

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Ischämische Präkonditionierung:
Bedeutung für Ischämie/ Reperfusionsschädigung und
Leberregeneration nach partieller Hepatektomie mit temporärer
Organischämie im Rattenmodell

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Simone Münchow

aus Berlin

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. M. Glanemann
2. Prof. Dr. med. U. Kaisers
3. Priv.-Doz. Dr. med. R. Pfitzmann

Datum der Promotion: 22.02.2008

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1	Generelle Aspekte	7
1.2	Pathomechanismus der Ischämie/ Reperfusionsschädigung	9
1.3	Konzepte zum Schutz vor Ischämie/ Reperfusionsschädigung	10
1.4	Ischämische Präkonditionierung	11
1.5	Leberregeneration	12
1.6	Fragestellung	14

2. Material und Methoden

2.1	Versuchstiere	15
2.2	Behandlungsmethoden	15
2.2.1	70%ige Leberresektion	15
2.2.2	90%ige Leberresektion	16
2.3	Operationsprotokoll	17
2.4	Laborchemische Messungen	19
2.5	BCA-Proteinkonzentrationsmessungen	20
2.6	Proteinanalyse	21
2.7	Histologische Schnitte und Färbungen	25
2.8	Immunhistochemie	27
2.9	Hepatische Mikrozirkulation (Intravitalmikroskopie, Laserdopplerflowmetrie)	28
2.10	Statistik	30

3. Ergebnisse

A	70%-Leberresektion	31
3.1	Gewichtsverlauf	31
3.1.1	Körpergewicht	31
3.1.2	Gewicht der regenerierenden Leber	32
3.2	Laborchemische Analysen (Transaminasen, Bilirubin, Albumin)	33
3.2.1	Parameter der hepatozellulären Schädigung	33

3.2.2	Parameter der Lebersynthese- und Entgiftungsfunktion	34
3.3	Regenerationsparameter (Ki-67-Färbung, Mitose-Index, Cyclin-D1-Expression)	35
3.3.1	Ki-67-Färbung	35
3.3.2	Mitose-Index	36
3.3.3	Cyclin D1-Expression	37
B	90%-Leberresektion	38
4.1	Überleben	38
4.2	Laserdopplerflowmetrie	39
4.3	Intravitalmikroskopie/ Mikrozirkulation	40
4.3.1	Sinusoidale Perfusion	40
4.3.2	Volumetric blood flow und velocity	40
4.	Diskussion	42
5.	Zusammenfassung	49
6.	Literaturverzeichnis	51
7.	Lebenslauf	62
8.	Danksagung	64
9.	Erklärung	65

Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
ALT	Alaninaminotransferase
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase
AP	activator protein
AST	Aspartataminotransferase
ATP	Adenosintriphosphat
aU	arbitrary units
BCA	Biochinonic Acid
BSA	Bovines Serum Albumin
cdk	cyclin dependent kinase
D.	Ductus
EBP	enhancer binding protein
EDRF	endothelial derived relating factor
EGF	epidermal growth factor
HE	Hämatoxylin-Eosin
HGF	hepatocyte growth factor
I/R	Ischämie/ Reperfusion
ICAM	intercellular adhesion molecule
IL	Interleukin
IP	Ischämischen Präkonditionierung
IVM	Intravitalmikroskopie
kD	Kilodalton
Lig.	Ligamentum
LTR	Leberteileresektion
NFKB	nuclear factor kappa B
NO	nitrogenium oxide
PAF	platelet activating factor
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PMN	polymorphkernige Granulozyten
POD	postoperative day
ROS	reactive oxygen species

SEM	standard error of means
STAT	signal transducer and activator of transcription
TGF	transforming (tumor) growth factor
TNF	Tumornekrosefaktor
TUNEL	Terminale Desoxyribosyl-Transferase mediated dUTP Nick End Labeling
V.	Vena
VCAM	vascular adhesion molecule

1. Einleitung

1.1 Generelle Aspekte

Die Leberchirurgie stellt in der heutigen Zeit eines der wichtigsten Behandlungskonzepte primärer und sekundärer Lebertumoren dar. So ist beispielsweise die Leberresektion Mittel der Wahl beim hepatozellulären Karzinom, einem der häufigsten primären Lebertumore in Europa, aber auch eine Behandlungsmethode, die eine effektive chirurgische Therapie von Lebermetastasen oder -traumata ermöglicht. Das postoperative Risiko bei Leberresektionen wird neben allgemeinen Risikofaktoren wie Nebenerkrankungen oder reduziertem Allgemeinzustand des Patienten im Wesentlichen von Größe und Funktion des verbleibenden Restleberparenchyms bestimmt. Prinzipiell kann man davon ausgehen, dass ca. 80% des Leberparenchyms reseziert werden können, ohne dass es postoperativ zu einem Ausfall lebenswichtiger metabolischer Funktionen kommt. Bei optimaler Regeneration ist bereits nach 6 Monaten eine komplette Restitution von normal funktionierendem Lebergewebe erfolgt [Court 2002].

Anders verhält es sich, wenn das Leberparenchym bereits durch fibrotischen oder zirrhotischen Umbau vorgeschädigt ist [Ezaki 1998, Chiappa 2000, Mann 2001] oder aber während der Operation eine temporäre Reduktion der Blutzufuhr nötig wird (mittels so genannten Pringle-Manövers), um beispielsweise größere Blutverluste zu vermeiden, was zu einer Schädigung des verbleibenden Leberparenchyms führen kann.

Ist die hepatozelluläre Regenerationsfähigkeit eingeschränkt, kann es postoperativ zu lebensbedrohlichen Komplikationen kommen. Diese sind zum einen primär durch die Stoffwechselfunktion der Leber bedingt [Tucker 2005], können zum anderen aber auch durch sekundäre Folgen wie zum Beispiel hepatorenales oder hepatopulmonales Syndrom verursacht werden [Cardenas 2005]. Die klinische Manifestation reicht hierbei von der partiellen Leberinsuffizienz mit allen denkbaren Folgen bis hin zum kompletten Organausfall, der mit dem Leben nicht mehr vereinbar ist.

Eine weitere Schwierigkeit leberresezierender Eingriffe besteht in der Tatsache, dass die Leber als größtes parenchymatöses Organ sowohl stark durchblutet ist, als auch

eine äußerst fragile Gewebsstruktur besitzt. Neben allgemeinen Techniken zur Vermeidung von Blutungen wie der Wahl eines adäquaten Zuganges, Minimierung der venösen Füllung sowie kontrollierte Parenchymdurchtrennung, kann ein zeitlich limitiertes Unterbinden der Blutzufuhr zuweilen notwendig werden [Bechstein 2000]. So können intraoperative Blutverluste gering gehalten und damit verbundene Komplikationen vermieden werden, zugleich wird für eine bessere Übersicht über das Operationsfeld gesorgt. Diese als „warme Ischämiezeit“ bezeichnete Dauer der Mangeldurchblutung wird vom Leberparenchym bis zu 30 Minuten toleriert [Blumhardt 1986, Bismuth 1989].

Die praktische Durchführung erfolgt durch das bereits zuvor erwähnte sogenannte Pringle-Manöver [Pringle 1908], dem Abklemmen des Lig. hepatoduodenale, in welchem A. hepatica propria, V. portae und D. choledochus verlaufen. Durch die vollständige Unterbrechung der Blutzufuhr (Ischämie) kommt es aber auch zwangsläufig zu einer Unterbrechung der Sauerstoffzufuhr, was im Organ selbst zu einer Gewebshypoxie führt. Mit nachfolgender Wiederherstellung des Blutflusses durch Öffnen der Gefäßklemme erfolgt die Reperfusion mit erneuter Oxygenierung des Lebergewebes. Beide Faktoren, sowohl Ischämie als auch Reperfusion, können eine Organschädigung hervorrufen, welche als Ischämie/ Reperfusionsschaden bezeichnet wird.

Die genauen Mechanismen dieser Gewebsschädigung durch Ischämie/ Reperfusion (I/R) sind im Einzelnen noch nicht hinreichend geklärt und aufgrund der Bedeutsamkeit einer möglichen Reduktion des I/R-Schadens Gegenstand aktueller Forschung [Jaeschke 1996, Bilzer 2000, Kim 2003, Teoh 2003, Arii 2003, Schemmer 2004, Glanemann 2004, Hirsch 2006]. Derzeit geht man von einem multifaktoriellen Geschehen aus, bei dem sowohl Zytokine und vasoaktive Substanzen, als auch reaktive Sauerstoffspezies beteiligt sind [Glanemann 2001].

1.2 Pathomechanismus der Ischämie/ Reperfusionsschädigung

In der Phase der Ischämie führt die verminderte Gewebsoxygenierung zu einer anaeroben Stoffwechsellage, in der vermehrt ATP hydrolysiert wird und durch anaerobe Glykolyse zunehmend Lactat anfällt: es kommt zur intrazellulären Azidose. Zum anderen zeigt sich, bedingt durch den ATP-Verlust, eine verminderte Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase, was zu einer konsekutiven Membrandepolarisation führt. Dies hat ein Öffnen spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle zur Folge, wodurch die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration ansteigt, die eine Schädigung des Cytoskeletts nach sich zieht. Die Membranpermeabilität steigt und führt durch zytoplasmatisches Anschwellen durch Osmose zur Zellschädigung [Marubayashi 1980, Teoh 2003, Arai 2003].

Während der initialen Phase der Reperfusion kommt der kupferzellinduzierten Freisetzung verschiedenster Sauerstoffradikale eine zentrale Rolle hinsichtlich der Zellschädigung zu. Diese reaktive Sauerstoffspezies wie Superoxidanione und Hydrogenperoxide stellen starke Zellgifte dar, die durch Schädigung von Zellproteinen und Membranbestandteilen insbesondere die sinusoidalen Endothelzellen direkt schädigen [Clavien 1998, Cutrin 2002].

Des Weiteren werden durch die Aktivierung der Kupfer-Zellen Zytokine wie Interleukin (IL)-1, Tumornekrosefaktor α ($\text{TNF}\alpha$) und platelet activating factor (PAF) freigesetzt [Mueller 1996, Jaeschke 1996, Arai 2000]. Diese wiederum führen zur Expressionssteigerung diverser Adhäsionsmoleküle wie intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular adhesion molecule-1 (VCAM-1) oder P-Selektin, die zur verstärkten Adhärenz von Leukozyten an Endothelzellen führen [Jaeschke 1997, Martinez-Mier 2000, Arai 2003]. Es kommt zur Transmigration von Leukozyten, insbesondere polymorphkerniger Granulozyten (PMN), in das hepatozelluläre Interstitium, wobei durch die PMN-Aktivierung neben Proteasen und hydrolytischen Enzymen wiederum zytotoxische Sauerstoffradikale freigesetzt werden [Lentsch 2000]. Neben der Anlagerung von Leukozyten kommt es ebenso zu einer vermehrten Adhäsion von Thrombozyten an die Endothelzellen, was die Entstehung von Mikrothromben durch Leukozyten- und Plättchenaggregation [Martinez-Mier 2000] zur Folge hat. Dieser Effekt wird zudem durch die Freisetzung von PAF aus den Kupfer-Zellen sowie durch Endothelzellschädigung verstärkt. Es resultiert eine deutliche

Einschränkung der Mikroperfusion mit einer Verlangsamung des Blutflusses bis hin zur völligen Stase und hiermit einhergehend die Ausbildung ischämischer Infarktzone mit Schädigung des Leberparenchyms [Glanemann 2001].

Diese beschriebenen pathophysiologischen Vorgänge - osmotische Zellschädigung durch anaeroben Stoffwechsel, kupferzellaktivierte reaktive Sauerstoffspezies/ Adhäsionsmoleküle und Mikrozirkulationsstörung - sind nur wenige der beteiligten Interaktionen im Rahmen der IR-bedingten Zellschädigung, jedoch bieten sie zahlreiche Ansätze für eine Reduktion derselben.

1.3 Konzepte zum Schutz vor Ischämie/ Reperfusionsschädigung

Um lebensbedrohliche bzw. lebensbeendende Folgen einer ungenügenden Restleberfunktion zu vermeiden, ist es also außerordentlich wichtig, die durch I/R bedingte Gewebsschädigung so gering wie möglich zu halten.

Da Operationstechniken und folglich auch die Minimalisierung der Ischämiezeit schon weitestgehend optimiert wurden, kann bezüglich dieser Einflussgröße lediglich eine Erhöhung der Ischämietoleranz und ein daraus resultierender verminderter Parenchymschaden zu einer Verbesserung der Restleberfunktion führen.

Aus diesem Grunde wurden bereits verschiedene Konzepte zur Erhöhung der Ischämietoleranz bzw. Reduktion des I/R-Schadens erstellt. An dieser Stelle sei die bereits in der Leberchirurgie angewandte intraoperative Therapie mit Kortikoiden erwähnt, die u.a. durch ihre antiinflammatorische Wirkung eine Protektion vor I/R-Schädigung erzielen [Shimada 1996, Valen 2000, Yamashita 2001, Glanemann 2004]. Glukokortikoide binden an zytoplasmatische Rezeptoren und bewirken im Zellkern eine Änderung der Transkriptionsrate sensibler Gene, die beispielsweise antiinflammatorische Proteine wie Lipocortin-1, IL-10 oder IL-1-Rezeptor-Antagonisten kodieren. Ebenso kommt es zu einer direkten Beeinflussung des Transkriptionsfaktors NF κ B und Aktivatorprotein-1 (AP-1), die die Expression inflammatorischer Gene regulieren. Insbesondere Zytokine wie IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-6, IL-11 und TNF α , die auch

bei der Ausbildung des hepatischen Ischämie/ Reperfusionsschadens beteiligt sind, sind von der hemmenden Wirkung betroffen.

Darüber hinaus scheinen Steroide einen protektiven und stabilisierenden Einfluß auf die Zellmembran zu haben [Wang 2001].

Eine weitere Möglichkeit zum Schutz vor Ischämie/ Reperfusionsschädigung bietet die Gabe von Kalziumkanalblockern wie Verapamil, die in der Phase der Ischämie durch Hemmung des Kalziumeinstroms schützend auf die Mitochondrien wirken und gleichzeitig als Vasodilatoren agieren [Uchida 1994, Oliviera 2001].

Anderer Ansätze verfolgen die Verbesserung der Mikrozirkulation durch Verabreichung von NO-Donatoren [Liu 1998, Kim 2004,], die Gabe von ROS-Fängern [Yokota 2000] oder Antikörpern gegen Adhäsionsmoleküle [Kuzume 1997, Yadav 1998].

1.4 Ischämische Präkonditionierung

Eine vollkommen andere Strategie bietet die Methode der Ischämischen Präkonditionierung (IP), die bereits von zahlreichen Autoren als ein wirksamer Schutz vor I/R-Schädigung beschrieben wurde [Hardy 1996, Peralta 1996, Hawaleshka 1998, Clavien 2000, Peralta 2003, Teoh 2003] und Gegenstand intensiver Forschung ist. Bei dieser Methode wird der eigentlichen, intraoperativ benötigten Ischämie eine kurze Ischämiephase vorangeschaltet, gefolgt von einer Phase der Reperfusion, um somit endogene Protektionsmechanismen des Organs zu aktivieren. Die Wirksamkeit dieser Vorgehensweise wurde erstmalig von Murrey et al. am Myokard des Hundes beschrieben [Murrey 1986] und durch zahlreiche nachfolgende Studien an diversen Spezies [Schott 1992, Downey 1993, Yellon 1992] und Organen bestätigt [Hotter 1996, Hardy 1996, Ogawa 1998, McCallion 2000].

Clavien et al. bestätigten im Jahr 2000 schließlich die protektive Wirkung der IP im Rahmen einer klinischen Studie und konnten zeigen, dass es postoperativ nach Hemihepatektomie zu einer signifikanten Erniedrigung der Serumtransaminasen kommt [Clavien 2003].

Mit der Unterschiedlichkeit der vorangegangenen Versuchsaufbauten bezüglich Spezies und untersuchter Organe divergieren jedoch die Daten hinsichtlich einer einheitlichen Dauer von Ischämie- bzw. Reperfusionphase. Schon Hardy et al. konnten 1996 zeigen, dass das Phänomen der ischämischen Präkonditionierung durchaus zeitabhängig ist [Hardy 1996]. In vorangegangenen Studien unserer Forschungsgruppe konnte hierfür am Rattenmodell ein Zeitprotokoll erstellt werden, in dem ein optimaler Schutz vor I/R-Schädigung bei einem IP-Intervall von 5-minütiger Ischämiephase mit anschließender 30-minütiger Reperfusionsdauer nachgewiesen wurde [Glanemann 2004]. Dieses Protokoll dient als Grundlage für die in dieser Arbeit verwendeten Ischämie- bzw. Reperfusionszeiten.

1.5 Leberregeneration

Geht man davon aus, dass durch die Methode der Ischämischen Präkonditionierung der Ischämie/ Reperfusionsschaden, der während der Operation erzeugt wird, verringert werden kann, so drängt sich doch an dieser Stelle die Frage auf, ob hierdurch auch ein positiver Einfluss auf die Leberregeneration ausgeübt wird [Teoh 2003].

Bereits in der Antike war die enorme Regenerationsfähigkeit der Leber bekannt, die beispielsweise in der griechischen Mythologie in der Sage des Prometheus beschrieben wird. Dennoch sind bis zum heutigen Tage noch nicht alle Faktoren aufgeklärt, die in der hepatozellulären Regeneration eine Rolle spielen [Fausto 2000].

Normalerweise befinden sich Hepatozyten in einem Ruhezustand, der der G_0 -Phase des Zellzyklus entspricht. Nur 1 von 1000 Zellen tritt im Normalzustand in die G_1 -Phase ein, um nachfolgend den Proliferationszyklus zu durchlaufen [Court 2002]. Tritt jedoch ein vermehrter Verlust von Leberzellen ein, wie es beispielsweise bei chirurgischen Resektionen der Fall ist, bewirkt das Zusammenspiel verschiedenster Faktoren eine Aktivierung der „ruhenden“ Hepatozyten, um durch Proliferation die funktionelle Kapazität der Lebermasse aufrechtzuerhalten [Kountouras 2001].

Der Prozess der Leberzellregeneration beinhaltet das Zusammenspiel vieler verschiedener Einflussfaktoren, jedoch können zwei grundlegende Phasen unterteilt

werden: Die erste, sogenannte priming-Phase, beinhaltet die Aktivierung diverser Transkriptionsfaktoren wie NF κ B, STAT3, C/EBP β und AP-1 durch Cytokine (TNF, IL-6, IL-1). Es kommt zur Expression sogenannter „immediate-early“ Gene (c-fos, c-jun, jun B etc.), die in einer sehr frühen Phase (innerhalb der ersten 4 Stunden nach Hepatektomie) aktiviert werden [Morello 1990, Hsu 1992]. Durch dieses „priming“ werden die Zellen sensibilisiert für Wachstumsfaktoren wie HGF, EGF und TGF α , deren Anwesenheit ebenso Voraussetzung für den Eintritt der Hepatozyten in die G₁-Phase sind wie der Vorgang des priming an sich [Kountouras 2001].

Die zweite Phase (Progressionsphase) beginnt nach Überschreiten der Schwelle von G₀ zu G₁ und wird weiterhin von Wachstumsfaktoren beeinflusst bis zu einem Punkt in der G₁-/ S-Phase, an dem die DNA-Replikation unabhängig von selbigen verläuft [Fausto 2000]. Dieses Stadium wird durch Expression von Cyclin D1 gekennzeichnet [Koutouras 2001], einer Untereinheit der cdk (cyclin dependent kinase), die zur Aktivierung dieser Kinase mit derselben einen Komplex eingeht [Jaumot 1999]. Cyclin-ckd-Komplexe vermitteln intrazelluläre Signale zur Regulation des Zellzyklus an verschiedenen Stellen [Sherr 2004, Pines 2006], worauf ich aufgrund der Komplexität dieses Themas aber nicht näher eingehen möchte. Zu erwähnen sei allerdings, dass unterschiedliche Cycline (Cyclin D, -E, -A, -B) zu verschiedenen Zeitpunkten während des Zellzyklus exprimiert werden [Albrecht 1999] und somit zwar einen überaus geeigneten Marker für das Ausmaß der Regeneration darstellen, jedoch ihre verschiedenen Maxima zu unterschiedlichen Zeitpunkten aufweisen und folglich - einzeln betrachtet - nicht den gesamten Zellzyklus abdecken.

Stocker et al. zeigten anhand 12-maliger sequentieller Leberresektionen [Stocker 1973], dass die Regenerationsfähigkeit dieses Organs nahezu unerschöpflich ist. Dennoch ist es notwendig, die Hepatozytenproliferation auf ein optimales Verhältnis von Leber- zu Körpermasse einzuschränken. Als wachstumshemmende Faktoren wirken beispielsweise TGF- β und Activin, die trotz ihrer hemmenden Wirkung bereits kurz nach Hepatektomie vermehrt ausgeschüttet werden. Ein Beispiel für das sensible Gleichgewicht wachstumsstimulierender und -hemmender Faktoren ist die Transplantation großer Spenderlebern in einen bezüglich der Körpergröße kleinen Empfänger (sog. „large for size“ Transplantation). In diesen Fällen nimmt die

Lebergröße exakt bis zu dem Punkt ab, an dem das Verhältnis von Körper zu Organfunktion ausgeglichen ist [Kam 1987].

Obwohl die Genese der Leberregeneration im Fokus zahlreicher Forschungen liegt, sind nicht alle Mechanismen und Einflussfaktoren vollständig aufgeklärt. Weitere Untersuchungen sind nötig, um eventuelle (Therapie-) Ansätze zur größtmöglichen Steigerung der Regeneration aufzuzeigen.

1.6 Fragestellung

Da die Funktion des Restleberparenchyms hauptsächlich vom Ausmaß der resezierten Lebermasse abhängt, ist es erstrebenswert, die Leistungsfähigkeit der verbleibenden Organmasse zu optimieren. Eine Steigerung der Regenerationsfähigkeit ist hierbei ein möglicher Ansatz. Hierdurch könnten nicht nur postoperative Komplikationen minimiert werden, es wäre sogar denkbar, das Ausmaß der maximalen Resektion zu vergrößern. Könnte dies erfolgen, wäre ein derzeit als inoperabel eingeschätztes Patientengut einer Operation zugänglich zu machen.

Bezüglich zuvor beschriebener Methode zur Verringerung des Ischämie/ Reperfusionsschadens ergeben sich an dieser Stelle folgende Fragen, die in nachfolgenden Untersuchungen geklärt werden sollen:

1. Führt Ischämische Präkonditionierung auch an der regenerierenden Leber zu einer Verringerung des hepatozellulären Ischämie/ Reperfusionsschadens?
2. Falls diese Organprotektion gegeben ist, wird dadurch auch die Proliferation im Rahmen der Leberregeneration positiv beeinflusst?

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Für die Tierversuche wurden männliche, ca. 250 – 300 g schwere Wistarratten der Firma Harlan-Winkelmann, Borcheln, Deutschland verwandt. Die Tierhaltung erfolgte zu fünf Tieren pro Käfig unter konstanten Temperaturbedingungen bei 20 bis 24°C im Forschungsgebäude der Charité, Humboldt-Universität Berlin, Campus Virchow-Klinikum. Die Tiere hatten freien Zugang zu Futter und Trinkwasser ad libitum und einen natürlichen Tag-/ Nachtrhythmus.

2.2 Behandlungsmethoden

2.2.1 70%ige Leberresektion

Es wurden 2 Gruppen gebildet (n=8 Tiere pro Gruppe), um die Effizienz der IP-Behandlung in Bezug auf die Ischämie/ Reperfusionsschädigung zu analysieren. Gruppe 1 stellte die Kontrollgruppe dar (K = Kontrolle), die der Operation mit warmer Ischämie unterzogen wurde, während Gruppe 2 zusätzlich eine Ischämische Präkonditionierung (IP) erhielt.

Die gemeinsame Behandlung der Tiere der ersten Versuchsreihe bestand in einer 70%igen Leberteileresektion (LTR), die während einer 30-minütigen warmen Leberischämie durchgeführt wurde (siehe Operationsprotokoll).

Alle Tiere erhielten während der Leberteileresektion eine warme Ischämie durch Unterbrechung der Blutzufuhr zur Leber von 30 Minuten. Dieses wurde durch das hilusnahe Abklemmen des Lig. hepatoduodenale, welches auch als Pringle-Manöver bekannt ist, realisiert. Der optimale Zeitrahmen für die Dauer der Ischämie- bzw. Reperfusionsphase im Rahmen der I/P-Behandlung, die der Resektions- bzw. Ischämiephase vorgeschaltet wurde, konnte bereits in vorangegangenen Studien unserer Forschungsgruppe festgelegt werden [Glanemann 2003].

Die folgende tabellarische Aufstellung fasst das Behandlungsprotokoll zusammen:

Gruppe	Operation	Ischämie	Vorbehandlung	Zeitpunkt der Tötung
1.1	70% LTR	30 min.	keine	1. POD
1.2	70% LTR	30 min.	keine	4. POD
1.3	70% LTR	30 min.	keine	7. POD
2.1	70% LTR	30 min.	IP (5/30 min.)	1. POD
2.2	70% LTR	30 min.	IP (5/30 min.)	4. POD
2.3	70% LTR	30 min.	IP (5/30 min.)	7. POD

Tab. 2.2: Behandlungsprotokoll

2.2.2 90%ige Leberresektion

Um Rückschlüsse auf die Leberregeneration zu erhalten, wurde die Leberresektion in der zweiten Versuchsreihe auf 90% erweitert, was die Tiere subletalen Bedingungen unterwirft und eine Überlebensanalyse ermöglicht. Hierfür wurden erneut 2 Gruppen gebildet, von denen die erste die Kontrollgruppe darstellte (30-minütige warme Leberischämie + 90% Leberresektion) und die zweite wiederum zusätzlich mit der Methode der IP vorbehandelt wurde. Jede Gruppe bestand aus 10 Tieren.

Des Weiteren wurde nach erfolgter Resektion und vor Verschluss der Bauchdecken die frühe postischämische Mikrozirkulation mittels Intravitalmikroskopie (IVM) und Laserdopplerflowmetrie betrachtet (siehe 2.8).

2.3 Operationsprotokoll

Materialien

Operationsinstrumente: Chirurgische Standardausstattung

Nahtmaterial:

Ethicon® Vicryl 3.0	Johnson & Johnson, Intl, SA8JQBB0
Prolene® 6.0	Ethicon, Norderstedt, D, JL4HQPB
Resolon® 3.0	Resorba, Nürnberg, D, REF 881519

Narkosegerät

Reagenzien

Isoflurane	Abbott GmbH, Wiesbaden, D
NaCl 0,9 %	Braun AG, Melsungen, D, 1.06404

Zur Narkoseeinleitung wurden die Tiere einem Isoflurane-Sauerstoffgemisch ausgesetzt. Anschließend erfolgten die Rasur des Operationsfeldes und die Ermittlung des präoperativen Gewichtes der Tiere. Mittels Leukosilkpflaster und Kanülen wurden die Extremitäten der Tiere atraumatisch auf einem Korkbrett fixiert, um die freie Sicht auf das Operationsfeld zu ermöglichen. Nach Anschluss des Schlauchsystems und Gewährleistung eines konstanten Flows wurde sichergestellt, dass die Tiefe der Inhalationsnarkose ausreichend war.

Die Eröffnung des Bauchsitus erfolgte mittels medianer Laparotomie. Anschließend wurde die Leber freipräpariert und das Ligamentum hepatoduodenale aufgesucht. Die warme Ischämiephase der Leber wurde mittels Pringle-Manöver induziert. Zu diesem Zweck wurde das gesamte Ligamentum hepatoduodenale mit Hilfe einer Gefäßklemme temporär unterbunden.

Die Tiere der IP-Gruppe erhielten vor Beginn der eigentlichen Ischämiephase eine 5 Minuten andauernde Ischämie mit anschließender 30-minütiger Reperfusionphase. Unter Blutleere wurden dann die Haltebänder der Leber durchtrennt, die einzelnen Leberlappen identifiziert und mit 3-0 Vicryl-Fäden gefäßstammnah legiert. So dass entsprechend der Methode von Higgins und Anderson eine 70%ige bzw. 90%ige LTR resultierte [Higgins 1931].



Abb. 2.3.1: Parenchymmasse nach 70%iger Leberresektion



Abb. 2.3.2: Parenchymmasse nach 90%iger Leberresektion

Nach genau 30 Minuten wurde die Gefäßklemme gelöst und eventuell auftretende Blutungen aus der Schnittfläche der Leber durch Übernähung mit Prolene® 6-0-Nahtmaterial gestoppt. Nach Sicherstellung von Bluttrockenheit erfolgte der Verschluss der Bauchdecken mittels Resolon® 3-0 in fortlaufender Nahttechnik.

Postoperativ wurden die Tiere erneut gewogen und durch i.m.-Injektion von Diclofenac analgesiert. Die Tiere wurden anschließend in Einzelkäfigen untergebracht und erhielten freien Zugang zu Futter und Trinkwasser ad libitum.

Alle Gruppen wurden im Zeitverlauf über 6 Stunden bzw. 1, 4 und 7 Tage beobachtet und nach Beendigung des Beobachtungszeitpunktes zu Blut- und Gewebeanalysen getötet. Der Situs wurde hierzu erneut eröffnet und durch Punktion der V. cava inferior wurde mittels Kanüle und Serumröhrchen von jedem Tier etwa 5 ml Blut für die Bestimmung der Laborparameter entnommen werden. Anschließend wurde die Restleber entfernt, in flüssigem Stickstoff zwischengelagert und bis zur weiteren Untersuchung bei -80°C tiefgekühlt.

2.4 Laborchemische Messungen

Zur Erfassung des Ischämie-Reperfusionsschadens bzw. der Synthese-/Entgiftungsfunktion wurden folgende Parameter untersucht: Bilirubin, Albumin sowie die Transaminasen Aspartataminotransferase (AST) und Alaninaminotransferase (ALT).

Zu diesem Zweck wurde nach Blutentnahme aus der V. cava das in den Serumröhrchen enthaltene Blut in einer vorgekühlten Zentrifuge mit 3000 g für 10 Minuten zentrifugiert und anschließend das Serum abpipettiert. Dieses wurde daraufhin in der Abteilung für Klinische Chemie der Charité, Campus Virchow-Klinikum, Berlin, Deutschland mittels handelsüblicher Reaktionskits untersucht.

Die Transaminasen ALT und AST wurden gewählt, um den Ischämie-Reperfusionsschaden zu quantifizieren. So ist die ALT ein leberspezifisches Enzym, das hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert ist. Bei Leberzellschäden kann diese aufgrund einer erhöhten Zellmembranpermeabilität vermehrt im Blut nachgewiesen werden. Die AST hingegen ist ubiquitär vorhanden und nicht leberspezifisch. Sie kann sowohl im Zytoplasma (zu rund 30%), als auch in Mitochondrien (zu etwa 70%) nachgewiesen werden. Schwere Schädigungen der Hepatozyten lassen vermehrt die mitochondriale AST in das Plasma übertreten, so dass man bei einem Verhältnis von $\text{AST/ALT} > 1$ (De Ritis-Quotient) von einem vermehrten Untergang an Leberzellen ausgehen kann.

Albumin und Bilirubin hingegen geben Rückschlüsse auf die Synthese- bzw. Entgiftungsfunktion der Restleber [Gressner 1989, Shaked 1997].

2.5 BCA-Proteinkonzentrationsmessungen

Die Biochinonicsäuremethode (BCA) beruht prinzipiell auf der sogenannten Biuretreaktion, bei der Cu^{2+} -Ionen in alkalischer Lösung mit Proteinen einen blauvioletten Komplex bilden, der photometrisch bei einer Wellenlänge von 550 nm gemessen werden kann.

Materialien/ Geräte

Ultra-Turrax T25	Janke und Kunkel, IKA-Labortechnik, D
96 Well Mikrotiterplatte	
FLUOstar Galaxy V4.30-0	BMG Labtechnologies, Offenburg, D

Reagenzien

PI-Puffer

PMSF	Sigma, P-7626, Deisenhofen, D
Kupfersulfat (CuSO_4) 4%	Fluka, 61245, Neu-Ulm, D
BCA-Reagenz (Biochinonic Acid Solution)	Sigma, B-9643, USA
BSA-Standard (Bovines Serum Albumin in Wasser 2000 $\mu\text{g/ml}$)	Sigma, A 6003, Steinheim, D

Puffer

PI-Puffer	TES 20 mM
	DTT 2 mM
	Glycerol 10 %
Rea-Mix (für 40 Proben):	BCA-Reagenz 15 ml
	Kupfersulfat 300 μl

Um die Proteinkonzentration im Lebergewebe messen zu können, musste zuerst ein verdünntes Homogenisat aus Gewebe und Puffer hergestellt werden. Hierfür wurde pro Tier etwa 100 mg Lebergewebe in ein Glasröhrchen eingewogen und mit 1 ml PI-Puffer und 1 μl PMSF versetzt. Mit Hilfe des Ultraturax wurde die Probe dismembriert.

Vor der eigentlichen Messung wurden die Proben bei 3300 g für 15 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das entstandene Pellet erneut mit Aqua dest. gelöst. Diese Waschung wurde zweimal wiederholt, um nachfolgend das Pellet in Aceton zu lösen und für 24 Stunden trocknen zu lassen. Danach wurden die Proteinpellets in 1 ml NaOH bei 60°C im Wasserbad gelöst.

Da für ein veritables Messergebnis Proteinkonzentrationen im Bereich von 250 bis 500 µg/ml angeraten werden, wurden die Proben 1:50 oder 1:100 mit Aqua dest. verdünnt.

Der BSA-Standard wurde in einer Verdünnungsreihe von 5 Proben mit den Konzentrationen von 1000 µg/ml bis 62,5 µg/ml eingesetzt.

Je 20 µl der 5 Standards, des Leerwertes (Aqua dest.) und der verdünnten Proben wurden in die Mikrotiterplatte eingefüllt und mit 300 µl Rea-Mix bedeckt. Anschließend erfolgten die 30-minütige Inkubation der Platte bei 37°C und die Messung mit dem Photometer.

Um für jede Probe die gleiche Konzentration an Protein zu erhalten, und somit die Tiere untereinander vergleichen zu können, wurden die Proben je nach Proteinkonzentration auf 100 µg/10 µl mit PI-Puffer verdünnt.

2.6 Proteinanalyse

Die Proteinbestimmung aus dem Lebergewebe erfolgte mit der Methode des Western Blot. Das Prinzip des Western Blot beruht auf der gelelektrophoretischen Auftrennung der Proteine aus dem verdünnten Leberhomogenisat mittels SDS/ Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE). Hierbei wandern die Proteine durch eine Gelmatrix und werden anschließend auf eine Nitrocellulose-Membran mittels Wet-Transfer-Methode geblottet.

Durch Inkubation der Membran mit einem Primärantikörper und der Behandlung mit dem entsprechenden sekundären Antikörper kann mittels Chemiluminescence-Reaktion die spezifische Proteinbande sichtbar gemacht werden.

Prinzipiell reagiert hierbei der spezifische Primärantikörper, der gegen das zu untersuchende Protein gerichtet ist, mit der Proteinoberfläche der Nitrocellulose-Membran und der sekundäre Antikörper wiederum mit dem Fc-Fragment des primären. Da der Sekundärantikörper mit einer Peroxidase modifiziert ist (peroxidase-labeled), oxidiert dieser das in der ECL-Detection-Reagenz enthaltene Luminol. Dies führt zu

einer Lichtemission mit einer maximalen Wellenlänge von 428 nm, welche in einer Dunkelkammer mit Hilfe von Entwicklergerät und Film die spezifischen Banden sichtbar werden lässt.

Materialien/ Geräte

Blockthermostat BT100	Kleinfeld-Labortechnik, Gehrden, D
Mini Protean 3 Electrophoresis-Cell-Set	Bio-Rad, 165-3301, München, D
Mini Trans-Blot Cell-Set	Bio-Rad, 170-3930, München, D
Nitrocellulose-Membran	Bio-Rad, 162-0112, München, D
Gel-Blotting-Papier	Schleicher&Schuell,10426694,Dassel,D
Kodak Film	Kodak, 636 03 5, Rochester, NY, USA

Reagenzien

NaH ₂ PO ₄ 2H ₂ O	Merck, 1.06345.1000, Darmstadt, D
Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O	Merck, 1.06580.1000, Darmstadt, D
NaCl	Merck, 1.06404.1000, Darmstadt, D
Glycin	Serva, 23390, Heidelberg, D
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	Merck, 8.17034.1000, Hohenbrunn, D
Tris Base	Sigma, T-1503, Steinheim, D
Tris HCl	Sigma, T-3253, Steinheim, D
Acrylamid 30 %	Roth, 3029.1, Karlsruhe, D
6-Aminohexansäure	Merck, 8.00145.0250, Hohenbrunn, D
Ammonium Persulfat	Sigma, A-9164, Steinheim, D
Methanol	J.T.Baker, 8045, Deventer, NL
Tetramethylethylenediamine	Sigma, T-9281, Steinheim, D
Tween20	Aldrich, 27.434-8, Steinheim, D
β-Mercaptoethanol	Calbiochem, 444203, Darmstadt, D
Bromphenol Blue	Sigma, B-6896, St.Louis, MO, USA
Glycerol	Sigma, G-7757, Steinheim, D
DTT	Sigma, D-0623, Deisenhofen, D
TES	Sigma, T-0772, St. Louis, MO, USA
Blot-Quick-Blocker (Milchpulver)	Chemicon, 2078E, Temecula, CA, USA
ECL Western blotting detection reagents	Amersham, RPN2106, Freiburg, D

Rainbow protein molecular weight marker	Amersham, RPN756, Freiburg, D
Monoclonal Anti-Cyclin D1 (Prim. AK)	Sigma, C7464, St. Louis, MO, USA
Anti-mouse IgG, peroxidase linked (Sek.AK)	Amersham, NA931, Freiburg, D

Zusammensetzungen/ Puffer

PI-Puffer	TES 20 mM
	DTT 2 mM
	Glycerol 10 % w/v
loading buffer for SDS-Gel	0,4 M Tris base (4,84 g)
(Lämmli-Puffer) für 100 ml	10 % SDS w/v
	50 % Glycerol w/v
	25 % β -Mercaptoethanol w/v
	1 Spatelspitze Bromphenolblau
	auf pH 7,5-8,0 titrieren
Trispuffer pH 8,8	1,5 M Tris base (18,15 g)
	100 ml Aqua dest.
	mit konzent. HCl auf pH 8,8 titrieren
Trispuffer pH 6,8	1 M Tris base (12 g)
	100 ml Aqua dest.
	mit konzent. HCl auf pH 8,8 titrieren
Laufpuffer	62,5 mM Tris pH 8,3 (30 g Tris base)
	192 mM Glycine (144 g)
	0,1 % SDS w/v
	mit Aqua dest. auf 1l auffüllen
Waschpuffer PBS mit Tween20	0,5 M Na ² HPO ₄ (82,3 g)
(10fach Stock)	0,17 M NaH ² PO ₄ 2H ₂ O (26,5 g)
	0,68 M NaCl (39,7 g)
	in 1 l Aqua dest. auflösen

Die Stocklösung vor Gebrauch 1:10 mit Aqua dest. verdünnen und 1 ml Tween20 hinzugeben.

Transfer-Puffer	2,9 g Glycin
	5,8 g Tris base
	0,37 g SDS
	in 200 ml Methanol lösen
	mit Aqua dest. auf 1 l auffüllen

Gelzusammensetzung

Loadinggel	Aqua dest. 3,2ml
	Acrylamid 0,5ml
	Trispuffer pH 6,8 1,25ml
	SDS 20 % w/v 50 μ l
	APS 100 μ l
	TEMED 10 μ l
Runninggel (z.B. 12,5 %)	Aqua dest. 3,4ml
	Acrylamid 4,0ml
	Trispuffer pH 8,8 2,5ml
	SDS 20 % w/v 0,1ml
	APS 50 μ l
	TEMED 5 μ l

Die Zusammensetzung des Runninggels wurde nach der Größe des zu untersuchenden Proteins gewählt. So würde man bei einer Proteingröße von 70-200 kD ein 5%iges Gel verwenden und ein 15%iges bei einer Größe von 8-50kD.

Da das zu untersuchende Cyclin D eine Größe von 36 kD besitzt, wurde hier ein 12,5 % Runninggel gewählt, das einen Bereich von 10-70 kD abdeckt.

Vor dem Einfüllen der Gewebeprobe in die Geltaschen wurden diese 1:1 mit Lämmli-puffer gemischt (10 μ l Probe + 10 μ l Puffer) und für 6 Minuten bei 96°C im Heizblock inkubiert, um eine Proteindenaturierung zu bewirken. Nach dem Abkühlen wurden diese in die Taschen aufgetragen, zudem lief bei jedem Gel ein Molekulargewichtsmarker zur Identifizierung der Banden parallel mit. Initial betrug die Spannung in der Blotting-Kammer 80 V, welche nach Eintritt der Proben in das Runninggel auf 100 V erhöht wurde. Die Dauer der Laufzeit betrug etwa 90 Minuten.

Mit dem Prinzip des Wet-Transfers wurde das Gel auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet. Hierbei wurden Filterpapiere und Schwämme in einem Transfer-Puffer getränkt und die Nitrocellulose-Membran zwischen diesen dem Gel angelegt. Für ca. 60 Minuten wurde der Transfer mit einer Spannung von 100 V unter permanenter Kühlung mit Eis durchgeführt. Danach wurde die Membran für 20 Minuten in PBS-Puffer + Tween20 gewaschen.

Anschließend erfolgte die Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen mittels 20%igem Milchpulver für eine Stunde.

Nach erneutem gründlichem Waschen wurde die Membran mit dem zu untersuchenden Antikörper für 90 Minuten inkubiert. Danach wurde wieder für 3 x 5 Minuten mit PBS-Puffer gewaschen und der Sekundärantikörper für 1 Stunde zugegeben. Die jeweiligen Verdünnungen der Antikörper richteten sich entweder nach den Empfehlungen des Herstellers oder wurden sekundär modifiziert.

Im Anschluss an die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgten erneut eine gründliche Waschung und die Detektion mittels ECL-Detection-Kitt durch die oben erwähnte Chemiluminescence-Reaktion.

2.7 Histologische Schnitte und Färbungen

Zur Übersichtsfärbung und zum anschließenden Auszählen der in der Mitose befindlichen Hepatozyten, wurde eine Hämatoxylin-Eosin- (HE-) Färbung gewählt. Hierbei entsteht durch Oxidation des Hämatoxylins der Farbstoff Hämatein, der mit Aluminiumionen einen positiv geladenen Komplex bildet. Dieser reagiert mit den negativ geladenen Phosphatgruppen der Nukleinsäuren des Zellkerns, welcher dadurch im Präparat blau erscheint. Um das Zytoplasma anzufärben wird das schwach saure Eosin verwendet, das dieses rosa erscheinen lässt.

Zur Quantifizierung der mitotischen Zellen (Mitose-Index) erfolgte die Auszählung von insgesamt 2000 Hepatozyten und wurde als absolute Anzahl aller mitotischen Hepatozyten pro 2000 Zellen angegeben.

Materialien/ Geräte

Kryostat Microtom HM 500 OM	Microm-Laborgeräte, Walldorf, D
Objektträger Super Frost	R.Langensbrinck, 4624882, Emmendingen
Deckgläschen	
Microtom	Leica Microsystem, Nussloch, D
Schüttler	Heidolph, 2020, Kelheim, D

Reagenzien

Aceton	J.T.Baker, 8002, Deventer, NL
Hematoxylin	Sigma, HHS-32, Deisenhofen, D
Eosin, wässrig (0,3 %)	Sigma, HT-110-2-80, Deisenhofen, D
Ethanol (80 %)	durch Verdünnung von Ethanol (100 %)
Ethanol (96 %)	Merck, 1.00971.1000, Darmstadt, D
Ethanol (100 %)	Merck, 1.00986.1000, Darmstadt, D
Essigsäure (99,8 %)	Riedel de Haen, 33209, Seelze, D
Vitro-Clud	R.Langensbrinck, Emmendingen, D

Die schockgefrorenen Restlebern wurde nach Entnahme aus dem -80° -Freezer zu Transportzwecken in flüssigem Stickstoff zwischengelagert. Im Kryostat wurden dann Gefrierschnitte mit einer Dicke von 5 μ m gefertigt. Bei Raumtemperatur trockneten die Schnitte über 24 Stunden und wurden danach für 10 Minuten in Aceton fixiert.

Anschließend erfolgte die Spülung der Schnitte mit Aqua dest. und die Inkubation in Hämatoxylin für 8-10 Minuten auf dem Schüttler, um eine gleichmäßige Färbung zu erreichen. Unter lauwarmem fließendem Leitungswasser wurden die Proben gebläut.

Es folgte eine 2-minütige Inkubation der Proben in Eosin, das zuvor gefiltert und mit 100 μ l Essigsäure versetzt wurde. Nach Spülung mit Aqua dest. wurden die Objektträger in Ethanol in aufsteigender Konzentration getaucht (Ethanol 80 % für 1 Minuten, Ethanol 96 % für 2 Minuten und Ethanol 100 % für weitere 2 Minuten), um das Gewebe zu entwässern. Anschließend erfolgte die Bedeckung der Schnitte mit Vitro-Clud und Fixation durch Deckgläschen.

2.8 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie dient dem Nachweis antigener Zielstrukturen mittels Antigen-Antikörper-Reaktionen und anschließender Sichtbarmachung durch Farbstoffreaktionen. Nach Anlagerung des primären und des biotinierten sekundären Antikörpers erfolgt eine Farbreaktion, die auf der Bindung von Biotin an Streptavidin, einem Protein aus dem Strahlenpilz *Streptomyces avidinii*, beruht. Ein löslicher Streptavidin-Peroxidase-Konjugat oxidiert letztendlich ein Chromogen, das in der oxidierten Form durch einen Farbumschlag sichtbar wird. Vereinfacht gesagt, fungiert der biotinierte Sekundärantikörper als Bindeglied für die Reaktion des Chromogens, da sich zwischen Biotin und dem Streptavidin-Peroxidase-Komplex (Markermolekül) eine nahezu irreversible Bindung ausbildet. Ungebundene Markermoleküle werden ausgewaschen, so dass nur gebundene eine positive (Farb-)Reaktion hervorrufen.

Reagenzien

Aceton	J.T.Baker, 8002, Deventer, NL
DAKO Pen	DAKO, S2002, Glostrup, Denmark
Biotin Blocking System	DAKO, X0590, Carpintiera, CA, USA
Peroxidase Blocking Reagent	DAKO, S2001, Carpintiera, CA, USA
Protein Block Serum-Free	DAKO, X909, Carpintiera, CA, USA
Liquid Dab + Substrate-Chromogen Solution	DAKO, K3467, Carpintiera, CA, USA
Peroxidase-Conjugated Streptavidin	DAKO, P0397, Carpintiera, CA, USA
Monoclonal Mouse Anti-Rat Ki-67 Antigen	DAKO, M7248, Carpintiera, CA, USA
Biotinylated Rabbit Anti-Mouse-Immunglobulin	DAKO, E0464, Carpintiera, CA, USA

Für die Immunhistochemie wurden dieselben 5 µm dicken Gefrierschnitte verwendet, wie für die HE-Färbungen. Diese wurden nach 10-minütiger Fixation in Aceton luftgetrocknet und mit einem Fettstift eingekreist, um die Menge der benötigten Reagenzien möglichst gering zu halten. Nach zweimaligem Waschen mit PBS-Puffer für je 5 Minuten und anschließendem Abtupfen, wurden 1-2 Tropfen der Peroxydase

Blockreagenz auf die Gewebeschnitte gegeben und für 5-10 min. inkubiert. Es folgten die je 10-minütige Inkubation mit Biotin- und Protein- Blocking-Reagenz mit jeweils 1-2 Tropfen der Substanzen. Zwischen den Schritten wurde wieder für 2 x 5 Minuten gewaschen.

Diese verhindern eine fälschliche Reaktion durch endogene Peroxydasen, bzw. unspezifische Reaktionen durch Biotin oder Proteine. Nach erneutem Waschen wurde der Primärantikörper Anti-Ki-67 (1:40 mit PBS verdünnt) hinzugegeben und die Proben für 30 Minuten inkubiert. Die Negativkontrolle erhielt anstelle von Primärantikörper lediglich PBS-Puffer. Es folgten zwei Waschvorgänge von je 5 Minuten und die Zugabe des Sekundärantikörpers in der Verdünnung 1:50. Auch dieser wurde für 30 Minuten auf den Schnitten belassen, die anschließend erneut gewaschen wurden. Bei Raumtemperatur wurde dann das peroxidasekonjugierte Streptavidin in einer Verdünnung von 1:300 aufgetropft und für 30 Minuten belassen. Zuletzt wurde das Chromogengemisch frisch angemischt und zugegeben. Nach 5-minütiger Inkubationszeit erfolgte die Spülung mit Aqua dest. und die Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Die Schnitte wurden mit lauwarmem Leitungswasser gebläut und eingedeckt.

Die Quantifizierung der Ki-67 positiven Zellen erfolgte durch Auszählung der angefärbten Zellen pro 1000 gezählter Hepatozyten in der Ki-67 Färbung bei 200-facher Vergrößerung und wurde als Prozent der Ki-67 positiven Zellen angegeben. Das Protein Ki-67 kann in allen Zellen nachgewiesen werden, die sich aktiv im proliferativen Zellzyklus befinden [Gerlach 1997].

2.9 Hepatische Mikrozirkulation (Intravitalmikroskopie, Laserdopplerflowmetrie)

Mittels Intravitalmikroskopie (IVM) erfolgte die Messung der Mikroperfusion in der Rattenleber, wodurch das Ausmaß der postischämischen Mikrozirkulationsstörung analysiert wurde. Die Durchführung der IVM-Untersuchungen erfolgte im Institut für Experimentelle Chirurgie (Leiter: Prof. Dr. med. M. Menger) an der Universität Homburg/ Saar sowie der Abteilung für Experimentelle Chirurgie (Leiterin: Prof. Dr. med. B. Vollmar) an der Universität Rostock.

Materialien/ Geräte

Zeiss Axio-Tech Mikroskopie	Zeiss, Oberkochen, D
FK 6990 Videokamera	Prospective Measurements Inc., USA
Video System VO-5800 PS	Sony, München, D
Cliniflow II Model FM 701D	Carolina Medical Electronics, USA
Flussmessköpfe SF105 und SF 107,5	Carolina Medical Electronics, USA

Reagenzien

Natrium Fluoreszein	Merck, Darmstadt, D
---------------------	---------------------

Nach Lagerung des Versuchstiers in Linksseitenlage erfolgte die Durchführung der IVM in „epi-illumination“-Technik. Zum Erhalt des Hintergrundbildes wurden 2 µmol/kgKG Natrium-Fluoreszein intravenös injiziert. Die Aufnahmen wurden auf Video aufgezeichnet und nach erfolgter Digitalisierung mit dem Capimage-Programm ausgewertet. Durch Bestimmung der Anzahl der perfundierten Sinusoide in 10 repräsentativen Acini wurde die durchschnittliche prozentuale sinusoidale Perfusion quantifiziert.

Zudem erfolgte während der IVM die Messung der erythrozytären Flussrate (velocity) bzw. der erythrozytären Flussrate bezogen auf den Gefäßdurchmesser (volumetric blood flow). Dies geschah in 5 postsinusoidalen Venolen und in 8-10 individuellen Sinusoiden der midzonalen Region [Richter 2001].

Für die Messung der Blutflussgeschwindigkeit in der V. portae mittels Laserdopplerflowmetrie wurden die Flussmessköpfe SF105 (5 mm) und SF 107,5 (7,5 mm) intraoperativ direkt um die Portalvene platziert und es erfolgte die Messung nach dem elektromagnetischen Prinzip mit dem Cliniflow® II Model FM 701D. Die Ermittlung der Flussgeschwindigkeit fand sowohl vor Induktion der Ischämie statt, als auch 1, 3, 5 und 10 Minuten nach Reperfusion.

2.10 Statistik

Zur Datenauswertung wurde aus allen Datensätzen Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwertes (SEM) mit Hilfe des Datenverarbeitungsprogrammes Microsoft Excel berechnet. Mit demselben Programm erfolgte die graphische Darstellung der Ergebnisse in Form von Säulen-/ Liniendiagrammen und Tabellen.

Alle statistischen Tests wurden mit dem statistischen Auswertungsprogramm SPSS, Version 10.0 gerechnet. Nach vorheriger Prüfung der Datensätze auf Normalverteilung wurden der student's t-test oder die einfache Varianzanalyse mit Messwiederholung für normalverteilte Datensätze angewandt, um zwischen zwei oder mehreren Gruppen zu vergleichen. Ein Ergebnis galt als statistisch signifikant, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ war.

3. Ergebnisse

A 70%-Leberresektion

3.1 Gewichtsverlauf

Alle Tiere überlebten die 70%ige Leberteilresektion unter 30-minütiger warmer Leberischämie. Um sicherzustellen, dass die Leberteilresektion bei allen Tieren in gleichem Umfang durchgeführt wurde und um somit die Voraussetzung für die Vergleichsmöglichkeit der Behandlungsgruppen untereinander erfüllen zu können, wurde direkt nach Entnahme das Gewicht der Resektate ermittelt.

Parameter	Kontrolle	IP
Körpergewicht in g	253,58 ± 14,4	254,94 ± 16,9
Resektat in g	6,73 ± 0,86	6,1 ± 0,79
Resektat/ Körpergewicht in vol%	2,65	2,4

Tab. 3.1 Körpergewicht, Gewicht der resezierten Leber (70%) und Verhältnis von Resektat zu Körpergewicht. Angegeben sind Mittelwert ± SEM.

3.1.1 Körpergewicht

Zur Beurteilung des allgemeinen klinischen Verlaufes wurde das Körpergewicht der Versuchstiere ermittelt. Unmittelbar nach erfolgtem Eingriff kam es bei allen Tieren zu einem Gewichtsverlust von 7,7 g im Mittel ohne signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen. Zum einen war dies bedingt durch die eigentliche Resektion von durchschnittlich 6,4 g Leberparenchym, zum anderen durch den intraoperativen Flüssigkeitsverlust.

Im Verlauf zeigte sich bei allen Tieren eine konstante Gewichtszunahme, wobei die IP-Gruppe keinen Unterschied im Gewichtsverlauf verglichen mit der Kontrollgruppe aufwies (Abbildung 3.1.1).

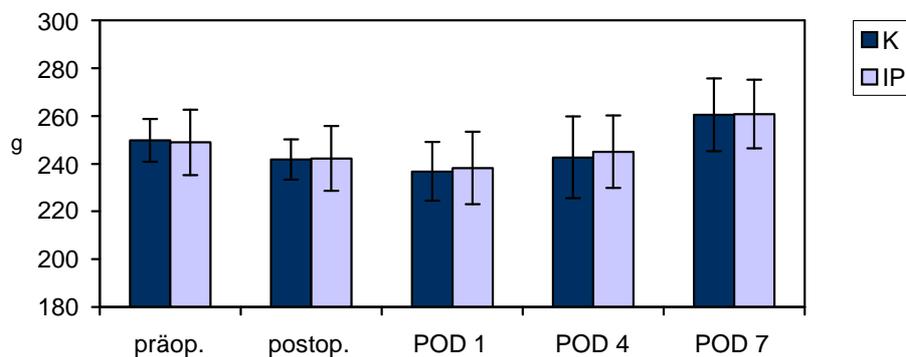


Abb. 3.1.1: Körpergewicht in Gramm. Angegeben sind Mittelwert \pm SEM.

3.1.2 Gewicht der regenerierenden Leber

Als weiterer Verlaufsparemeter für die Regeneration des Leberparenchyms wurde die Restleber an den postoperativen Tagen 1, 4, und 7 nach Entnahme gewogen. Bereits am 1. postoperativen Tag konnte ein Unterschied zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden: es zeigte sich ein signifikant niedrigeres Restlebergewicht bei den IP-Tieren (K-Gruppe: $5,2 \pm 0,4$ g, IP-Gruppe: $4,16 \pm 0,4$ g) (Abb. 3.1.2).

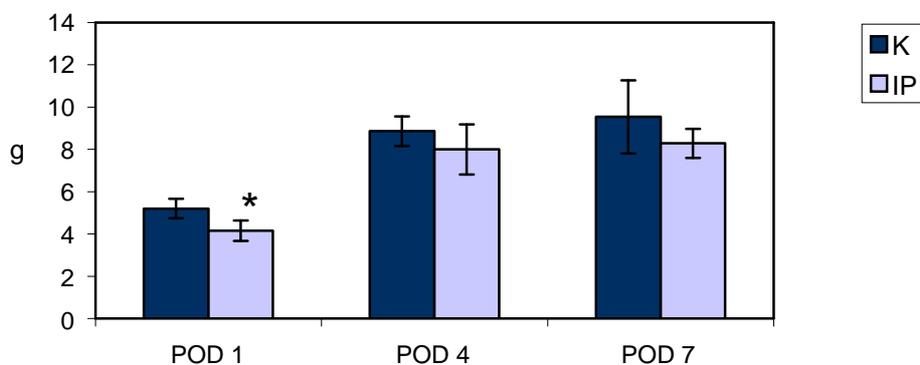


Abb. 3.1.2: Gewicht der regenerierenden Restleber in Gramm. Angegeben sind Mittelwert \pm SEM. * $p < 0,05$ für IP vs. K

Auch wenn man den unterschiedlichen Körpergewichtsverlauf berücksichtigt und die Masse des Restleberparenchyms in Volumenprozent bezogen auf das Körpergewicht darstellt, ist eine für die IP-Gruppe signifikant niedrigere Restlebermasse am ersten postoperativen Tag im Vergleich zu K-Gruppe zu verzeichnen (K-Gruppe: $2,2 \pm 0,3$ vol%, IP-Gruppe: $1,7 \pm 0,2$ vol%) (Abb. 3.1.3.).

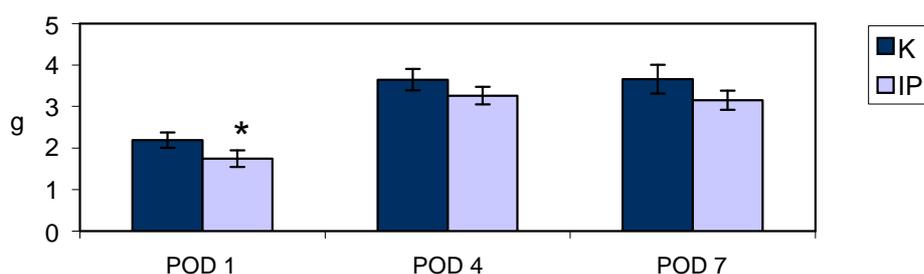


Abb. 3.1.3: Restleberparenchym in vol% bezogen auf das Körpergewicht. Angegeben sind Mittelwert \pm SEM. * $p < 0,05$ für IP vs. K

3.2 Laborchemische Analysen (Transaminasen, Bilirubin, Albumin)

3.2.1 Parameter der hepatozellulären Schädigung

Betrachtet man den Verlauf der Transaminasen, so lässt sich nach 6 h sowohl für die AST als auch die ALT eine signifikante Reduktion nach IP-Behandlung feststellen. Am ersten postoperativen Tag jedoch waren erstaunlicherweise die Enzymlevel sowohl von AST als auch von ALT bei IP-behandelten Tieren gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöht. Erst am 4.POD trat eine weitgehende Normalisierung dieser Werte in beiden Gruppen ein und es zeigte sich kein signifikanter Unterschied mehr.

AST	6 h	POD 1	POD 4	POD 7
K	467 ± 46 *	340 ± 106	32 ± 2	27 ± 8
IP	128 ± 68	435 ± 167 *	37 ± 6	31 ± 3

ALT	6 h	POD 1	POD 4	POD 7
K	552 ± 177 *	143 ± 43	25 ± 3	24 ± 4
IP	142 ± 74	325 ± 105 *	23 ± 3	22 ± 4

Tab. 3.2.1: Transaminasen in U/l. Angegeben sind Mittelwert ± SEM. * p < 0,05 für IP vs. K

3.2.2 Parameter der Lebersynthese- und Entgiftungsfunktion

Bei der Messung von Bilirubin und Albumin wurde kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen festgestellt. Auch hier konnte ein Maximum am ersten Tag nach erfolgter Resektion aufgezeigt werden mit anschließendem Absinken ab Tag 4.

Bilirubin	POD 1	POD 4	POD 7
K	0,36 ± 0,02	0,05 ± 0,01	0,1 ± 0,03
IP	0,37 ± 0,1	0,12 ± 0,03	0,05 ± 0,03

Tab. 3.2.2: Bilirubin in mg/dl. Angegeben sind Mittelwert ± SEM.

Albumin	POD 1	POD 4	POD 7
K	3 ± 0,1	2,98 ± 0,1	3,05 ± 0,2
IP	3 ± 0,29	2,95 ± 0,2	3,02 ± 0,2

Tab. 3.2.3: Albumin in mg/dl. Angegeben sind Mittelwert ± SEM.

3.2 Regenerationsparameter (Ki-67-Färbung, Mitose-Index, Cyclin-D1-Expression)

Zur Quantifizierung des Regenerationsausmaßes auf histologischer Ebene erfolgte sowohl die Auszählung der Ki-67 positiven Hepatozyten, als auch die Beurteilung der mitotischen Aktivität mittels Mitose-Index (siehe 3.4). Zusätzlich wurde die Expression der Proteinkinase-Untereinheit Cyclin-D1 mittels Western blot betrachtet.

3.3.1 Ki-67-Färbung

Wie in Abb. 3.3.1 zu erkennen ist, war die Anzahl Ki-67 positiver Hepatozyten in der Kontrollgruppe an Tag 1 deutlich erhöht gegenüber Tag 4 und Tag 7. In der IP-Gruppe hingegen beobachteten wir - korrelierend zur geringeren Restlebermasse - eine signifikant geringere Anzahl Ki-67 positiver Hepatozyten am ersten postoperativen Tag verglichen mit der Kontrollgruppe (K-Gruppe: $14,5 \pm 6,1\%$, IP-Gruppe: $0,8 \pm 0,5 \%$), während an Tag 4 und Tag 7 eine vergleichbare Anzahl dieser Zellen in der IP-Gruppe gezählt wurde.

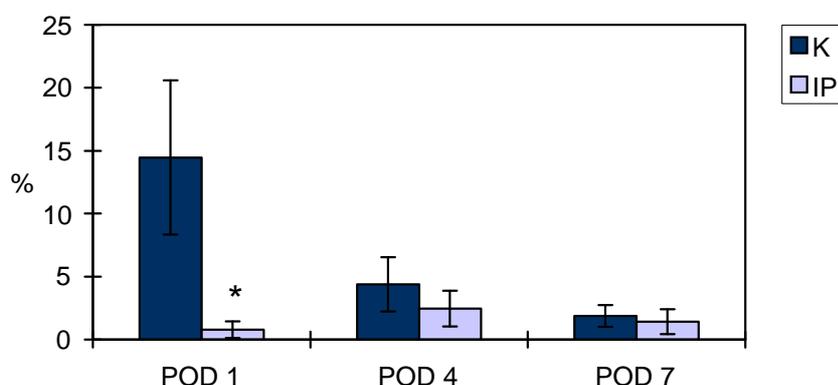


Abb. 3.3.1: Ki-67 positive Hepatozyten in %. * $p < 0,05$ für IP vs. K

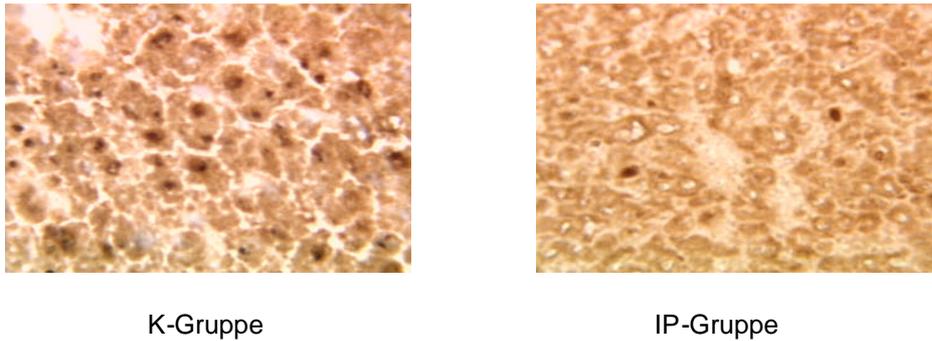


Abb. 3.3.2: Immunhistochemie: Hepatozyten, die das Protein Ki-67 enthalten und sich somit im proliferativen Zellzyklus befinden, sind braun angefärbt (600-fache Vergrößerung). Für diese Abbildung wurde pro Gruppe ein repräsentatives Tier am ersten postoperativen Tag gewählt.

3.3.2 Mitose-Index

Einen vergleichbaren Verlauf nahm die mitotische Aktivität nach erfolgter Resektion. In der Gruppe der unbehandelten Tiere war am ersten Tag ein Maximum an mitotisch aktiven Zellen nachweisbar. In der Gruppe der ischämisch präkonditionierten Tiere war wiederum an Tag 1 ein signifikant geringerer Mitose-Index zu erkennen. Bereits ab dem vierten Tag nach Resektion hatte sich die mitotische Aktivität in beiden Gruppen wieder normalisiert.

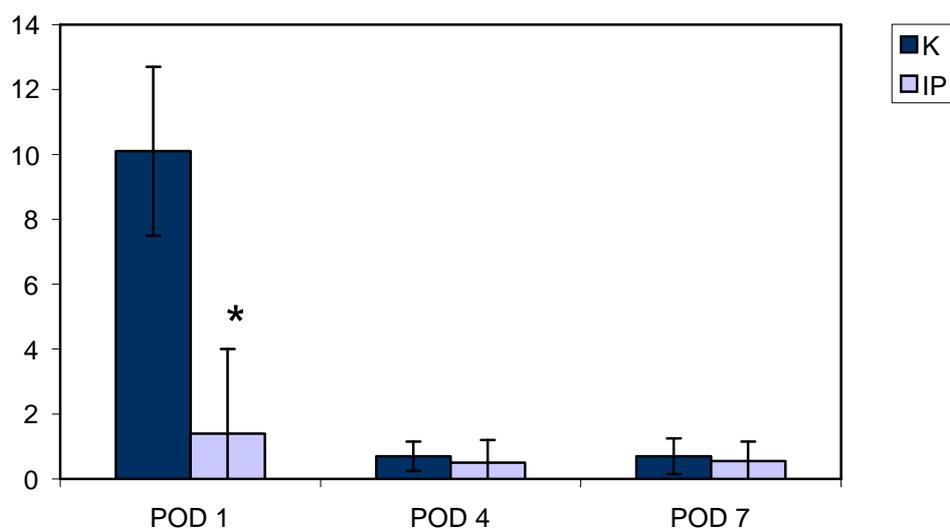


Abb. 3.3.3: Mitose-Index (absolute Anzahl aller mitotischen Hepatozyten pro 2000 Zellen)

* $p < 0,05$ für IP vs. K

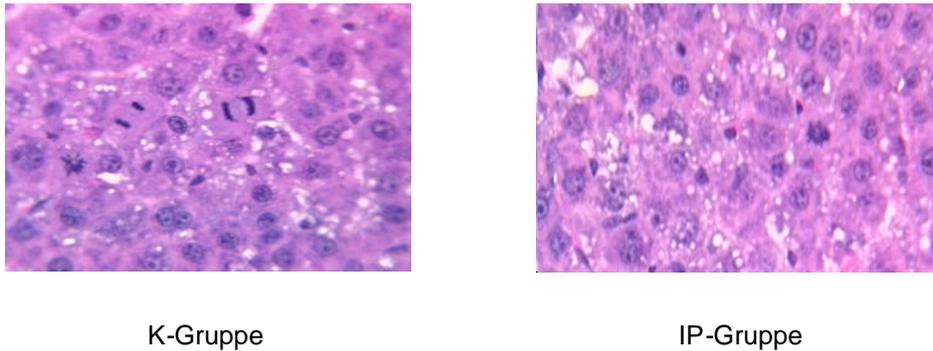


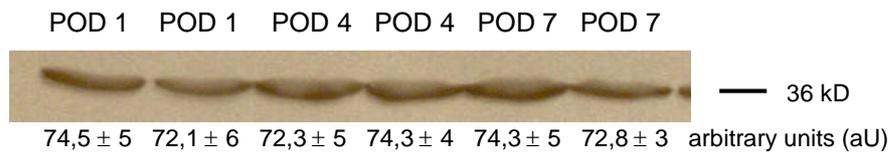
Abb. 3.3.4: HE-Färbung (600-fache Vergrößerung): Pro Gruppe wurde für diese Abbildung ein repräsentatives Tier am ersten postoperativen Tag ausgewählt.

3.3.3 Cyclin D1-Expression

Die Western blot Analyse und anschließende Quantifizierung der Proteinexpression mittels Densitometrie konnte zu keinem Zeitpunkt ein Unterschied zwischen den beiden Gruppen zeigen.

a)

K-Gruppe



b)

IP-Gruppe

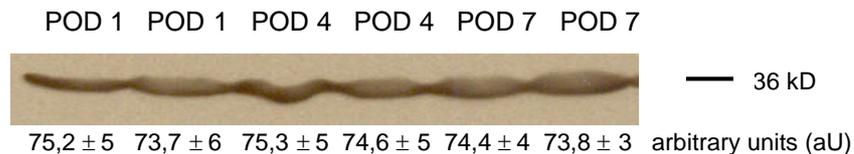


Abb.3.3.3 a und b: Western blot Analyse der Cyclin D1-Expression (36 kD). Aufgetragen wurden nacheinander je zwei Tiere am entsprechenden postoperativen Tag. Die Densitometrie-Messung ist in arbitrary units (aU) angegeben.

B 90%-Leberresektion

4.1 Überleben

Auch in der zweiten Versuchsreihe war das Ausmaß der Leberresektion in beiden Gruppen vergleichbar und erstreckte sich, einer 90%igen Resektion entsprechend, auf einen Bereich von durchschnittlich $7,57 \pm 0,5$ g in der Kontrollgruppe und $8,01 \pm 0,4$ g in der IP-Gruppe, was etwa 3 vol% des Körpergewichtes entspricht.

Parameter	K	IP
Körpergewicht in g	248 ± 11	$252,4 \pm 11$
Resektat in g	$7,57 \pm 0,5$	$8,01 \pm 0,4$
Resektat/ Körpergewicht in vol%	$3,05 \pm 0,3$	$3,17 \pm 0,3$

Tab. 4.1: Körpergewicht, Gewicht der resezierten Leber (90%) und Verhältnis von Resektat zu Körpergewicht. Angegeben sind Mittelwert \pm SEM.

Erwartungsgemäß überlebte die Mehrheit der Tiere den Beobachtungszeitraum von 21 Tagen nicht. Lediglich 10% der Kontrolltiere überlebten langfristig die 90%ige Leberresektion während 30-minütiger Leberischämie, wohingegen bereits am 3. postoperativen Tag alle ischämisch präkonditionierten Tiere verstorben waren. Hieraus errechnet sich eine mittlere Überlebensdauer von $3,7 \pm 1,8$ Tagen für die Tiere der Kontrollgruppe und ein Mittel von $1,8 \pm 0,3$ Tagen für die IP-Gruppe. Dieser Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant.

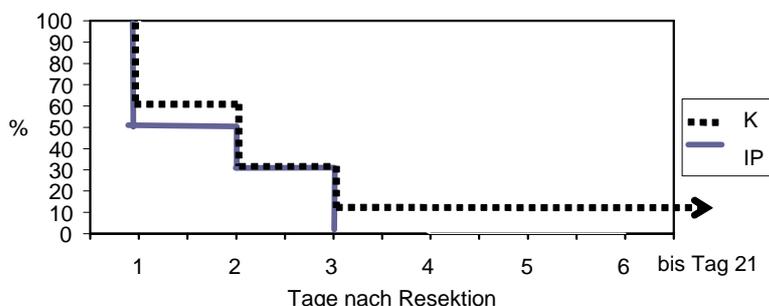


Abb. 4.1: Überleben der Tiere nach 90%-iger Leberresektion in Prozent aller operierten Tiere

4.2 Laserdopplerflowmetrie

Betrachtet man den Verlauf der über der Pfortader gemessenen Flussraten, so ergibt sich bei beiden Gruppen ein mehrfach erniedrigter Wert unmittelbar nach wieder freigegebenem Fluss verglichen mit der basalen Flussrate vor Ischämie. Auch nach zehn Minuten konnte in keiner der Gruppen wieder der Ausgangswert erreicht werden. Vergleicht man jedoch die Flussraten der beiden untersuchten Gruppen miteinander, so zeigen sich in der frühen Reperfusionphase signifikant niedrigere Werte für die unbehandelten Kontrolltiere (1 und 3 Minuten nach Ischämie). Zudem kann in der IP-Gruppe ein tendenziell schnellerer Anstieg der portalvenösen Flussrate beobachtet werden, welche 10 Minuten nach Ischämie signifikant höhere Werte gegenüber der Kontrollgruppe aufweist (Abb. 4.2).

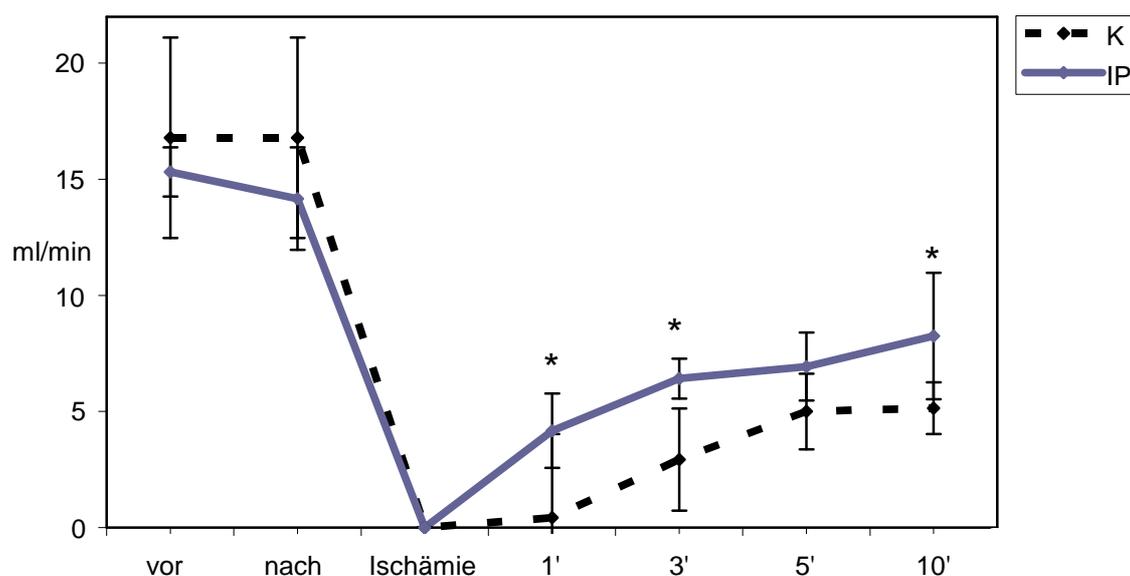


Abb. 4.2: Portalvenöse Leberperfusion nach 90%-iger Leberresektion. Angegeben sind Mittelwert \pm SEM. * $p < 0,05$ für IP-Behandlung versus Kontrolle.

4.3 Intravitalmikroskopie/ Mikrozirkulation

4.3.1 Sinusoidale Perfusion

30 Minuten nach Freigabe der Perfusion zeigten die Tiere der IP-Gruppe einen geringeren postischämischen sinusoidalen Perfusionsausfall verglichen mit den Kontrolltieren. Bei den mit IP vorbehandelten Tieren waren nach 30-minütiger warmer Ischämie und 90%iger Leberresektion noch $95,1 \pm 1,6$ % der Sinusoide der Restleber perfundiert; bei den nicht ischämisch präkonditionierten Kontrolltieren waren es lediglich $91,3 \pm 2,4$ %. Ein statistisch signifikanter Unterschied konnte jedoch nicht aufgezeigt werden.

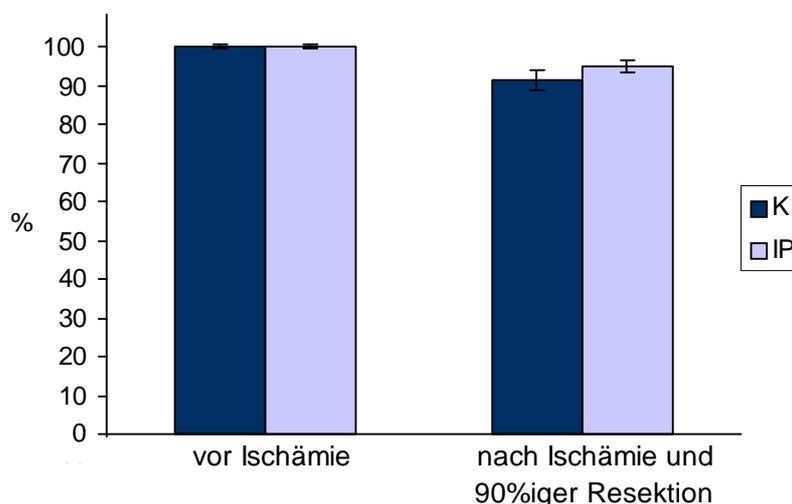


Abb. 4.3.1: Perfundierte Sinusoide (angegeben in %) vor und nach 30-minütiger Ischämie mit 90%iger Leberresektion

4.3.2 Volumetric blood flow und velocity

Die postischämische erythrozytäre Flußrate (velocity) war 30 Minuten nach freigegebener Reperfusion bei IP-behandelten Tieren sowohl in den Venolen als auch in den Sinusoiden signifikant erhöht gegenüber der Kontrollgruppe. Analog hierzu zeigte sich die erythrozytäre Flussrate bezogen auf den Gefäßdurchmesser (volumetric blood flow) in den Venolen der IP-behandelten Tiere signifikant erhöht. Zwar konnte ein

tendenziell erhöhter Wert des volumetric blood flow auch in den Sinusoiden der IP-Tiere festgestellt werden, dieser war statistisch jedoch nicht signifikant.

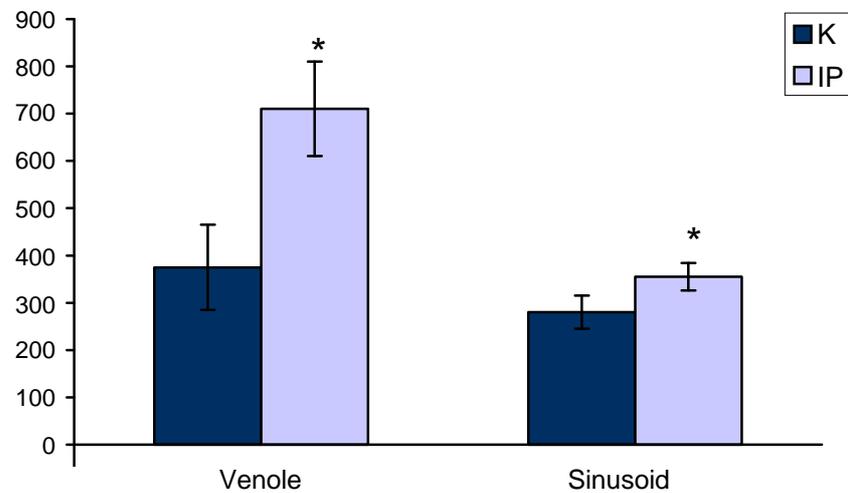


Abb. 4.3.2.A: Velocity in $\mu\text{m}/\text{Sek.}$ in Venolen und Sinusoiden nach 90%-iger Leberresektion mit 30 Min. warmer Ischämie. Angegeben sind Mittelwert \pm SEM. * $p < 0,05$ für IP vs. K

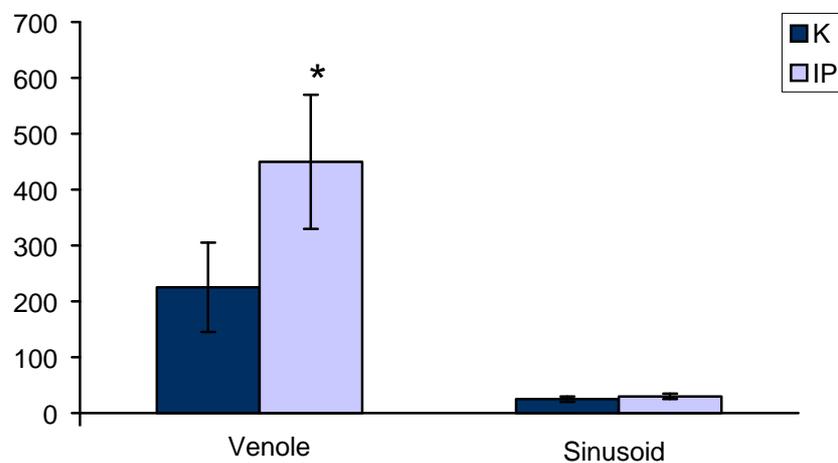


Abb. 4.3.2.B: Volumetric blood flow in pl/s in Venolen und Sinusoiden nach 90%-iger Leberresektion mit 30 Min. warmer Ischämie. Angegeben sind Mittelwert \pm SEM. * $p < 0,05$ für IP vs. K

4. Diskussion

Murrey et al. konnten 1986 erstmals die Wirksamkeit der Methode der Ischämischen Präkonditionierung am Herzen des Hundes aufzeigen. Es folgten zahlreiche Studien an unterschiedlichsten Spezies und Organen, die alle eine Minderung des postischämischen Organschadens beweisen konnten [Schott 1990, Lloris-Carsi 1993, Kume 1996, Ishida 1997, Korthuis 1998, Hawaleshka 1998].

Trotz allem bleiben aber noch einige Fragen offen: so sind weder alle physiologischen Vorgänge, über die diese Methode ihre Wirksamkeit erzielt, bekannt, noch konnte bislang bewiesen werden, ob eine Minderung der I/R-Schädigung auch gleichzeitig eine verbesserte Regeneration des behandelten Organs zur Folge hat. Letztere Fragestellung ist jedoch hinsichtlich der klinischen Anwendbarkeit im Rahmen der Leberchirurgie von zentraler Bedeutung. Entsprechend der Annahme, dass aus einer geringeren Ischämie/ Reperfusionsschädigung eine größere Anzahl intakter Hepatozyten resultiert, die das Potential besitzen, den Proliferationszyklus zu durchlaufen, müsste hierdurch auch gleichzeitig eine effizientere und schnellere Regeneration erfolgen.

Im Jahr 1996 führten Hardy et al. im Rahmen einer experimentellen Studie 80-85%ige Leberteileresektionen an Ratten durch und konnten zeigen, dass die Überlebensrate der Tiere durch ischämische Präkonditionierung von 10% auf 90% gesteigert werden konnte [Hardy 1996]. Im Rahmen dieser Arbeit zeigte die Arbeitsgruppe um Hardy, dass der Zeitrahmen der ischämischen Präkonditionierung eine grundlegende Rolle spielt. Während unter dreiminütiger Ischämie mit nachfolgender fünfminütiger Reperfusion keinerlei Schutz vor I/R-Schädigung erzielt werden konnte, bewirkte ein Intervall von 5/10 Minuten hingegen eine signifikante Protektion der Leber. Aus diesem Grund wählten wir für diese Studie ein Zeitprotokoll, das bereits in vorangegangenen Studien unserer Arbeitsgruppe einen optimalen Schutz vor Ischämie/ Reperfusionsschädigung aufzeigen konnte [Glanemann 2003].

Eine mögliche Problematik der besagten Studie von Hardy et. al mag der Beobachtungszeitraum darstellen, der mit 24 Stunden vermutlich zu gering gehalten war, um sichere Aussagen über eine Überlebensrate treffen zu können. Aus diesem Grunde erweiterten wir in unserer Studie die postoperative Nachbetrachtungszeit auf 21 Tage.

Die Leberregeneration betreffend beschrieben Teoh et al. an Mäusen einen vermehrten Eintritt von Hepatozyten in den Zellzyklus nach IP-Behandlung. Sie konnten eine vermehrte Expression des nukleären Transkriptionsfaktors NF κ B und des Proliferationsmarkers Cyclin D1 aufzeigen, jedoch wurde diese Studie nicht im Resektionsmodell durchgeführt, sondern beschränkte sich auf intakte Lebern [Teoh 2002]. Dies mag den Unterschied zu unseren Ergebnissen erklären, die nach erfolgter Resektion keinen signifikanten Anstieg von Cyclin D1 bei IP-behandelten Tieren beschrieben.

In unserer Studie führten wir zunächst eine 70%ige Leberteileresektion unter 30-minütiger warmer Ischämie an Ratten durch und behandelten die Hälfte der Tiere mit der Methode der Ischämischen Präkonditionierung. Wie bereits von verschiedenen Autoren beschrieben [Clavien 2000, Ishii 2001, Teoh 2002], zeigten sich bei den IP-behandelten Tieren signifikant niedrigere Serumkonzentrationen der Transaminasen 6 Stunden nach Reperfusion. Bemerkenswert allerdings war, dass sich das Verhältnis an Tag 1 nach erfolgter Resektion umzukehren schien. Es fanden sich signifikant höhere Serumkonzentrationen von AST und ALT bei den ischämisch präkonditionierten Tieren, was vermuten läßt, dass die I/R-Schädigung nach IP-Behandlung im Resektionsmodell möglicherweise mit Verzögerung auftritt und die frühzeitig verminderten Transaminasenlevel einem Auswaschphänomen zugrunde liegen. Denn IP bewirkt nachgewiesenermaßen eine Erhöhung der postischämischen Leberperfusion [Glanemann 2003].

Bei der Betrachtung der Regenerationsparameter zeigte sich durch die Vorbehandlung mit IP sogar eine deutlich eingeschränkte Regenerationsfähigkeit. An Tag 1 nach 70%iger Leberteileresektion war das Gewicht der regenerierenden Parenchymmasse signifikant geringer als bei den unbehandelten, ischämischen Kontrolltieren, was auch mit der verminderten Expression der untersuchten Regenerationsmarker korrelierte. Diese Ergebnisse decken sich mit denen von Ishii et al., die zeigten, dass IP zwar die I/R-Schädigung reduziert, jedoch gleichzeitig eine verminderte Expression transkriptioneller Regulatorproteine, sogenannter "immediate early genes", auftritt [Ishii 2001]. Um eine adäquate zelluläre Proliferation zu bewirken, müsste aber die Expression dieser Regulatorproteine gesteigert werden, um einen Eintritt der ruhenden Hepatozyten in die G₁-Phase zu gewährleisten. [Fausto 1995, Fausto 2000, Court 2002, Kountouras 2001]. Diese verminderte Expression der "immediate early genes" vermag u.a. die von uns beobachtete geringere hepatozelluläre Proliferation erklären.

Um die Überlebensrate bestimmen zu können und um auszuschließen, dass wir uns mit 70%igen Resektionen noch nicht in dem Bereich befanden, in dem die Schutzmechanismen der IP ein Maximum ihrer Wirkung erzielen, dehnten wir in einer zweiten Versuchsreihe die Leberteileresektion auf 90% aus, was die Überlebenschancen der Tiere grenzwertig minimierte. Hierunter waren bereits am dritten Tag alle ischämisch präkonditionierten Tiere verstorben, wohingegen 10% der Kontrolltiere den gesamten Beobachtungszeitraum von 21 Tagen überlebten. Die in Abb. 4.1 dargestellte Überlebenskurve verdeutlicht, weshalb ein von Hardy et al. gewählter Beobachtungszeitraum vom 24 Stunden zu gering gewesen wäre, um eine sichere Aussage zur Überlebensrate zu treffen, zumal erst am ersten postoperativen Tag eine Transaminasenerhöhung in der Gruppe der präkonditionierten Tiere in Erscheinung trat. Zwar hatten Hardy et al. nur 80-85%ige Leberteileresektionen durchgeführt, dennoch erscheint es notwendig, den Beobachtungszeitraum auf mehrere Tage auszuweiten.

Einer der Wirkmechanismen der IP zum Schutz vor warmer Ischämie/Reperfusionsschädigung wird von verschiedenen Autoren unter anderem im Erhalt der sinusoidalen Perfusion gesehen. So konnten Studien der Arbeitsgruppen um Zapletal, Nilson und Vajdova unabhängig voneinander sowohl eine Verringerung des Ischämie-/Reperfusionsschadens feststellen, als auch eine signifikante Verbesserung der

hepatischen Mikroperfusion bestätigen [Zapletal 1999, Nilsson 2000, Vajdova 2004]. Durch das Entgegenwirken einer postischämischen Mikrozirkulationsstörung wird der Redox-Status der Zellen geschützt und somit die postischämische Gewebsoxygenierung verbessert [Glanemann 2003].

Arai et al. richteten in einer Studie ihr Augenmerk insbesondere auf die sinusoidalen Endothelzellen. Sie konnten durch IP-Behandlung eine signifikant reduzierte Schädigung derselben feststellen [Arai 2001]. Ähnliche Ergebnisse erzielte die Arbeitsgruppe um Yadav, die mittels TUNEL Färbung eine verminderte Apoptose in sinusoidalen Endothelzellen der präkonditionierten Tiere fanden [Yadav 1999]. Neben einer verbesserten sinusoidalen Perfusionsrate konnten Vajdova et al. darlegen, dass eine IP-Vorbehandlung die strukturelle Integrität der Sinusoidalwand bewahrt und zu einer verminderten Leukozyten-Endothelzell-Interaktion führt [Vajdova 2004].

Eventuell ist den Erhalt der Endothelzellintegrität eine Ursache für die Reduktion der postischämischen Leukozyten-Endothelzell-Interaktion und führt auf diesem Wege zu einer Verbesserung der sinusoidalen Perfusion, indem die Entstehung von Mikrothromben vermindert wird.

Interessanterweise konnten Arai et al. diesbezüglich feststellen, dass es selbst nach unilobärer ischämischer Präkonditionierung zu einem Schutz sinusoidaler Endothelzellen in der kontralateralen Leberhälfte, die nicht präkonditioniert wurde, kommt. Dieses Phänomen wurde von ihnen als „heterologe Präkonditionierung“ bezeichnet [Arai 2001].

An dieser Stelle drängt sich die Frage, auf welchem Weg bzw. mittels welcher Signale/Mediatoren der Schutz der IP zum tragen kommt. Zu diskutieren sind aufgrund des Phänomens der „heterologen Präkonditionierung“ wohl vordringlich humorale bzw. systemische Mechanismen, obgleich ein gesteigerter Blutfluss über das kontralaterale Organ nicht ausgeschlossen werden kann.

Eine zentrale Rolle in der gegenwärtigen Diskussion über die Wirkungsweise der IP nimmt das Vasorelaxans Stickoxid (NO) ein, das auch unter dem Namen endothelial derived relating factor (EDRF) bekannt ist [Furchtgott 1980]. Die Bildung von NO erfolgt

in vaskulären Endothelzellen zum einen durch die konstitutive NO-Synthase-1, als auch durch die induzierbare NO-Synthase-2 [Nussler 1993, Nussler 1995]. Peralta et al. diskutierten in diesem Zusammenhang die inhibitorische Wirkung von NO auf den Vasokonstriktor Endothelin [Peralta 1996]. Sie konnten zeigen, dass sowohl die direkte Wirkung von NO, als auch die Inhibierung von Endothelin zu einer verstärkten Vasodilatation nach IP-Behandlung führen.

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten in diesem Zusammenhang Adenosin als Hauptmediator der Stimulation der NO-Produktion im Rahmen der IP identifizieren [Downey 1994, Peralta 1997, Peralta 1998, Ishida 1997]. Hierbei interagiert Adenosin u.a. mit dem Adenosin-A1-Rezeptor, was zu einer G-Protein-gekoppelten Aktivierung von Phospholipase C und Diacylglycerol führt. Diese wiederum bewirken eine Zunahme der Phosphokinase C, wodurch es zur konsekutiven Zunahme von NO und gleichzeitigen Down-Regulation von P-Selectin kommt [Peralta 1997, Ishida 1997, Liu 1998, Nakayama 1999, Peralta 2001]. Die verminderte Expression von P-Selectin, einem transmembranösen Glycoprotein, das als Adhäsionsmolekül zur verstärkten Leukozyten-Endothelzell-Interaktion führt, bewirkt somit gleichzeitig eine verminderte Transmigration von Leukozyten in das hepatozelluläre Interstitium. Singh et al. konnten zeigen, dass sowohl in P-Selectin-knock-out-Mäusen ein geringerer Ischämie/Reperfusionsschaden auftritt, als auch die Gabe von Antikörpern gegen P-Selectin einen Schutz bietet [Singh 1998].

Unterschiedliche Autoren konnten zeigen, dass die Entstehung des Ischämie/Reperfusionsschadens im Wesentlichen durch diese leukozytäre Gewebeeinfiltration mitbestimmt wird [Martinez-Mier 2000, Lentsch 2000]. Jaeschke et al. wiesen beispielsweise mittels histologischer Analysen eine massive lymphozytäre Infiltration in das postischämische Leberparenchym nach, die mit der Entwicklung von Leberzellschäden sowie einer Zunahme der histologisch erkennbaren Nekrosen korrelierte [Jaeschke 1997]. Diese Hypothese wird unterstützt durch Studien, die zeigen konnten, dass sowohl die Antikörpergabe gegen P-Selectin [Howell 2000], als auch eine funktionelle Inaktivierung von neutrophilen Granulozyten zu einer verminderten Ischämie/ Reperfusionsschädigung führt [Jaeschke 1993].

Einen weiteren Ansatzpunkt für die Wirkungsweise der IP bietet die Theorie der AMPK (Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase) vermittelten Protektion des Energiehaushaltes. Hiernach wird durch die vorgeschalteten kurzen Ischämiephasen und die dadurch bedingte Akkumulation von Adenosinmonophosphat (AMP) eine Proteinkinase aktiviert (AMPK), die mittels Phosphorylierung den ATP-Spiegel der Zelle konstant hält und den Lactatanstieg vermindert [Peralta 2001]. Die Frage ist allerdings, ob der Energiehaushalt der Zelle im Rahmen der IP-vermittelten Protektion eine primäre Rolle einnimmt, oder ob nicht eine gesteigerte Mikrozirkulation und somit verbesserte Zelloxygenierung als Ursache für geringere Lactatspiegel und bessere Energieversorgung zu suchen sind.

Von einigen Autoren wird die Reduktion postischämischer Apoptosevorgänge als ein Mechanismus der IP-bedingten Zellprotektion diskutiert [Ishii 2001, Rüdiger 2002]. So haben Yadav et al. 1999 einen Zusammenhang zwischen der Protektivität der Methode der IP und verminderter Caspase-Aktivität, die als zentraler Mediator der Apoptose gilt, festgestellt [Yadav 1999].

In Analogie zur Theorie des Energiehaushaltes wäre es jedoch durchaus denkbar, dass auch dies lediglich eine Folgeerscheinung einer verbesserten Zellperfusion bzw. -oxygenierung darstellt.

Zusammenfassend scheint es sich bei der IP-vermittelten Organprotektion um Adenosin und NO-gesteuerte Veränderungen handeln, die zu einer verbesserten postischämischen Durchblutung des Parenchyms führen. Die hierdurch bewirkte verbesserte Oxygenierung der Hepatozyten und deren intrazellulären Enzymsysteme hat einen signifikant geringeren Ischämie/ Reperfusionsschaden zur Folge.

Aus diesem Grund richteten wir unser Augenmerk auf eine mögliche postischämische Durchblutungssteigerung nach IP-Behandlung. Wie in Hinblick auf die zuvor erläuterte Studienlage zu erwarten war, kam es bei den präkonditionierten Tieren in der frühen Reperusionsphase zu einem signifikant erhöhten Pfortaderfluss verglichen mit den Kontrolltieren. Auch zeigte die IP-Gruppe einen verminderten postischämischen sinusoidalen Perfusionsausfall. Betrachtet man allerdings das Überleben der Tiere, scheint sich die Methode der ischämischen Präkonditionierung - zumindest im Resektionsmodell - negativ auszuwirken, da interessanterweise nach 90%iger

Leberteilresektion alle IP-behandelten Tiere innerhalb der ersten 3 postoperativen Tage verstarben.

Unserem Erachten nach wirkt sich ein nahezu vollständiger Erhalt der Mikroperfusion nach ausgedehnten Leberresektionen eher nachteilig auf das verbleibende Restleberparenchym aus. Geht man davon aus, dass nach Resektion das gesamte portalvenöse Blutvolumen auf eine um 70% bzw. 90% verminderte Parenchymmasse trifft, so kann man diesen Zustand durchaus als „relative Hyperperfusion“ bezeichnen. Möglicherweise führt der dadurch bedingte erhöhte Blutfluss zu einer zusätzlichen Schädigung des Parenchyms.

Hinsichtlich der portalvenösen Hyperperfusion ist aus dem Bereich der Lebertransplantation bekannt, dass eine portalvenöse Hyperperfusion wie sie beispielsweise bei „small-for-size“-Lebern vorkommt, zu einem Anschwellen der Hepatozyten führt (sogenanntes „hepatocyte ballooning“) [Man 2003], zudem wurde ein Verlust des Disse'schen Raumes beobachtet sowie die Ausbildung zentrolobulärer Nekrosen [Troisi 2003]. Demnach kommt es in der Restleber zusätzlich zu der relativen Hyperperfusion durch die IP-Behandlung zu einer nochmaligen Steigerung der Perfusionsverhältnisse.

So könnte der Effekt der ischämischen Präkonditionierung, der an chirurgisch unbehandelten (full-size)Lebern einen Schutz vor Ischämie/ Reperfusionsschädigung bietet, bei Größenreduzierten Lebern aufgrund der zusätzlichen Perfusionssteigerung aufgehoben sein. Dies würde den von uns beobachteten, um einem Tag verzögerten Transaminasenanstieg bei den ischämisch präkonditionierten Tieren erklären. Somit führt die IP-bedingte Perfusionssteigerung eines bereits hyperperfundierten Parenchyms sogar zu einer zusätzlichen Schädigung desselben, was die schlechten Überlebensraten in der Gruppe der 90% leberteilresezierten IP-Tiere begründet.

Diese Hypothese erklärt die Ergebnisse von Clavien et al., die bei Patienten, die eine Leberresektion von mehr als 50% des Parenchyms erhielten, keine IP-vermittelte Organprotektion mehr nachweisen konnten [Clavien 2003].

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Methode untersucht, die als günstiges sowie einfach durchführbares Verfahren eine wirksame Protektion vor der Ischämie/ Reperfusionsschädigung versprach – die Methode der ischämischen Präkonditionierung. Durch Abklemmen der zuführenden Blutgefäße mittels Pringle-Manöver über einen definierten Zeitraum hinweg wurde das Zielorgan – in diesem Falle die Leber – einer Ischämie ausgesetzt, die der eigentlichen, im Rahmen der Operation anfallenden Ischämie vorgeschaltet ist. Bereits von zahlreichen Autoren konnte diese Methode als wirksamer Schutz vor einer Ischämie/ Reperfusionsschädigung bestätigt werden, allerdings ausschließlich an unversehrten Organsystemen.

Um die klinische Anwendbarkeit in der Leberchirurgie zu überprüfen, führten wir dieses Verfahren vor 70%igen Leberteilresektionen durch und untersuchten die Auswirkung auf die Ischämie/ Reperfusionsschädigung sowie die Regeneration der Restleber.

Wie in Bezug auf die gegenwärtige Studienlage zu erwarten war, zeigte sich 6 Stunden nach Resektion bei den ischämisch präkonditionierten Tieren eine signifikante Reduktion von Aspartat- und Alanin-Aminotransferase. Dieses Verhältnis kehrte sich allerdings 24 Stunden postoperativ um, d.h. wir konnten eine signifikante Erhöhung der Transaminasen in der IP-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe feststellen. Auch die Regeneration war bei den ischämisch präkonditionierten Tieren nachhaltig eingeschränkt. Es konnte nach Entnahme am 1. postoperativen Tag ein signifikant geringeres Restlebergewicht festgestellt werden, analog hierzu waren deutlich weniger Hepatozyten in Proliferation befindlich.

Um zu überprüfen, warum die IP-Behandlung keinen positiven Effekt auf die Regeneration nach partieller Hepatektomie aufwies, dehnten wir das Ausmaß der Resektion auf 90% aus und unterwarfen die Tiere subletalen Bedingungen. Hierbei bestätigte sich die ungünstige Auswirkung der IP bei Leberteilresektion. Bereits nach 3 Tagen waren alle ischämisch präkonditionierten Tiere verstorben, wohingegen 10% der Kontrolltiere den gesamten Beobachtungszeitraum von 21 Tagen überlebten.

In der Annahme, dass ein möglicher Wirkmechanismus der IP-vermittelten Organprotektion eine Adenosin- und NO-gesteuerte Durchblutungssteigerung ist, nahmen wir frühpostoperative Messungen der portalen Perfusion vor und konnten sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der IP-Gruppe eine portale Hyperperfusion

feststellen. Da diese parenchymatöse Hyperperfusion durch ischämische Präkonditionierung sogar tendenziell noch verstärkt wurde, scheint dies unseres Erachtens nach der Grund für eine herabgesetzte Proliferationsfähigkeit des Restleberparenchyms der IP-Tiere zu sein.

Zusammenfassend gilt, dass die Methode der ischämischen Präkonditionierung zwar einen wirksamen Schutz vor Ischämie/ Reperfusionsschädigung an unversehrten Organen darstellt, andererseits aber in Hinblick auf größenreduziertes Parenchym die Gefahr der Schädigung durch überproportionale Durchblutung der Restlebermasse verstärkt. Wie unsere Ergebnisse zeigen, ist in der frühen Phase nach Leberteileresektion zwar ein protektiver Effekt durch IP-Behandlung möglicherweise im Sinne von Auswaschphänomenen zu erkennen, jedoch scheint durch Zunahme der postoperativen Hyperperfusion diese Protektion nachhaltig aufgehoben zu sein.

Unter diesen Umständen ist die Anwendung der ischämischen Präkonditionierung bei Leberresektionen nur eingeschränkt zu empfehlen. Es sollte in Hinblick auf ein mögliches schädigendes Hyperperfusionssyndrom immer das Ausmaß der Resektion und somit der verbleibenden Parenchymmasse berücksichtigt werden.

6. Literaturverzeichnis

Albrecht JH, Hansen LK. Cyclin D1 promotes mitogen-independent cell cycle progression in hepatocytes. *Cell growth & Differentiation* 1999; 10: 397-404

Arai M, Thurman RG, Lemaster JJ. Ischemic preconditioning of rat livers against cold storage-reperfusion injury: Role of nonparenchymal cells and the phenomenon of heterologous preconditioning. *Liver Transplantation* 2001; 7: 292-299

Arii S, Imamura M. Physiological role of sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells and their implication in the pathogenesis of liver injury. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2000; 7: 40-48

Arii S, Teramoto K, Kawamura T. Current progress in the understanding of and therapeutic strategies for ischemia and reperfusion injury of the liver. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2003; 10: 189-194

Bechstein WO, Neuhaus P. Blutungsproblematik in der Leberchirurgie und Lebertransplantation. *Chirurg* 2000; 71: 363-368

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

Bismuth H, Castaing D, Garden OJ. Major hepatic resection under total vascular exclusion. *Ann Surg*; 1989; 210: 13-19

Blumhardt G, Ringe B, Bechstein WO, Pichlmayr R. Current clinical management of organoprotection in hepatic surgery. *Klin Wochenschr* 1986; 64: 144-145

Burne MJ, Elghandour A, Haq M et al. IL-1 and TNF independent pathways mediate ICAM-1/ VCAM-1 up-regulation in ischemia reperfusion injury. *Journal of Leukocyte Biology* 2001; 70: 192-198

Cardenas A. Hepatorenal syndrome: A dreaded complication of end-stage liver disease. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 460-467

Chiappa A, Zbar AP, Audisio A, Leone BE, Biella F, Staudacher C. Factors affecting survival and long-term outcome in the cirrhotic patient undergoing hepatic resection for hepatocellular carcinoma. *European journal of Surgical Oncology* 2000; 26: 387-392

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

Clavien PA, Yadav S, Sindram D, Bentley RC. Protective effects of ischemic preconditioning for liver resection performed under inflow occlusion in humans. *Annals of Surgery* 2000; 232: 155-162

Clavien PA, Selzner M, Rüdiger HA et al. A prospective randomised study in 100 consecutive patients undergoing major liver resection with versus without ischemic preconditioning. *Annals of Surgery* 2003; 238: 843-850

Court FG, Wemyss-Holden SA, Dennison AR, Maddern GJ. The mystery of liver regeneration. *Br J Surg.* 2002; 89(9): 1089-1095

Cutrin JC, Perelli MG, Cavalieri B, Peralta C, Catafau JR, Poli G. Microvascular dysfunction induced by reperfusion injury and protective effect of ischemic preconditioning. *Free Radical Biology & Medicine* 2002; 33: 1200-1208

Downey JM, Liu GS, Thornton JD. Adenosine and the anti-infarct effects of preconditioning. *Cardiovasc Res.* 1993; 27: 3-8

Ezaki T, Koyanagi N, Toyomasu T, Ikeda Y, Sugimachi K. Natural history of hepatectomy regarding liver function: a study of both normal livers and livers with chronic hepatitis and cirrhosis. *Hepatogastroenterol* 1998; 45: 1795-1801

Fausto N, Laird AD, Webber EM. Liver regeneration. 2. Role of growth factors and cytokines in hepatic regeneration. *FASEB J.* 1995; 9: 1527-1536

Fausto N. Liver regeneration. *Journal of Hepatology* 2000; 32: 19-31

Gaub J, Iversen J. Rat liver regeneration after 90% partial hepatectomy. *Hepatology* 1984; 4: 902-904

Gerlach C, Sakkab DY, Scholzen T, Daßler R, Alison MR, Gerdes J. Ki-67 expression during rat liver regeneration after partial hepatectomy. *Hepatology* 1997; 26: 573-578

Glanemann M, Langrehr JM. Klinische Ergebnisse nach orthotoper Lebertransplantation in Abhängigkeit des Ischämie/ Reperfusionsschadens. *Transplant Linc* 2001; 4: 58-66

Glanemann M, Vollmar B, Nuessler AK, Schaefer T, Neuhaus P, Menger MD. Ischemic preconditioning protects from hepatic ischemia/ reperfusion injury by preservation of microcirculation and mitochondrial redox state. *J Hepatol* 2003; 38: 59-66

Glanemann M, Münchow S, Schirmeier A et al. Steroid administration before partial hepatectomy with temporary inflow occlusion does not influence cyclin D1 and Ki-67 related liver regeneration. *Langenbecks Arch Surg* 2004; 389: 380-386

Glanemann M, Strenziok R, Kuntze R et al. Ischemic preconditioning and methylprednisolone both equally reduce hepatic ischemia/ reperfusion injury. *Surgery* 2004; 135: 203-214

Hardy KJ, McClure DN, Subwongcharoen S. Ischaemic preconditioning of the liver: A preliminary study. *Aust NZJ Surg* 1996; 66: 707-710

Hawaleshka A, Jacobson E. Ischemic preconditioning: mechanisms and potential clinical applications. *Can J Anaeth* 1998; 45: 670-682

Higgins GM, Anderson RM. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol* 1931; 12: 186-202

Hirsch J, Hansen KC, Choi S et al. Warm ischemia induced alterations in oxidative and inflammatory proteins in hepatic Kupffer cells in rats. *Mol Cell Proteomics* 2006; 5: 979-986

Hotter G, Closa D, Prados M et al. Intestinal preconditioning is mediated by a transient increase in nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 222: 27-32

Howell JG, Zibari GB, Brown MF et al. Both ischemic and pharmacological preconditioning decrease hepatic leukocyte/ endothelial cell interactions. *Transplantation*. 2000; 69: 300-303

Hsu JC, Bravo R, Taub R. Interactions among LRF-1, JunB, c-Jun, and c-Fos define a regulatory program in the G1 phase of liver regeneration. *Mol Cell Biol*. 1992; 12: 4654-4665

Ishida T, Yarimizu K, Gute DC, Korthuis RJ. Mechanisms of ischemic preconditioning. *Shock*. 1997; 8: 86-94

Ishii S, Abe T, Saito T et al. Effects of preconditioning on ischemia/ reperfusion injury of hepatocytes determined by immediate early gene transcription. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2001; 8: 461-468

Jaeschke H, Farhood A. Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Am J Physiol* 1991; 260: 355-362

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

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

Jaeschke H, Cellular adhesion molecules: regulation and functional significance in the pathogenesis of liver diseases. *Am J Physiol*. 1997; 273: 602-611

Jaumot M, Estanyol JM, Serratos J, Agell N, Bachs O. Activation of cdk4 and cdk2 during rat liver regeneration is associated with intranuclear rearrangements of cyclin-cdk complexes. *Hepatology* 1999; 29: 385-395

Kam I, Lynch S, Svanas G et al. Evidence that host size determines liver size: studies in dogs receiving orthotopic liver transplants. *Hepatology* 1987; 7: 362-366

Kato A, Ota S, Bamba H, Wong RM, Ohmura E, Imai Y, Matsuzaki F. Regulation of cyclin D-dependent kinase activity in rat liver regeneration. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1998; 245: 70-74

Kim YI. Ischemia-reperfusion injury of the human liver during hepatic resection. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2003; 10: 195-199

Kim JS, Ohshima S, Pediaditakis P, Lemaster JJ. Nitric oxide protects rat hepatocytes against reperfusion injury mediated by the mitochondrial permeability transition. *Hepatology* 2004; 39: 1533-1543

Korthuis RJ, Gute DC, Cepinskas G, Kvietys PR. Cellular mechanisms of acute versus delayed preconditioning. *Pathophysiology* 1998; 5: 35-48

Kountouras J, Boura P, Lygidakis NJ. Liver regeneration after hepatectomy. *Hepato-Gastroenterology* 2001; 48: 556-562

Kume M, Yamamoto Y, Saad S. Ischemia 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

Kuzume M, Nakano H, Yamaguchi M et al. A monoclonal antibody against ICAM-1 suppresses hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. *Eur Surg Res* 1997; 29: 93-100.

Lentsch AB, Kato A, Yoshidome H, McMasters KM, Edwards MJ. Inflammatory mechanisms and therapeutic strategies for warm hepatic ischemia/ reperfusion injury.

Hepatology 2000; 32: 169-173

Liu P, Xu B, Hock CE, Nagele R, Sun FF, Wong PY. NO modulates P-selectin and ICAM-1 mRNA expression and hemodynamic alterations in hepatic I/R. Am J Physiol. 1998; 275: 2191-2198.

Lloris-Carsi JM, Cejalvo D, Toledo-Pereyra LH, Calvo MA, Suzuki S. Preconditioning: effect upon lesion modulation in warm liver ischemia. Transplant Proc 1993; 25: 3303-3304

Man K, Fan ST, Lo CM et al. Graft injury in relation to graft size in right lobe live donor liver transplantation: a study of hepatic sinusoidal injury in correlation with portal hemodynamics and intragraft gene expression. Ann Surg 2003; 237: 256-64.

Mann DV, Lam WW, Hjelm NM et al. Human liver regeneration: hepatic energy economy is less efficient when the organ is diseased. Hepatology 2001; 34: 557-65.

Martinez-Mier G, Toledo-Pereyra LH, Ward PA. Adhesion molecules in liver ischemia and reperfusion. Journal of Surgical Research 2000; 94: 185-194

Marubayashi S, Takenaka M, Dohi K, Ezaki H, Kawasaki T. Adenine nucleotide metabolism during hepatic ischemia and subsequent blood reflow periods and its relation to organ viability. Transplantation 1980; 30: 294-296

McCallion K, Wattanasirichaigoon S, Gardiner KR, Fink MP. Ischemic preconditioning ameliorates ischemia- and reperfusion-induced intestinal epithelial hyperpermeability in rats. Shock 2000; 14: 429-34.

Michalopoulos GK, DeFrances MC. Liver regeneration. Science 1997; 276: 60-66

Morello D, Lavenu A, Babinet C. Differential regulation and expression of jun, c-fos and c-myc proto-oncogenes during mouse liver regeneration and after inhibition of protein synthesis. Oncogene. 1990; 5: 1511-1519

Mueller AR, Platz KP, Haak M et al. The release of cytokines, adhesion molecules and extracellular matrix parameters during and after reperfusion in human liver transplantation. *Transplantation* 1996; 62:1118-1126

Murrey CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986; 74: 1124-1136

Nakayama H, Yamamoto Y, Kume M et al. Pharmacologic stimulation of adenosine A2 receptor supplants ischemic preconditioning in providing ischemic tolerance in rat livers. *Surgery* 1999; 126: 945-954

Nilsson B, Friman S, Gustafsson BI, Delbro DS. Preconditioning protects against ischemia/ reperfusion injury of the liver. *J Gastrointest Surg* 2000; 4: 44-49

Nussler AK, Billiar TR. Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. *J Leukoc Biol* 1993; 54: 171-178

Nussler AK, Beger HG, Liu ZZ, Billiar TR. Nitric oxide, hepatocytes and inflammation. *Res Immunol* 1995; 146: 671-677

Ogawa T, Nussler AK, Tuzuner E et al. Contribution of nitric oxide to the protective effects of ischemic preconditioning in ischemia-reperfused rat kidneys. *J Lab Clin Med* 2001; 138: 50-58

Oliviera CPMS, Lopasso FP, Laurindo FRM, Leitao RMC, Laudanna AA. Protection against liver ischemia reperfusion injury in rats by silymarin or verapamil. *Transplantation Proceedings*; 2001; 33: 3010-3014

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. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 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 oxid and adenosine. *Hepatology* 1997; 25: 934-937

Peralta C, Closa D, Xaus C, Gelpi 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, Fernandez L, Panes J et al. Preconditioning protects against systemic disorders associated with hepatic ischemia reperfusion through blockade of Tumor Necrosis Factor-induced P-Selectin up-regulation in the rat. *Hepatology* 2001; 33: 100-113

Peralta C, Serafin A, Fernandez-Zabalegui L, Wu ZY, Rosello-Catafau J. Liver ischemic preconditioning: a new strategy for the prevention of ischemia-reperfusion injury. *Transplant Proc* 2003; 35: 1800-1802

Pines J. Mitosis: a matter of getting rid of the right protein at the right time. *Trends Cell Biol* 2006; 16: 55-63

Prins HA, Meijer C, Boelens PG et al. The role of Kupffer cells after major liver surgery. *J Parenter Enteral Nutr* 2005; 29: 48-55

Rüdiger HA, Kang KJ, Sindram D, Riehle HM, Clavien PA. Comparison of ischemic preconditioning and continuous inflow occlusion in the murine liver. *Ann Surg* 2002; 235: 400-407

Schemmer P, Mehrabi A, Kraus T et al. New aspects on reperfusion injury to liver – impact of organ harvest. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19 [Suppl 4]: 26-35

Schott RJ, Rohmann S, Braun ER, Schaper W. Ischemic preconditioning reduces infarct size in swine myocardium. *Circ Res* 1990; 66: 1133-1142

Selzner N, Rudiger H, Graf R, Clavien PA. Protective strategies against ischemic injury of the liver. *Gastroenterology* 2003; 125: 917-936

Serracino-Inglott F, Habib NA, Mathie RT. Hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Surg* 2001; 181: 160-166

Shaked A, Nunes FA, Olthoff KM, Lucey MR. Assessment of liver function: pre- and peritransplant evaluation. *Clinical Chemistry* 1997; 43: 1539-1545

Sherr CJ, Roberts JM. Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 2004; 18: 2699-2711

Shimada M, Saitoh A, Kano T, Takenaka K, Sugimachi K. The effect of a perioperative steroid pulse on surgical stress in hepatic resection. *Int Surg* 1996; 81: 49-51

Singh I, Zibari GB, Zizzi H et al. Anti-P-selectin antibody protects against hepatic ischemia-reperfusion injury. *Transplant Proceed* 1998; 30: 2324-2326

Stocker E, Wullstein HK, Brau G. Capacity of regeneration in liver epithelia of juvenile, repeated partially hepatectomized rats. *Virchows Arch B Cell Pathol* 1973; 14: 93-103

Sugimoto H, Kaneko T, Hirota M, Nagasaka T. Critical progressive small-graft injury caused by intrasinusoidal pressure elevation following living donor liver transplantation. *Transplantation Proceedings* 2004; 36: 2750-2756

Teoh N, Dela Pena A, Farrell G. Hepatic ischemic preconditioning in mice is associated with activation of NF- κ B, p38 kinase, and cell cycle entry. *Hepatology* 2002; 36: 94-102

Teoh NC, Farrell GC. Hepatic ischemia reperfusion injury: Pathogenetic mechanisms and basis for hepatoprotection. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2003; 18: 891-902

Troisi R, Hemptinne B. Clinical relevance of adapting portal vein flow in living donor liver transplantation in adult patients. *Liver Transplantation* 2003; 9: 36-41

Tucker O N, Heaton N. The "small for size" liver syndrome. *Curr Opin Crit Care* 2005; 11: 150-155

Uchida M, Takemoto Y, Nagasue N, Dhar DK, Kohno H, Nakamura T. Effect of verapamil on hepatic reperfusion injury after prolonged ischemia in pigs. *J Hepatol* 1994; 21: 217-223

Valen G, Kawakami T, Tahepold P et al. Pretreatment with methylprednisolone protects the isolated rat heart against ischemic and oxidative damage. *Free Radic Res* 2000; 33: 31-43

Vajdova K, Heinrich S, Tian Y, Graf R, Clavien PA. Ischemic preconditioning and intermitted clamping improve hepatic microcirculation and Kupffer cell function after ischemic injury. *Liver Transplantation* 2004; 10: 520-528

Wang M, Sakon M, Umeshita K et al. Prednisolone suppresses ischemia-reperfusion injury of the rat liver by reducing cytokine production and calpain μ activation, *J Hepatol* 2001; 34: 278-283

Yadav SS, Howell DN, Gao W, Steeber DA, Harland RC, Clavien PA. L-selectin and ICAM-1 mediate reperfusion injury and neutrophil adhesion in the warm ischemic mouse liver. *Am J Physiol* 1998; 275: 1341-1352

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: 1223-1231

Yamashita Y, Shimada M, Hamatsu T et al. Effects of preoperative steroid administration on surgical stress in hepatic resection. *Arch Surg* 2001; 136: 328-333

Yellon DM, Alkhulaifi AM, Browne EE, Pugsley WB. Ischaemic preconditioning limits infarct size in the rat heart. *Cardiovasc Res* 1992; 26: 983-987

Yin DP, Sankary HN, Chong ASF et al. Protective effect of ischemic preconditioning on liver preservation-reperfusion injury in rats. *Transplantation* 1998; 66: 152-157

Yokota R, Fukai M, Shimamura T et al. A novel hydroxyl radical scavenger, nicaraven, protects the liver from warm ischemia and reperfusion injury. *Surgery* 2000; 127: 661-669

Zapletal C, Maksan SM, Lehmann T et al. Ischemic preconditioning improves liver microcirculation after ischemia/ reperfusion. *Transplantation Proceedings* 1999; 31: 3260-3262

Zimmermann A. Regulation of liver regeneration. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19: 6-10

7. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

8. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. M. Glanemann für die Überlassung des Themas, der fachlichen und persönlichen Unterstützung sowie der Hilfestellung beim Erlernen operativer Fähigkeiten. Nicht zuletzt ist es seinem kontinuierlichen Engagement zu verdanken, dass die vorliegende Arbeit fertig gestellt werden konnte.

Ebenso möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. A. K. Nüssler bedanken für die Beratung sowie sachkundige Anleitung und konstruktive Unterstützung bei der Versuchsdurchführung und –planung.

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. P. Neuhaus für sein entgegengebrachtes Vertrauen bedanken, das mir die Möglichkeit gab, meine Dissertation in seiner Klinik zu erstellen.

Bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des chirurgischen Forschungslabors bedanke ich mich für die tatkräftige Unterstützung bei der Arbeit im Labor.

Zuletzt möchte ich besonders meinen Eltern danken, die mich während meines gesamten Werdeganges unterstützt haben und die mir das Studium der Humanmedizin und den Weg zur Promotion erst ermöglicht haben.

9. Erklärung

„Ich, Simone Münchow, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: Ischämische Präkonditionierung: Bedeutung für Ischämie/ Reperfusionsschädigung und Leberregeneration nach partieller Hepatektomie mit temporärer Organischämie im Rattenmodell selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift