human myocardium during aorto-coronary bypass surgery.

Eur J Cardiothorac Surg 1994; 8: 270-276.

Arai M, Thurman RG, Lemasters JJ:

Involvement of Kupffer cells and sinusoidal endothelial cells in ischemic preconditioning to rat livers stored for transplantation.

Transplant Proc 1999; 31: 425-427.

Arai M, Thurman RG, Lemasters JJ:

Contribution of adenosine A2 receptors and cyclic adenosine monophosphate to protective ischemic preconditioning of sinusoidal endothelial cells against storage/reperfusion injury in rat livers.

Hepatology 2000; 32: 297-302.

Armstrong S, Downey JM, Ganote CE:

Preconditioning of isolated rabbit cardiomyocytes: Induction by metabolic stress and blockade by the adenosine antagonist SPT and calphostin C, a protein kinase C inhibitor.

Cardiovasc Res 1994; 28: 72-77.

Arvidsson D, Svensson H, Haglund U:

Laser Doppler flowmetry for estimating liver blood flow.

Am J Physiol 1988; 254: G471-G476.

Atalla SL, Toledo-Pereyra LH, MacKenzie GH, Cederna JP:

Influence of oxygen-derived free radical scavengers on ischemic livers.

Transplantation 1985; 40: 584-90.

Baatz H, Steinbacher M, Harris G, Krombach F:

Kinetics of white blood cell staining by intravascular administration of Rhodamin 6G.

Int J Microcirc 1995; 15: 85-91.

Baeuerle PA, Henkel T:

Function and activation of NF- κ B in the immune system.

Ann Rev Immunol 1994; 12: 2956-2963.

- Behrns KE, Tsiotos GG, DeSouza NF, Krishna MK, Ludwig J, Nagorney DM:
Hepatic steatosis as a potential risk factor for major hepatic resection.
J Gastrointest Surg 1998; 2: 292-298.
- Belardinelli L, Linden J, Berne RM:
The cardiac effects of adenosine.
Prog Cardiovasc Disc 1989; 32: 73-97.
- Berson A, De Beco V, Letteron P, Robin MA, Moreau C, Kahwaaji JE, Verthier N, et al:
Steatohepatitis-inducing drugs cause mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation in rat hepatocytes.
Gastroenterology 1998; 114: 764-774.
- Bienvenu K, Granger DN:
Leukocyte adhesion in ischemia/ reperfusion.
Blood cells 1993; 19: 279-288.
- Bilinska M, Maczewski M, Beresewicz A:
Donors of nitric oxide mimic effects of ischaemic preconditioning on reperfusion induced arrhythmias in isolated rat heart.
Mol Cell Biochem. 1996; 160-161: 265-71.
- Bilzer M, Lauterburg BH:
Oxidant stress and potentiation of ischemia/reperfusion injury to the perfused rat liver by human polymorphonuclear leukocytes.
J Hepatol 1994; 20: 473-477.
- Bilzer M, Gerbes AL:
Prolonged modulation of the hepatic circulation by Kuffer-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, Jaeschke H, Vollmar AM, Paumgartner G, Gerbes AL:
Prevention of Kupffer cell-induced injury in rat liver by atrial natriuretic peptide (ANP): a novel endogenous defense mechanism against oxidant injury.
Am J Physiol 1999a; 276: G1127-1144.
- Bilzer M, Paumgartner G, Gerbes AL:
Glutathione protects the rat liver against reperfusion injury after hypothermic preservation.
Gastroenterology 1999b; 117: 200-210.
- Bilzer M, Gerbes AL:
Preservation injury of the liver: mechanisms and novel therapeutic strategies.
J Hepatol 2000; 32: 508-515.
- Bismuth H, Castaing D, Ericzon BG, Otte JB, Rolles K, Ringe B, Sloof M:
Hepatic transplantation in Europe. First Report of the European Liver Transplant Registry.
Lancet. 1987; 2: 674-6.

Björk J, Hedqvist P, Arfors KE:

Increase in vascular permeability induced by leukotriene B₄ and the role of polymorphonuclear leukocytes.

Inflammation 1982; 6: 189-200.

Björk J, Smedegård G:

Acute microvascular effects of PAF-acether, as studied by intravital microscopy.

Eur J Pharmacol 1983; 96: 87-94.

Bloch EH:

The in vivo microscopic vascular anatomy and physiology of the liver as determined with the quartz rod method of transillumination.

Angiology 1955; 6: 340-349

Blomstrand R, Kager L, Lantto O:

Studies on the ethanol-induced decrease of fatty acid oxidation in rat and human liver slices.

Life Sci. 1973; 13: 1131-41.

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.

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, Stachlewitz RF, Gao W, Qian T, Jayadev S, Jenkins G, Hannun Y, Lemasters JJ, Thurman RG, Brenner DA:

Reperfusion after liver transplantation in rats differentially activates the mitogen-activated protein kinases.

Hepatology 1997; 25: 1128-35.

Brass CA, Roberts TG:

Hepatic free radical production after cold storage: Kupffer cell-dependent and -independent mechanisms in rats.

Gastroenterology 1995; 108: 1167-1175.

Bremer C, Bradford BU, Hunt KJ, Knecht KT, Connor HD, Mason RP, Thurman RG:

Role of Kupffer cells in the pathogenesis of hepatic reperfusion injury.

Am J Physiol 1994; 267: G630-G636.

Caldwell-Kenkel JC, Currin RT, Tanaka Y, Thurman RG, Lemasters JJ:

Kupffer cell activation and endothelial cell damage after storage of rat livers: effects of reperfusion.

Hepatology 1991; 13: 83-95.

Canelo R, Braun F, Sattler B, Klinge B, Lorf T, Ramadori G, Ringe B:

Is a fatty liver dangerous for transplantation?

Transplant Proc 1999; 31: 414-415.

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.

Carini R, De Cesaris MG, Splendore R, Bagnati M, Albano E:

Ischemic preconditioning reduces Na(+) accumulation and cell killing in isolated rat hepatocytes exposed to hypoxia.

Hepatology 2000; 31:166-172.

Chouker A, Schachtner T, Schauer R, Dugas M, Lohe F, Martignoni A, Pollwein B, Niklas M, Rau HG, Jauch KW, Peter K, Thiel M:

Effects of Pringle manoeuvre and ischaemic preconditioning on haemodynamic stability in patients undergoing elective hepatectomy: a randomized trial.

Br J Anaesth. 2004; June 14th online publishing (ahead of print)

Chua SC Jr, White DW, Wu-Peng XS, Chua M, Tartaglia LA, Leibel RL:

Phenotype of fatty liver due to Gln269Pro mutation in the leptin receptor (Lepr).

Diabetes 1996; 45: 1141-3.

Chui AK, Haghghi K, Painter D, Jayasundera M, Hall G, Rao AR, Verran DJ, McCaughan GW, Sheil AG:

Donor fatty (steatotic) liver allografts in orthotopic liver transplantation.

Transplant Proc. 1998; 30: 3286-7.

Clavien PA, Camargo CA Jr., Cameron R, Washington MK, Philips MJ, Greig PD, Levy GA:

Kupffer cell erythrophagocytosis and graft-versus-host hemolysis in liver transplantation.

Gastroenterology 1996; 110: 1891-1896.

Clavien PA, Yadav SS, Sindram D, Bentley CR:

Protective effects of ischemic preconditioning for liver resection performed under inflow occlusion in humans.

Ann Surg 2000; 232: 155-162.

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.

Clemens MG, Bauer M, Pannen BHJ, Bauer I, Zhang JX:

Remodeling of hepatic microvascular responsiveness after ischemia/reperfusion.

Shock 1997; 8: 80-85.

Colletti LM, Remick DG, Burtch GD, Kunkel SL, Strieter RM, Campbell DA Jr:

Role of tumor necrosis factor-alpha in the pathophysiologic alterations after hepatic ischemia/reperfusion injury in the rat.

J Clin Invest. 1990; 85: 1936-43.

Cottart CH, Do L, Blanc MC, Vaubourdolle M, Descamps G, Durand D, Galen FX, Clot JP:

Hepatoprotective effect of endogenous nitric oxide during ischemia-reperfusion in the rat.

Hepatology. 1999; 29: 809-13.

Cronstein BN:

Adenosine, an endogenous anti-inflammatory agent.

J Appl Physiol 1994; 76: 5-13.

Crouse JA, Elliott GE, Burgess TL, Chiu L, Moore J, Nicolson M, Pacifici RE:

Altered cell surface expression and signaling of leptin receptors containing the fatty mutation.

J Biol Chem 1998; 273: 18365-73.

Cursio R, Gugenheim J, Ricci JE, Crenesse D, Rostagno P, Maulon L, Saint-Paul MC, et al:
Caspase inhibitor fully protects rats against lethal normothermic liver ischemia by inhibition
of liver apoptosis.

FASEB J 1999; 13: 253-261.

Curzio M, Esterbauer H, Dianzani MU:

Chemotactic activity of hydroxyalkenals on rat neutrophils.

Int J Tissue React. 1985; 7: 137-42.

D'Allessandro AM, Kalayoglu M, Sollinger HW, Knechtle SJ, Pirsch JD:

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:

Steatohepatitis: A tale of two "hits"?

Gastroenterology 1998; 114: 842-845.

Del Maestro RF, Planker M, Arfors KE:

Evidence for the participation of superoxide anion radical in altering the adhesive
interaction between granulocytes and endothelium in vivo.

Int J Microcirc Clin Exp 1982; 1: 105-120.

Eigler A, Sinha B, Endres S:

Nitric oxide-releasing agents enhance cytokine-induced tumor necrosis factor synthesis in
human mononuclear.

Biochem Biophys Res Commun 1993; 196: 494-501.

Ely SW, Berne RM:

Protective effects of adenosine in myocardial ischemia.

Circulation 1992; 85: 893-904

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.

Ertel W, Morrison MH, Ayala A, Chaudry IH:
Hypoxemia in the absence of blood loss or significant hypotension causes inflammatory cytokine release.
Am J Physiol 1995; 269: R160-R166.

Essani NA, McGuire GM, Manning AM, Jaeschke H:
Endotoxin-induced activation of the nuclear transcription factor κ B in hepatocytes, Kupffer cells and endothelial cells in vivo.
J Immunol 1996; 156: 2956-2963.

Essani NA, Fischer MA, Jaeschke H:
Inhibition of NF- κ B activation by dimethyl sulfoxide correlates with suppression of TNF- α formation, reduced ICAM-1 gene transcription, and protection against endotoxin-induced liver injury.
Shock 1997a; 7: 90-96.

Essani NA, Bajt ML, Farhood A, Vonderfecht SL, Jaeschke H:
Transcriptional activation of vascular cell adhesion molecule-1 gene in vivo and its role in the pathophysiology of neutrophil-induced liver injury in murine endotoxin shock.
J Immunol 1997b; 158: 5941.

Farges O, Malassagne B, Flejou F, Balzan S, Sauvanet A, Belghitti J:
Risk of major liver resection in patients with underlying chronic liver disease.
Ann Surg 1999; 229: 210-215.

First MR:
Transplantation in the nineties.
Transplantation 1992; 53: 1-11.

Fishbein TM, Fiel MI, Emre S, Cubukcu O, Guy SR, Schwartz ME, Miller CM, Sheiner PA:
Use of livers with microvesicular fat safely expands the donor pool.
Transplantation 1997; 64: 248-51

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:
Der Einfluß des Perfusionsdruckes bei der Perfusionsfixation auf die Feinstruktur der Lebersinusoide. Transmissions- und rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen.
Res Exp Med 1976; 168: 229-241

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

Fukuda N, Azain MJ, Ontko JA:

Altered hepatic metabolism of free fatty acids underlying hypersecretion of very low density lipoproteins in the genetically obese Zucker rats.

J Biol Chem 1982; 257 (23): 14066.

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 a new antioxidant-insensitive free radical species.

Transplantation 1995; 59: 674-679.

Garcia Criado FJ, Eleno N, Santos Benito F, Valdunciel JJ, Reverte M, Lozano Sanchez FS, Ludena MD et al.:

Protective effects of exogenous nitric oxide on the renal function and inflammatory response in a model of ischemia-reperfusion.

Transplantation 1998; 66: 982-990.

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-diazafluoranthene-1-oxide (AC-3579), a new experimental antileukemic drug.

Toxicol Appl Pharmacol 1975; 31: 13-20.

Gores GJ, Herman B, Lemasters JJ:

Plasma membrane bleb formation and rupture: a common feature of hepatocellular injury.

Hepatology 1990; 11: 690-8.

Granger DN:

Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury.

Am J Physiol 1988; 255: H1269-H1275.

Granger DN, Benoit JN, Suzuki M, Grisham MB:

Leukocyte adherence to venular endothelium during ischemia-reperfusion.

Am J Physiol 1989 ; 257: G683-G688.

Granger DN, Kubes P:

The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion.

J Leukoc Biol. 1994; 55: 662-75.

Gumucio JJ, Miller DL, Krauss MD, Zanolli CC:

Transport of fluorescent compounds into hepatocytes and the resultant zonal labeling of the hepatic acinus in the rat.

Gastroenterology. 1981; 80: 639-46.

Gutierrez G:

Cellular energy metabolism during hypoxia.

Crit Care Med. 1991; 19: 619-26.

Habin NA

Early mortality in 100 consecutive liver resections in 96 patients with benign and malign liver tumors.

Ann R Coll Surg Engl 1995; 77: 107-110

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

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.

Hannoun L, Borie D, Delva E, Jones D, Vaillant J-C, Nordlinger B, Parc R.

Liver resection with normothermic ischemia exceeding one hour.

Br J Surg 1993; 80: 1161-1165

Hayashi M, Fujii K, Kiuchi T, et al.

Effects of fatty infiltration of the graft on the outcome of living-related liver transplantation.

Transplant Proc 1999; 31: 403.

Hecht R, Nolte D, Botzlar A, Menger MD, Messmer K:

Monoklonaler Antikörper gegen das Leukozytenadhäsionsmolekül CD11 b (MAC-1) verhindert die postischämische Leukozytenadhärenz in vivo.

Langenbecks Archiv Chir Forum 1993: 333-336.

Hernandez LA, Grisham MB, Twohig B, Arfors KE, Harlan JM, Granger DN:

Role of neutrophils in ischemia-reperfusion-induced microvascular injury.

Am J Physiol 1987; 253: H699-H703.

Hilden M, Christoffersen P, Juhl E, Dalgaard J.

Liver histology in a normal population - examinations of 503 consecutive fatal traffic casualties.

Scand J Gastroenterol 1977; 12: 593-597

Hori M, Kitakaze M, Takashima S, et al:

Beneficial role of adenosine in myocardial ischemic and reperfusion injury.

Drug Dev Res 1993; 28: 432-437

Hornboll P., Olsen T:

Fatty changes in the liver: the relation to age, overweight and diabetes mellitus.

Acta Pathol Microbiol Immunol Scand 1982; 90: 199-205

Hotter G, Closa D, Prados M, et al:

Intestinal preconditioning is mediated by a transient increase in nitric oxide.

Biochem Biophys Res Commun 1996; 222: 27-32.

Hsu K, Wang D, Wu SY, et al:

Ischemia-reperfusion lung injury attenuated by ATP-MgCl₂ in rats.

J Appl Physiol 1994; 76: 545-552.

Huguet C, Nordlinger B, Bloch P, Conrad J.

Tolerance of human liver to prolonged normothermic ischemia.

Arch Surg 1978; 113: 1448-1451

Huguet C, Gavelli A, Bona S:

Hepatic resections with ischemia of the liver exceeding one hour.

J Am Coll Surg 1994; 178: 454-456.

Ikonomidis JS, Weisel RD, Mickle DAG:

Ischemic preconditioning: Cardioprotection for cardiac surgery.

J Card Surg 1994; 9: 526-531 (suppl).

Ishida T, Yarimizu K, Gute DC, Korthuis RJ:

Mechanisms of ischemic preconditioning.

Shock 1997; 8: 86-94.

Ito Y, Hiraishi H, Razanadi M, Terano A, Harada T, Ivey KJ:

Role of cellular superoxide dismutase against reactive oxygen metabolite-induced cell damage in cultured rat hepatocytes.

Hepatology 1992; 16: 247-254.

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:

Glutathione disulfide as index of oxidant stress in rat liver during hypoxia.

Am J Physiol 1990a; 258: G499-G505.

Jaeschke H, Farhood A, Smith CW:

Neutrophils contribute to ischemia/reperfusion injury in rat liver in vivo.

FASEB J 1990b; 4(15): 3355-3359

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 Comm 1991a; 15: 277-284.

Jaeschke H:

Vascular oxidant stress and hepatic ischemia/ reperfusion injury.

Free Radic Res Commun 1991b; 12-13 Pt 2: 737-743.

Jaeschke H, Farhood A:

Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver.

Am J Physiol 1991c; 260: G355-G362.

- 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 1993; 264: G801-G809.
- Jaeschke H:
Mechanisms of oxidant stress-induced acute tissue injury.
Proc Soc Exp Biol Med 1995; 209: 104-111.
- Jaeschke H, Smith CW, Clemens MG, Ganey PE, Roth RA:
Mechanisms of inflammatory liver injury: adhesion molecules and cytotoxicity of neutrophils.
Toxicol Appl Pharmacol 1996; 139: 213-226.
- Jaeschke H, Smith CW:
Mechanisms of neutrophil-induced parenchymal cell injury.
J Leukoc Biol 1997; 61: 647-653.
- Jenkins DP, Baxter GF, Yellon DM:
The pathophysiology of ischemic preconditioning.
Pharmacol Res 1995; 31: 219-223.
- Jerome SN, Akimitsu T, Gute DC, Korthuis RJ:
Ischemic preconditioning attenuates capillary no-reflow induced by prolonged ischemia and reperfusion.
Am J Physiol 1995; 268: H2063-H2067
- Kakizoe S, Yanaga K, Starzl TE, Demetris AJ:
Evaluation of protocol before transplantation and after reperfusion biopsies from human orthotopic liver allografts: considerations of preservation and early immunological injury.
Hepatology. 1990; 11: 932-41.
- Kamiike W, Nakahara M, Nakao K, Koseki M, Nishida T, Kawashima Y, et al.:
Correlation between cellular ATP level and bile excretion in the rat liver.
Transplantation 1985; 39: 50-55.
- Karwinski W, Husoy AM, Farstad M, Soreide O:
Sixty minutes of normothermic ischemia in the rat liver: correlation between adenine nucleotides and bile excretion.
J Surg Res 1989; 46: 99-103.
- Kawano K, Kim YI, Kazutoshi K, Kobayashi M:
The beneficial effect of cyclosporin on liver ischemia in rats.
Transplantation 1989; 48: 759-764

Keller MW, Geddes L, Spotnitz W, et al:

Microcirculatory dysfunction following perfusion with hyperkalemic, hypothermic, cardioplegic solutions and blood reperfusion. Effect of adenosine. *Circulation* 1991; 84: 2485-2494.

Kerrigan CL, Stotland MA:

Ischemic reperfusion injury: A review. *Microsurgery* 1993; 14: 165-175

Khandoga A, Biberthaler P, Enders G, Axmann S, Hutter J, Messmer K, Krombach F: Platelet adhesion mediated by fibrinogen-ICAM-1-binding induces tissue injury in the postischemic liver in vivo. *Transplantation* 2002; 74: 681-688.

Kim YM, Talanian RV, Billiar TR:

Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increases in caspase-3-like activity via two distinct mechanisms. *J Biol Chem.* 1997; 272: 31138-48.

Kimura N, Muraoka R, Horiuchi T, Tabo T, Uchinami M, Yokomachi J, Doi K:

Intermittent hepatic pedicle clamping reduces liver and lung injury. *J Surg Res* 1998; 78: 11.

Kishimoto TK, Anderson DC:

The role of integrins in inflammation.

In: *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*; Gallin JI, Goldstein IM, Snyderman R. Raven, New York 1992: 353-357

Knisley MH:

A method of illuminating living structure for microscopic study. *Anat Rec* 1936; 64: 499-534.

Knisley MH:

Microscopic observations of the circulatory conditions in living frog liver lobules. *Anat Rec* 1939; 73: 269-270.

Kohli V, Gao W, Camargo CA Jr, Clavien PA.

Calpain is a mediator of preservation- reperfusion injury in rat liver transplantation. *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94: 9354-9359.

Kohli V, Selzner M, Madden JF, Bentley RC, Clavien PA:

Endothelial cell and hepatocyte deaths occur by apoptosis after ischemia-reperfusion injury in the rat liver.

Transplantation 1999; 67: 1099-105.

Komatsu H, Koo A, Guth PH:

Leukocyte flow dynamics in the rat liver microcirculation. *Microvasc Res* 1990; 40: 1-13.

Koneru B, Reddy M, Torre A, 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.

Koo A, Liang IY:
Stimulation and blockade of cholinergic receptors in terminal liver microcirculation in rats.
Am J Physiol 1979; 236: E728-32.

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, Conacher HB, Jarvis GA, Beare-Rogers JL:
Studies on long chain cis- and trans-acyl-CoA esters and Acyl-CoA dehydrogenase from rat
heart mitochondria.
Lipids 1977; 12: 177-81.

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

Kubes P, Suzuki M, Granger DN:
Modulation of PAF-induced leukocyte adherence and increased microvascular permeability.
Am J Physiol 1990; 259: G859-G864.

Kume M, Yamamoto Y, Saad S, Gomi T, Kimoto S, Shimabukuro T, Yagi T, Nakagami M,
Takada Y, Morimoto T, Yamaoka Y.
Ischemic preconditioning of the liver in rats: Implications of heat shock protein induction to
increase tolerance of ischemia-reperfusion injury.
J Lab Clin Med 1996; 128: 251-258.

Kunz R, Brune HA, Ziegler U, Marzinzig M, Berger HG:
Ischemia / reperfusion damage of the liver caused by free radicals – direct radical detecting
using electron spin resonance (ESR).
Langenbecks Arch Chir 1991; 376: 139-142.

Kurose I, Anderson DC, Miyasaka M, Tamatani T, Paulson JC, Todd RF, Rusche JR, Granger
DN:
Molecular determinants of reperfusion-induced leukocyte adhesion and vascular protein
leakage.
Circ. Res. 1994; 74: 336-343

Lauterburg BH, Smith CV, Hughes H, Mitchell JR:

Biliary excretion of glutathione and glutathione disulfide in the rat.
J Clin Invest 1984a; 73: 124-133.

Lauterburg BH, Adams JD, Mitchell JR:

Hepatic glutathione homeostasis in the rat: efflux accounts for glutathione turnover.
Hepatology 1984b; 4: 586-590.

Leaf A

Cell swelling: A factor in ischemic tissue injury.
Circulation 1973; 48: 455-458.

Lee D, Clark DG:

Influence of ischemic time on the production of bile by perfused rat liver.
Cryobiology 1977; 14: 37-44.

Lee HAT, LaFaro RJ, Reed GE:

Pretreatment of human myocardium with adenosine during open-heart surgery.
J Card Surg 1995; 10: 665-676.

Lee HAT:

Mechanisms of Ischemic Preconditioning and Clinical Implications for Multiorgan Ischemic-Reperfusion Injury.
Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia 1999; Vol 13, No 1: 78-91

Lehr HA, Guhlmann A, Nolte D, Keppler D, Messmer K:

Leukotrienes as mediators in ischemia-reperfusion injury in a microcirculation model in the hamster.
J Clin Invest 1991; 87: 2036-2042.

Lemasters JJ, Peng XX, Bachmann S, Currin RT, Gao W, Thurman RG:

Dual role of Kupffer cell activation and endothelial cell damage in reperfusion injury to livers stored for transplantation surgery.
J Gastroenterol Hepatol 1995; 10 Suppl 1: S84-87.

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.

Lentsch AB, Yoshidome H, Cheadle WG, Miller FN, Edwards MJ:

Chemokine involvement in hepatic ischemia/reperfusion injury in mice: roles for macrophage inflammatory protein-2 and KC.
Hepatology 1998; 27: 1172-1177.

Letteron P, Fromenty B, Terris B, Degott C, Pessayre D.

Acute and chronic hepatic steatosis lead to in vitro peroxidation in mice.
J Hepatol 1996; 24: 200-208.

- Li XK, Matin AFM, Suzuki H, Uno T, Yamaguchi T, Harada Y:
Effect of protease inhibitor on ischemia-reperfusion injury of the rat liver.
Transplantation 1993; 56: 1331-1336.
- Lieber CS:
Biochemical factors in alcoholic liver disease.
Sem Liv Dis 1993; 13: 136-147.
- Liu GS, Thornton J, Van Winkle DM, et al:
Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A₁ adenosine receptors in rabbit heart.
Circulation 1991; 84: 350-356
- Liu P, McGuire GM, Fisher MA, Farhood A, Smith CW, Jaeschke H:
Activation of Kupffer cells and neutrophils for reactive oxygen formation is responsible for endotoxin-enhanced liver injury after hepatic coma.
Shock 1995; 3: 56-62.
- Liu H, Cala PM, Anderson SE:
Ischemic preconditioning: effects on pH, Na and Ca in newborn rabbit hearts during Ischemia/Reperfusion.
J Mol Cell Cardiol. 1998; 30: 685-97.
- Lloris-Carsi JM, Cejalvo D, Toledo-Pereyra LH, et al:
Preconditioning: Effect upon modulation in warm liver ischemia.
Transplant Proc 1993; 25: 3303-3304.
- Malewiak MI, Griglio S, Kalopissis AD, Le Liepvre X:
Oleate metabolism in isolated hepatocytes from lean and obese Zucker rats. Influence of a high fat diet and in vitro response to glucagon.
Metabolism 1983; 32 (7): 661
- Marubayashi S, Dohi K, Ochi K, Kawasaki T:
Role of free radicals in ischemic rat liver cell injury: prevention of damage by alpha-tocopherol administration.
Surgery 1986; 99: 184-92.
- Markin RS, Wisecarver JL, Radio SJ, Stratta RJ, Langnas AN, Hirst K, Shaw BW Jr:
Frozen section evaluation of donor livers before transplantation.
Transplant 1993; 56: 1403-1409.
- Marzi I, Zhong Z, Zimmermann FA, Lemasters JJ, Thurman RG:
Xanthine and hypoxanthine accumulating during storage may contribute to reperfusion injury following liver transplantation in the rat.
Transplant Proc 1989; 21: 1319-1320.
- Marzi I, Walcher F, Menger MD, Bühren V, Trentz O:
Microcirculatory disturbances and leukocyte adherence in transplanted livers after cold storage in Euro-Collins-, UW- and HTK solution.
Transplant Int 1991; 4: 45-50

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.

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

Mc Cuskey RS:
Hepatic microvascular dysfunction during sepsis and endotoxemia.
In: Cytoprotection and Cytobiology, Ed: Tsuchiya M
Excerpta Medica 1986; 3: 3-17, Amsterdam.

Mc Cuskey RS, Mc Cuskey PA, Urbaschek R, Urbaschek B:
Kupffer cell function in host defense.
Rev Infect Dis 1987; 9 Suppl 5: S616-619

Mc Cuskey RS:
Hepatic microvascular responses to endotoxemia and sepsis.
Prog Appl Microcirc 1993; 19: 76-84

McCuskey RS, Urbaschek R, Urbaschek B:
The microcirculation during endotoxemia.
Cardiovasc Res 1996; 32 (4): 752-763.

McKie LD, Bass BL, Dunkin BJ, Harmon JW:
Nitric oxide mediates the blood flow response to intravenous adenosine in the rabbit.
Circ Shock 1994; 43: 103-106.

Meer C, Kley GA, Valkenburg PW:
Studies on the cause of death after permanent and temporary occlusion of the portal vein in rats.
Circ Shock 1976; 3: 191

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: 151-166.

Menger MD, Sack FU, Hammersen F, Messmer K:
Tissue oxygenation after prolonged ischemia in skeletal muscle. Therapeutic effects of prophylactic isovolemic hemodilution.
Adv Exp Med Biol 1989; 248: 387-395.

Menger MD, Lehr HA, Messmer K:
Role of oxygen radicals in the microcirculatory manifestations of postischemic injury.
Klin Wochenschr 1991a; 69: 1050-1055

Menger MD, Müller MJ, Friedl H-P, Trentz O, Messmer K
Microcirculatory phenomena during reperfusion following complete liver ischemia and bowel congestion.

Eur Surg Res 1991b; 23:135

Menger MD, Marzi I, Messmer K:

In vivo fluorescence microscopy for quantitative analysis of the hepatic microcirculation in hamsters and rats.

Eur Surg Res 1991c; 23: 158-169.

Menger MD, Steiner D, Messmer K:

Microvascular ischemia/reperfusion injury in striated muscle: Significance of "no reflow".

Am J Physiol, 1992a; 263: 1892-1900.

Menger MD, Pelikan S, Steiner D, Messmer K

Microvascular ischemia/reperfusion injury in striated muscle: Significance of "reflow paradox".

Am J Physiol 1992b; 263: 1901-1906.

Menger MD, Müller MJ, Friedl HP, Trentz O, Messmer K

Ischemia-reperfusion injury of the liver: Role of neutrophils and xanthine oxidase

In: Faist E, Meakins IL, Schildberg FW (eds): Host Defense Dysfunction in Trauma, Shock and Sepsis. Heidelberg, Springer, 1992c; 499-503.

Menger MD, Barker JH, Messmer K

Capillary blood perfusion during postischemic reperfusion in striated muscle.

Plast Reconstr Surg 1992d; 89: 1104-1114.

Metzger J, Dore SP, Lauterburg PH:

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.

Mochida S, Arai M, Ohnon A, Masaki N, Ogata I, Fujiwara K:

Oxidative stress in hepatocytes and stimulatory state of Kupffer cells after reperfusion differ between warm and cold ischemia.

Liver 1994; 14: 234-240.

Monsour HP Jr, Wood RP, Ozaki C, Katz S, Clark J, Dyer C, Camel S:

Utility of preoperative liver biopsy in live-related donor patients for liver transplantation.

Transplant Proc 1994; 26: 138-139.

- Motoyama S, Minamiya Y, Saito S, Saito R, Matsuzaki I, Abo S, Inaba H, Enomoto K, Kitamura M:
Hydrogen peroxide derived from hepatocytes induces sinusoidal endothelial cell apoptosis in perfused hypoxic rat liver.
Gastroenterology. 1998; 114: 153-163.
- Murry CE, Jennings RB, Reimer KA:
Preconditioning with ischemia. A delay of lethal cell injury in ischemic myocardium.
Circulation 1986; 74: 1124-1136.
- 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.
- Nakano H, Nagasaki H, Barama A, et al.:
The effect of N-acetylcysteine and intracellular adhesion molecule-I monoclonal antibody against ischemia-reperfusion injury of the 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.
- Nakayama H, Yamamoto Y, Kume M, Yamagami K, Yamamoto H, Kimoto S, et al.:
Pharmacologic stimulation of adenosine A2 receptor supplants ischemic preconditioning in providing ischemic tolerance in rat livers.
Surgery 1999; 126: 945-954.
- Natori S, Selzner M, Valentino KL, Fritz LC, Srinivasan A, Clavien PA, Gores GJ:
Apoptosis of sinusoidal endothelial cells occurs during liver preservation injury by a caspase-dependent mechanism.
Transplantation 1999; 68: 89-96
- Nauta RJ, Tsimoyiannis E, Uribe M, Walsh DB, Miller D, Butterfield A:
Oxygen-derived free radicals in hepatic ischemia and reperfusion injury in the rat.
Surg Gynecol Obstet. 1990; 171: 120-5.
- Nilsson B, Friman S, Wallin M, Gustafson B, Delbro D:
The liver protective effect of ischemic preconditioning may be mediated by adenosine.
Transplant Int 2000; 13: S558-S561.
- Nolte D, Lehr A, Messmer K:
Adenosine inhibits postischemic leukocyte-endothelium interaction in postcapillary venules of the hamster.
Am J Physiol 1991; 261: H651-H655.

Nunes FA, Kumar C, Chance B, Brass CA:

Chemiluminescent measurement of increased free radical formation after ischemia / reperfusion. Mechanisms of free radical formation in the liver.

Dig Dis Sci 1995; 40: 1045-1053.

Oda M, Azuma T, Watanabe N, Komatsu H, Kaneko K, Nakamura M, Tsuchiya M:

Involvement of vasoactive intestinal polypeptide in the regulation of hepatic sinusoidal blood flow.

Int J Microcirc Clin Exp 1988; 7: 97

Ohhara K:

Study of microcirculatory changes in experimental dietary fatty liver.

J Med Hokkaido 1989; 64: 177-185.

Okada Y, Copeland BR, Mori E, Tung MM, Thomas WS, Del Zoppo GJ:

P-selectin and intercellular adhesion molecule-1 expression after focal brain ischemia and reperfusion.

Stroke 1994; 25: 202-211

Parks DA, Williams TK, Beckman JS:

Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat intestine: a reevaluation.

Am J Physiol 1988; 254: 768-774

Peng X-X, Currin RT, Musshafen TL, Thurman RG, Lemasters JJ:

Lipopolysaccharide treatment of donor rats causes graft failure after orthotopic rat liver transplantation.

In: Wisse E, Knook DL and Wake K, editors. Cells of the Hepatic Sinusoid, vol. 5. Leiden, Netherlands: The Kupffer Cell Foundation; 1995; p. 234-235.

Peralta C, Closa D, Hotter G, Gelpi E, Prats N, Rosello-Catafau J.

Liver ischemic preconditioning is mediated by the inhibitory action of nitric oxide on endothelin.

Biochem Biophys Res Commun 1996; 229: 264-270

Peralta C, Hotter G, Closa D, Gelpi E, Bulbena O, Rosello-Catafau J.

Protective effect of preconditioning on the injury associated to hepatic ischemia-reperfusion in the rat: role of nitric oxide and adenosine.

Hepatology 1997; 25: 934-937

Peralta C, Closa D, Xaus C, Gelpí E, Rosello-Catafau J, Hotter G:

Hepatic preconditioning in rats is defined by a balance of adenosine and xanthine.

Hepatology 1998; 28: 768-773

Peralta C, Prats N, Xaus C, Gelpi E:

Protective effect of liver ischemic preconditioning on liver and lung injury by hepatic ischemia-reperfusion in the rat.

Hepatology 1999; 30: 1481

Peralta C, Perales JC, Bartrons R, Mitchell C, Gilgenkrantz H, Xaus C, Prats N, Fernandez L, Gelpi E, Panes J, Rosello-Catafau J:

The combination of ischemic preconditioning and liver Bcl-2 overexpression is a suitable strategy to prevent liver and lung damage after hepatic ischemia-reperfusion.

Am J Pathol. 2002; 160: 2111-22.

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.

Ploeg RJ, D'Allesandro AM, Knechtle SJ, Stegall MD, Pirsch JD, Hoffmann RM, Sasaki T, Sollinger HW, Belzer FO, Kalayoglu M: Risk factors for primary dysfunction after liver transplantation – a multivariate analysis.

Transplantation 1993; 55: 807-813.

Pol B, Campan P, Hardwigsen J, Botti G, Pons J, Patrice le Treut Y:

Morbidity of major hepatic resections: a 100- case prospective study.

Eur J Surg 1999; 165: 446-453.

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

Praaning- Van Dalen 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.

Pringle JH.

Notes on the arrest of hepatic hemorrhage due to trauma.

Ann. Surg. 1908; 48: 541-549.

Rappaport AM, Knoblauch M, Black RG, Ohira S:

Hepatic microcirculatory changes leading to portal hypertension.

Ann N.Y. Acad Sci 1970; 170: 48.

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.

Rath PC, Aggarwal BB:

TNF-induced signaling in apoptosis.

J Clin Immunol 1999; 19: 350-64.

Reddy JK, Goel SK, Nemali MR, Carrino JJ, Laffler TG, Reddy MK, Sperbeck SJ, Osumi T, Hashimoto T, Lalwani ND:

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.
- Rees M, Plant G, Wells J, Bygrave S.
One hundred and fifty hepatic resections: evolution of techniques towards bloodless surgery.
Br J Surg 1996; 83:117-120
- Rinella ME, Alonso E, Rao S, Whittington P, Fryer J, Superina R, Flamm SL, Blei AT:
Body mass index as a predictor of hepatic steatosis in living liver donors.
Liver Transpl 2001; 7: 409-414
- Ruttinger D, Vollmar B, Wanner GA, Messmer K:
In vivo assessment of hepatic alterations following gadolinium chloride-induced Kupffer cell blockade.
J Hepatol. 1996; 25: 960-7.
- Rymasa B, Wang JF, de Groot H:
O₂-release by activated Kupffer cells upon hypoxia-reoxygenation.
Am J Physiol 1991; 261: G602-G607.
- Saavedra JE, Billiar TR, Williams DL, Kim YM, Watkins SC, Keefer LK:
Targeting nitric oxide (NO) delivery in vivo. Design of a liver-selective NO donor prodrug that blocks tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis and toxicity in the liver.
J Med Chem. 1997; 40: 1947-54.
- 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.
- Sawaya DE Jr, Brown M, Minardi A, Bilton B, Burney D, Granger DN, McDonald JC, Zibari GB:
The role of ischemic preconditioning in the recruitment of rolling and adherent leukocytes in hepatic venules after ischemia/reperfusion.
J Surg Res. 1999; 85: 163-70.
- Sawka-Verhelle D, Tartare-Deckert S, Decaux JF, et al:
Stat 5B, activated by insulin in a Jak- independant fashion, plays a role in glucokinase gene transcription.
Endocrinology 2000; 141: 1977-1988.
- Scales WE, Campbell DA, Green ME, Remick DG:
Hepatic ischemia/reperfusion injury: importance of oxidant/tumor necrosis factor interactions.
Am J Physiol 1994; 267: G1122-G1127.

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.
Ann Surg. 2004a; 10: 864-70.

Schauer RJ, Kalmuk S, Gerbes AL, Leiderer R, Meissner H, Schildberg FW, Messmer K, Bilzer M:
Intravenous administration of glutathione protects parenchymal and non-parenchymal liver cells against reperfusion injury following rat liver transplantation.
World J Gastroenterol. 2004b; 10: 864-70.

Scheig R:
Effects of ethanol on lipid metabolism in adipose tissue.
Biochem Biophys Acta. 1971; 248:48-60.

Schmid-Schönbein GW:
Capillary plugging by granulocytes and the no-reflow phenomenon in the microcirculation.
Fed Proc 1987; 46: 2397-2401.

Scoazec JY, Borghi-Scoazec G, Durand F, Bernuau J, Pham BN, Belghiti J, Feldmann G:
Complement activation after ischemia-reperfusion in human liver allografts: incidence and pathophysiological relevance.
Gastroenterology 1997; 112: 908-918.

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.

Seifalian AM, El-Desoky H, Delpy DT, Davidson BR:
Effects of hepatic ischaemia/reperfusion injury in a rabbit model of Indocyanine Green clearance.
Clin Sci (Lond). 2002; 102:579-86.

Seifert J, Messmer K:
Validity of blood volume determinations in hemorrhagic shock in rats.
Eur Surg Res 1971; 3: 306-316.

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, MA: 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 2000; 32: 1280-1288.

Selzner M, Clavien PA:

Fatty liver in liver transplantation and surgery. Review.
Semin Liver Dis. 2001; 21: 105-13.

Serafin A, Rosello-Catafau J, Prats N, Xaus C, Gelpi E, Peralta C:

Ischemic preconditioning increases the tolerance of fatty liver to hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat.
Am J Pathol 2002; 161: 587-601.

Sherman IA, Fisher MM:

Hepatic transport of fluorescent molecules: in vivo studies using intravital TV microscopy.
Hepatology 1986; 6: 444-449.

Silver IA:

Ion fluxes in hypoxic tissues.
Microvasc Res 1977; 13: 409-420.

Sindram D, Kohli V, Madden J, Clavien PA:

Calpain inhibition prevents sinusoidal endothelial cell apoptosis in the cold ischemic rat liver.
Transplantation 1999; 68: 136-140.

Singh I:

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

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.

Starzl TE, Demetries AJ, van Thiel D

Liver transplantation (1), (2).
N Engl J Med 1989; 321: 1014 und 1092-9.

Steenbergen C, Perlman ME, London RE, Murphy E:

Mechanism of preconditioning – Ionic alterations.
Circ Res 1993; 72: 112-125.

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.

Strasberg SM, Howard TK, Molmenti EP, Hertl M:
Selecting the donor liver: risk factors for poor function after orthotopic liver transplantation.
Review.
Hepatology. 1994; 20: 829-838.

Strieter RM, Kunkel SL, Bone RC:
Role of tumor necrosis factor-alpha in disease states and inflammation.
Crit Care Med. 1993; 21 (10 Suppl): S447-63.

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.

Takenaka K, Kanematsu T, Fukuzawa K, Sugimachi K:
Can hepatic failure after surgery for hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients be prevented?
World J Surg 1990; 14: 123-127.

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.

Taub R:
Liver regeneration 4: transcriptional control of liver regeneration.
FASEB J 1996; 10: 413-427.

Terajima H, Kondo T, Enders G, Hammer C, Thiery J, Yamamoto Y, Yamaoka Y, Messmer K:
Reduction of hepatic microcirculatory failure caused by normothermic ischemia/reperfusion induced injury by means of heat shock preconditioning.
Shock 1999; 12: 329-334

Teramoto K, Bowers JL, Kruskal J, Clouse M
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.

Thurman R, Gao W, Connor H, Adachi Y, Stachlewitz RF, Zhong Z, Knecht KT, et al:
Role of Kupffer cells in failure of fatty livers following liver transplantation and alcoholic
injury.
J Gastroenterol Hepatol 1995; 10 Suppl: S24-S30.

Tietze F:
Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized
glutathione: applications to mammalian blood and other tissues.
Anal Biochem 1969; 27: 502-522

Toombs CF, McGee S, Johnston WE, et al:
Myocardial protective effects of adenosine. Infarct size reduction with pretreatment and
continued receptor stimulating during ischemia.
Circulation 1992; 86: 659-665

Underwood Ground KE:
Prevalence of fatty liver in healthy male adults accident ally killed.
Aviat Space Environ Med 1984; 55: 59-63.

Urabe K, Miura T, Iwamoto T, et al:
Preconditioning enhances myocardial resistance to postischemic myocardial stunning via
adenosine receptor activation.
Cardiovasc Res 1993; 27: 657-662.

Urata K, Nguyen B, Brault A, Lavoie J, Rocheleau B, Huet PM:
Decreased survival in rat liver transplantation with extended cold preservation: role of portal
vein clamping time.
Hepatology 1998; 28: 366-373.

Van Winkle DM, Chien GL, Wolff RA, et al:
Cardioprotection provided by adenosine receptor activation is abolished by blockade of the
KATP channel.
Am J Physiol 1994; 266: H829-H839

Vendemiale G, Grattagliano I, Caraceni P, Caraccio G, Domenicali M, Dall'Agata M,
Trevisani F, Guerrieri F, Bernardi M, Altomare E:
Mitochondrial oxidative injury and energy metabolism alteration in rat fatty liver: effect of the
nutritional status.
Hepatology 2001; 33: 808-15.

Vollmar B, Menger MD, Glasz J, Leiderer R, Messmer K:
Impact of leukocyte-endothelial cell interaction in hepatic ischemia- reperfusion injury.
Am J Physiol 1994; 267: G786-793

- 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 Pathol Jpn 1974; 24: 207
- Walsh TR, Rao PN, Makowka L, Starzl TE:
Lipid peroxidation is a nonparenchymal cell event with reperfusion after prolonged liver ischemia.
J Surg Res 1990; 49: 18-22.
- Wang J, Drake L, Sajjadi F, Firestein GS, Mullane KM, Bullough DA :
Dual activation of adenosine A1 and A3 receptors mediates preconditioning of isolated cardiac myocytes.
Eur J Pharmacol 1997; 320: 241-248.
- Wanner GA, Ertel W, Müller P, Höfer Y, Leiderer R, Menger MD et al.
Liver ischemia and reperfusion induces a systemic inflammatory response through kupffer cell activation.
Shock 1996; 5: 34-40.
- Westwick JK, Weizel 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.
- Yadav SS, Sindram D, Perry Dk, Clavien PA:
Ischemic preconditioning protects the mouse liver by inhibition of apoptosis through a caspase-dependent pathway.
Hepatology 1999; 30: 1223-1331.
- Yamashita T, Murakami T, Iida M, Kuwajima M, Shima K:
Leptin receptor of Zucker fatty rat performs reduced signal transduction.
Diabetes 1997; 46: 1077.
- 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.

Yellon DM, Alkhulaifi AM, Pugsley WB:

Preconditioning of the human myocardium.

Lancet 1993; 343: 276-277.

Yin DP, Sankary HN, Chong ASF, Ma LL, Shen J, Foster P, Williams JW:

Protective effect of ischemic preconditioning on liver preservation-reperfusion injury in rats.

Transplantation 1998; 66: 152-157

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.

Yoshizumi T, Yanaga K, Soejima Y, Maeda T, Uchiyama H, Sugimachi K:

Amelioration of liver injury by ischaemic preconditioning.

Br J Surg. 1998; 85: 1636-40.

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.

Zhou W, McCollum MO, Levine BA, Olson MS:

Inflammation and platelet-activating factor production during ischemia/reperfusion.

Hepatology 1992; 16: 1236-1240.

Zweier JL, Kuppusamy P, Lutty GA: Measurement of endothelial cell free radical generation:

Evidence for a central mechanism of free radical injury in postischemic tissues. Proc Natl

Acad Sci USA 1988; 85: 4046-4050.

VII. ABKÜRZUNGEN

AP 1	Activator-Protein 1
ATP	Adenosintriphosphat
CAMAS	Cap-Image-System
CMDD	Choline- and methionine-deficient diet
DTNB	5,5-Dithio-bis- nitrobenzoesäure
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
GOT	Glutamat-Oxalazetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
GR	Glutathion-Reduktase
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathiondisulfid
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HO·	Hydroxylradikal
HOCl	Hypochlorige Säure
HSP	Heat-Shock-Protein
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1
IL	Interleukin
IPC	Ischämische Präkonditionierung
IP	Interventionsgruppe mit ischämischer Präkonditionierung
I / R	Ischämie / Reperfusion
IRS	Ischämie- / Reperfusionsschaden
IVM	Intravitale Fluoreszenzmikroskopie
K ⁺	Kalium-Ionen
KC	Kupffer-Zelle
KG	Körpergewicht
KO	Kontrollgruppe
LDH	Laktatdehydrogenase
LL	Linker Leberlappen
LR	Rechte Lebersegmente
MAP	Arterieller Mitteldruck

MDA	Malondialdehyd
MW	Mittelwert
MZ	Midzonal
Na ⁺	Natrium-Ionen
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
NFκB	Nukleärer Faktor κB
NO	Stickstoffmonoxid
O ₂ ⁻	Superoxidanion-Radikal
PAF	Plättchen-aktivierender-Faktor
PMN	Polymorphkerniger, neutrophiler Granulozyt
PP	Periportal
PSV	postsinusoidalen Venole
PZ	Perizentral
ROS	Reaktive Sauerstoff-Spezies
SEM	Standard error of mean
SH	Sham-Gruppe
SOD	Superoxid-Dismutase
TNB	Thionitrobenzoesäure
TNF-α	Tumor-Nekrose-Faktor α
ZF	Zucker Fat
ZL	Zucker Lean

IX. ANERKENNUNG UND DANK

Mein Dank gilt zuerst und im Besonderen meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. R. J. Schauer, ehemaliger Oberarzt und Leiter der Lebertransplantationsgruppe der Chirurgischen Klinik am Universitätsklinikum Großhadern der LMU München und nun Chefarzt der Chirurgischen Abteilung im Klinikum Traunstein, für die Überlassung des Themas sowie für seine umfassende und konstruktive Betreuung. Unter seiner Instruktion erlernte ich die für die Versuche notwendige Operationstechnik und aufgrund der vielen konstruktiven Gespräche und Interpretation der Ergebnisse letztlich auch wissenschaftliches Arbeiten. Gleichzeitig sorgte er für den notwendigen Bezug der Experimente zum klinischen Alltag. Die stets bereitwillig zur Verfügung gestellte, freundschaftliche und inspirierende Unterstützung hat entscheidend zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen.

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 der Umsetzung und Verwirklichung meiner Dissertation am Institut für Chirurgische Forschung bzw. an der Chirurgischen Klinik des Klinikums Großhadern der LMU München.

Für die aufwendigen Bestimmungen der Glutathion-Konzentrationen möchte ich mich bei Herrn PD Dr. med. M. Bilzer aus der Medizinischen Klinik II des Universitätsklinikums Großhadern der LMU München sowie seiner Mitarbeiterin Frau I. Liß bedanken, sowie auch Herrn Dr. med. D. Mühlbayer und den Mitarbeitern des Instituts für Klinische Chemie des Klinikums Großhadern für die Bestimmung der Lebertransaminasen.

Weiterhin 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 gilt außerdem auch folgenden (ehemaligen) Mitarbeitern des Instituts für chirurgische Forschung der LMU München, ohne deren Hilfe diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre: Dr. Daniel Vonier, Dr. Sinan Kalmuk, Dr. Kazuhiko Yamagami und Dr. Tobias Pflederer. Ihre Anregungen und konstruktiven Anweisungen haben wesentlich zum Gelingen meiner Dissertation beigetragen.

Nicht zuletzt möchte ich auch meinen Eltern und meiner Schwester für ihre moralische und mit leichten Nachdruck versehene Unterstützung herzlich danken.

IX. LEBENSLAUF

- Name:** Merz
- Vornamen:** Robert Ian
- Geburtsdatum:** 17. April 1977
- Geburtsort:** München
- Eltern:** Dr.-Ing. Gerhard Merz
Mary Teresa Merz-Bloomer, B.A.
- Schulbildung:** 1983-87: Grundschule in Baierbrunn
1987-96: Gymnasium in Icking
1996: Abitur
- Studium:** 1996-2003: Studium der Humanmedizin an der LMU München
- 1998: Abschluss des Vorklinischen Studienabschnitts
 - 1999: Abschluss des 1. Klinischen Studienabschnitts
 - 2002: Abschluss des 2. Klinischen Studienabschnitts
 - 2002-03: Praktisches Jahr in Toronto, Kanada; Starnberg und Traunstein, Deutschland; Basel, Schweiz.
 - 2003: Abschluss des Studiums der Humanmedizin
- Beruf:** Seit 1. Juli 2003 Arzt im Praktikum auf der Abteilung für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde am Universitäts-Kantonsspital Basel, Schweiz.