

Aus dem Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Ulrich Pohl

Rolle von T-Zellen bei Ischämie-Reperfusion der Leber

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Marc Patrick Hanschen

aus Delmenhorst

2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Fritz Krombach

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Alexander L. Gerbes

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Heiko Methe
Prof. Dr. Dr. Jürgen Haas

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter Dr. Andrej Khandoga

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 16.07.2009

Meinen Eltern und meinem Bruder in Dankbarkeit gewidmet

1. EINLEITUNG	7
1.1. Bedeutung des Ischämie-Reperfusionsschadens in der Leberchirurgie.....	7
1.2. Mikrozirkulation der Leber	7
1.3. Ischämie-Reperfusionsschaden	8
1.3.1. Pathomechanismen des hepatischen Ischämie-Reperfusionsschadens.....	8
1.3.2. <i>Multi-step</i> -Modell der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion	9
1.3.3. Beteiligung von T-Zellen am I/R-Schaden	11
1.3.4. Potentielle Interaktion von T-Zellen und Thrombozyten während hepatischer Ischämie-Reperfusion.....	12
1.3.5. Potentielle Interaktion von T-Zellen und Kupffer-Zellen während hepatischer Ischämie-Reperfusion.....	13
1.4. Potentielle Mechanismen der Antigen-unabhängigen Aktivierung von CD4+ T-Zellen	14
2. ZIELSETZUNG	16
3. MATERIAL UND METHODEN	17
3.1. Modell	17
3.1.1. Vorbemerkungen.....	17
3.1.2. Versuchstiere.....	17
3.1.3. Narkose.....	17
3.1.3.1. Atmung.....	17
3.1.3.2. Lagerung und Makrohämodynamik	17
3.1.4. Chirurgische Technik	18
3.1.4.1. Reversible partielle Ischämie der Leber.....	18
3.1.4.2. Reperfusion	18
3.1.5. Kontrolltiere	18
3.1.6. Positive Separation von T-Zellen.....	19
3.1.6.1. MACS [®] Technik (Magnetic Associated Cell Sorting).....	19
3.1.6.2. Aktivitätsmessung von T Zellen nach positiver Separation.....	20
3.1.6.3. Vitalitätsmessung von T-Zellen nach positiver Separation.....	21
3.1.7. Thrombozytenseparation.....	22
3.1.8. Intravitale Fluoreszenzmikroskopie	22
3.1.8.1. Technischer Aufbau	22
3.1.8.2. T-Zell-Endothelzell-Interaktion	23
3.1.8.3. Emigration von T-Zellen.....	24
3.1.8.4. Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion.....	25
3.1.8.5. Kolokalisation von T-Zellen und Thrombozyten.....	25
3.1.8.6. Sinusoidale Perfusion.....	26
3.1.8.7. Leukozyten-Endothelzell-Interaktion.....	26
3.1.8.8. Phagozytoseaktivität von Kupffer-Zellen	26
3.1.9. Plasmaproben und Plasmaparameter.....	27
3.1.10 Histologie	27
3.1.10.1. Probengewinnung.....	27
3.1.10.2. Granulozyten Naphthol AS-D Chlorazetat Esterase-Färbung für Leukozytenemigration.....	27
3.2. Versuchsprotokolle.....	28
3.2.1. Rekrutierung von T-Zell-Subpopulationen in der postischämischen Leber	28
3.2.1.1. Versuchsgruppen.....	28
3.2.1.2. Versuchsablauf.....	29

3.2.2. Beteiligung von CD4+ T-Zellen an der postischämischen Rekrutierung von Thrombozyten und Leukozyten sowie an der Ausbildung des mikrovaskulären hepatischen I/R-Schadens	30
3.2.2.1. Versuchsgruppen.....	30
3.2.2.2. Versuchsablauf.....	31
3.2.3. Kolokalisation von CD4+ T-Zellen und Thrombozyten in der hepatischen Mikrozirkulation.....	32
3.2.3.1. Versuchsgruppen.....	33
3.2.3.2. Versuchsablauf.....	34
3.2.4. Auswirkungen einer MHC-Klasse-II-Blockade auf die Ausbildung des hepatischen I/R Schadens	34
3.2.4.1. Versuchsgruppen.....	35
3.2.4.2. Versuchsablauf.....	35
3.2.5. Potentielle Interaktion von CD4+ T-Zellen und Kupffer-Zellen während hepatischer Ischämie-Reperfusion	36
3.2.5.1. Versuchsgruppen.....	36
3.2.5.2. Versuchsablauf.....	37
3.2.6. Einfluss von CD4+ T-Zellen auf die Aktivität von Kupffer-Zellen während hepatischer Ischämie-Reperfusion	38
3.2.6.1. Versuchsgruppen.....	38
3.2.6.2. Versuchsablauf.....	39
3.3. Statistik.....	39
4. ERGEBNISSE.....	40
4.1. Positive Selektion von T-Zellen.....	40
4.1.1. Aktivitätsstatus selektionierter T-Zellen	40
4.1.2. Vitalitätsstatus selektionierter T-Zellen	41
4.2. Analyse der Rekrutierung von T-Zell-Subpopulationen in der hepatischen Mikrozirkulation.....	41
4.2.1. Rekrutierung von CD4+ und CD8+ T-Zellen in der hepatischen Mikrozirkulation	42
4.2.2. Emigration von CD4+ T-Zellen in der postischämischen hepatischen Mikrozirkulation.....	45
4.3. Analyse der Beteiligung von CD4+ T-Zellen an der Ausbildung des postischämischen hepatischen I/R-Schadens	46
4.3.1. Quantitative Analyse der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen	47
4.3.2. Quantitative Analyse der Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen.....	47
4.3.3. Quantitative Analyse der Sinusoidalen Perfusion.....	48
4.3.4. Quantitative Analyse der Emigration von neutrophilen Granulozyten.....	49
4.3.5. Quantitative Analyse der hepatozellulären Schadens	51
4.4. Analyse der Interaktion von CD4+ T-Zellen mit Thrombozyten in der Leber bei I/R.	52
4.5. Analyse der Auswirkungen einer MHC-Klasse-II-Blockade auf die Ausbildung des hepatischen I/R-Schaden	54
4.6. Analyse der Interaktion zwischen CD4+ T-Zellen und Kupffer-Zellen während hepatischer I/R.....	56
4.6.1. Quantitative Analyse der Kupffer-Zell-abhängigen Aktivierung von CD4+ T-Zellen.....	56
4.6.2. Quantitative Analyse der CD4+ T-Zell-abhängigen Aktivierung von Kupffer-Zellen.....	59
5. DISKUSSION	60
5.1. Diskussion der Methodik	60
5.1.1. Versuchstiere.....	60

5.1.2. Narkose und Chirurgische Technik.....	61
5.1.3. Isolierung und Markierung von T-Zellen.....	61
5.1.4. Thrombozytenseparation.....	62
5.1.5. Intravitale Fluoreszenzmikroskopie.....	62
5.1.5.1. Technisches Setup.....	63
5.1.5.2. Mikrozirkulatorische Parameter.....	64
5.1.6. Versuchsprotokoll.....	65
5.2. Diskussion der Ergebnisse.....	66
5.2.1. Akkumulation von CD4+ T-Zellen in der postischämischen hepatischen Mikrozirkulation.....	66
5.2.2. Beteiligung von CD4+ T-Zellen an der Ausbildung des I/R-Schadens der Leber.....	69
5.2.2.1. Interaktion von CD4+ T-Zellen mit Thrombozyten.....	69
5.2.2.2. Beteiligung von CD4+ T-Zellen an der Ausbildung des mikrovaskulären und hepatozellulären Schadens nach I/R.....	71
5.2.2.3. Aktivierung von CD4+ T-Zellen während der alloantigen-unabhängigen hepatischen I/R.....	72
5.2.3. Interaktion von CD4+ T-Zellen und Kupffer-Zellen während hepatischer Ischämie-Reperfusion.....	74
5.2.3.1. Aktivierung von CD4+ T-Zellen durch Kupffer-Zellen während hepatischer I/R.....	75
5.2.3.2. Aktivierung von Kupffer-Zellen durch CD4+ T-Zellen während hepatischer I/R.....	76
6. SCHLUSSFOLGERUNG.....	78
7. ZUSAMMENFASSUNG.....	80
7. LITERATURVERZEICHNIS.....	82
8. DANKSAGUNG.....	93
9. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	95
10. CURRICULUM VITAE.....	97
11. PUBLIKATIONEN.....	98

1. EINLEITUNG

1.1. Bedeutung des Ischämie-Reperfusionsschadens in der Leberchirurgie

Ischämie, aus dem griechischen *ισχαιμία* (*ischaimia*) für „*isch* – Halt“ und „*häma* – Blut“ abgeleitet, ist ein Zustand verminderter Blutversorgung in einem Organ. Demgegenüber beschreibt Reperfusion die Wiederaufnahme der Blutversorgung in einem ischämischen Organ. In der Chirurgie der Leber steht der Ischämie-Reperfusion (I/R) eine besondere Rolle zu. Nicht nur bei Lebertransplantationen, sondern auch bei Leberteileresektionen, Lebertraumaversorgungen und Schockereignissen mit einhergehender Zentralisation tritt ein I/R-Schaden des Organs auf⁸. In Deutschland wurden im Jahre 2006 854 Lebertransplantationen durchgeführt (EUROTRANSPLANT, Annual Report 2006). Weit häufiger treten I/R-Schäden bei diversen Formen der vaskulären Kontrolle während leberchirurgischer Eingriffe auf. Unter Anwendung des Pringle-Manövers, erstbeschrieben durch Pringle 1908⁹⁹, wird durch das Abklemmen des *ligamentum hepatoduodenale* ein ausgedehnter Blutverlust bei Leberoperationen vermieden. Dieses Verfahren, auch als *portal triad clamping* bezeichnet, wird durch die totale Gefäßokklusion (*hepatic vascular occlusion*) ergänzt, bei der durch ein zusätzliches Abklemmen der supra- und infrahepatischen *Vena cava* auch ein venöser Blutverlust unterbunden wird¹⁶. Bei Lebertransplantationen und den Verfahren der vaskulären Kontrolle treten postoperativ Beeinträchtigungen der Organfunktion durch einen I/R-Schaden auf, so dass Alternativen wie die selektive vaskuläre Okklusion bzw. das selektive vaskuläre Clamping mittlerweile eine breite Anwendung finden. Trotz Einführung der selektiven vaskulären Okklusion und des selektiven vaskulären Clamping ist die klinische Relevanz der hepatischen I/R nicht gemindert: Insbesondere bei Notfalleingriffen, wie z.B. bei einer Leberruptur, hat das Pringle-Manöver einen unbestrittenen Stellenwert. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass 10% aller frühzeitigen Organversagen nach Lebertransplantation alleinig durch den I/R-Schaden zu erklären sind³⁶. Schließlich führt die höhere Anfälligkeit von marginalen Spenderorganen gegenüber dem I/R-Schaden zu einer Verschärfung der Organknappheit.

1.2. Mikrozirkulation der Leber

Die Leber, lokalisiert im rechten Oberbauch, wird mit Blut von der *A. hepatica* und der *Vena portae* versorgt. Beide Gefäße verlaufen zusammen mit dem Gallengang im *ligamentum hepatoduodenale*. In den Portalfeldern findet sich diese Trias wieder (Abb. 1). Leberläppchen,

Grundeinheiten der Leberarchitektur, werden von Portalfeldern umsäumt und mit Blut versorgt. Über die Zentralvene, welche sich im Zentrum eines Leberläppchens befindet, wird venöses Blut in die *Vena cava* drainiert. Als Besonderheit der Sinusoide, den Gefäßen zwischen den Portalfeldern und der Zentralvene, gilt, dass diese von fenestriertem Endothel ausgekleidet werden.

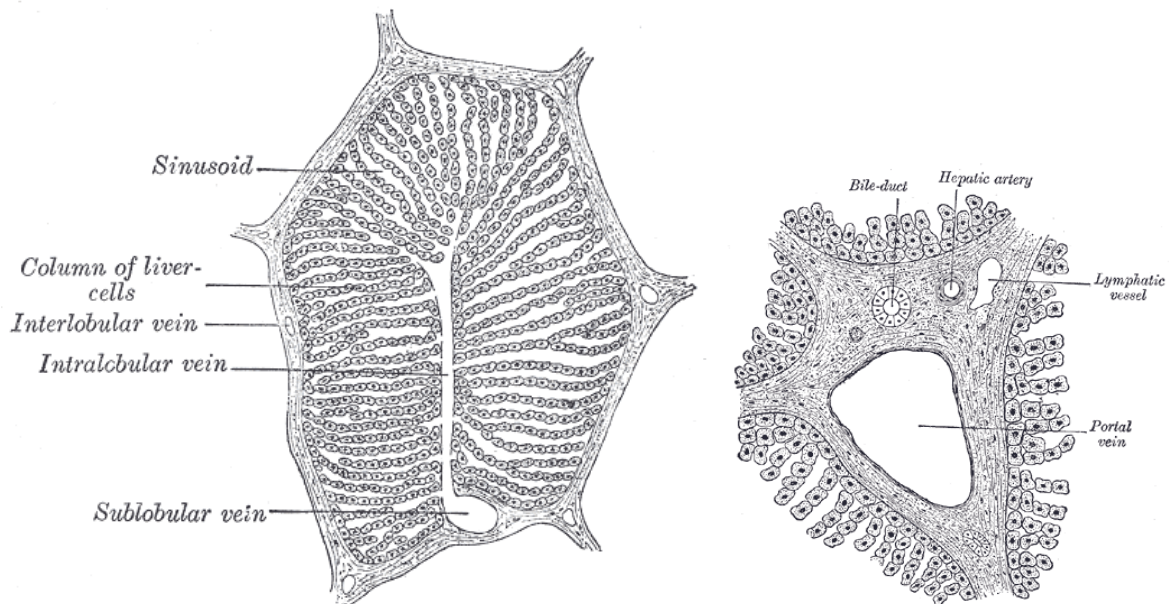


Abb. 1: Schematische Darstellung der Mikrozirkulation der Leber. Links ein Leberläppchen mit Portalfeldern, Sinusoiden (Sinusoid) und einer Zentralvene (Intralobular vein). Leberläppchen werden von mehreren Portalfeldern umsäumt. Ein Portalfeld, rechts, besteht charakteristischerweise aus einem Ast der hepatischen Arterie und der Portalvene sowie einem Gallekanälchen und lymphatischen Gefäßen. (Quelle: Gray's Anatomy)

1.3. Ischämie-Reperfusionsschaden

1.3.1. Pathomechanismen des hepatischen Ischämie-Reperfusionsschadens

Leberschäden verursacht durch I/R werden als Endpunkt eines multifaktoriellen Prozesses gesehen. In der Literatur werden Kaskaden der Zellaktivierung diskutiert. Demnach gibt es Hinweise darauf, dass Kupffer-Zellen, neutrophile Granulozyten und Endothelzellen aktiviert werden und an der Pathogenese des I/R-Schadens beteiligt sind^{36, 71}. Während der Phase der Ischämie tritt eine Gewebehypoxie auf. Diese ist mit einer Depletion von Adenosin-triphosphat (ATP), einer Akkumulation intrazellulären Natriums und schließlich der Entwicklung eines zellulären Ödems assoziiert⁴. Durch das Anschwellen der ischämischen Zellen kommt es zu einer Verengung der Blutgefäße. Es tritt das so genannte *No-reflow*-Phänomen auf, welches Ausdruck einer gestörten mikrovaskulären Funktion ist und zu einer eingeschränkten Perfusion führt⁸⁶. Im Rahmen der Reutilisation von Adenosin kommt es

unter hypoxischen Bedingungen zu einer Ansammlung von Sauerstoffradikalen. Diese können redoxsensitive Transkriptionsfaktoren aktivieren, die ihrerseits die Expression von proinflammatorischen Zytokinen und Adhäsions- sowie kostimulatorische Moleküle induzieren. Es konnte gezeigt werden, dass Endothelzellen im Setting der I/R die vulnerabelsten nicht-parenchymatösen Zellen sind¹⁴. Es wird daher davon ausgegangen, dass im Rahmen deren Aktivierung verstärkt exprimierte Adhäsionsmoleküle und kostimulatorische Moleküle sowie eine verstärkte Ausschüttung von Chemokinen auf der Oberfläche der Zellmembran das Rückgrat der postischämischen Leukozyten-Endothelzell-Interaktion darstellen.

1.3.2. *Multi-step*-Modell der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion

Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen treten nicht nur während I/R auf, sondern auch im Rahmen des *Homing* in Lymphknoten und der Extravasation von Leukozyten in entzündetem Gewebe. Dabei wurde diese Interaktion mittlerweile charakterisiert als ein *Multi-step*-Prozess, bestehend aus Rollen, Aktivierung, Adhäsion und Transmigration. In der folgenden Abbildung ist dieser *Multi-step*-Prozess schematisch dargestellt.

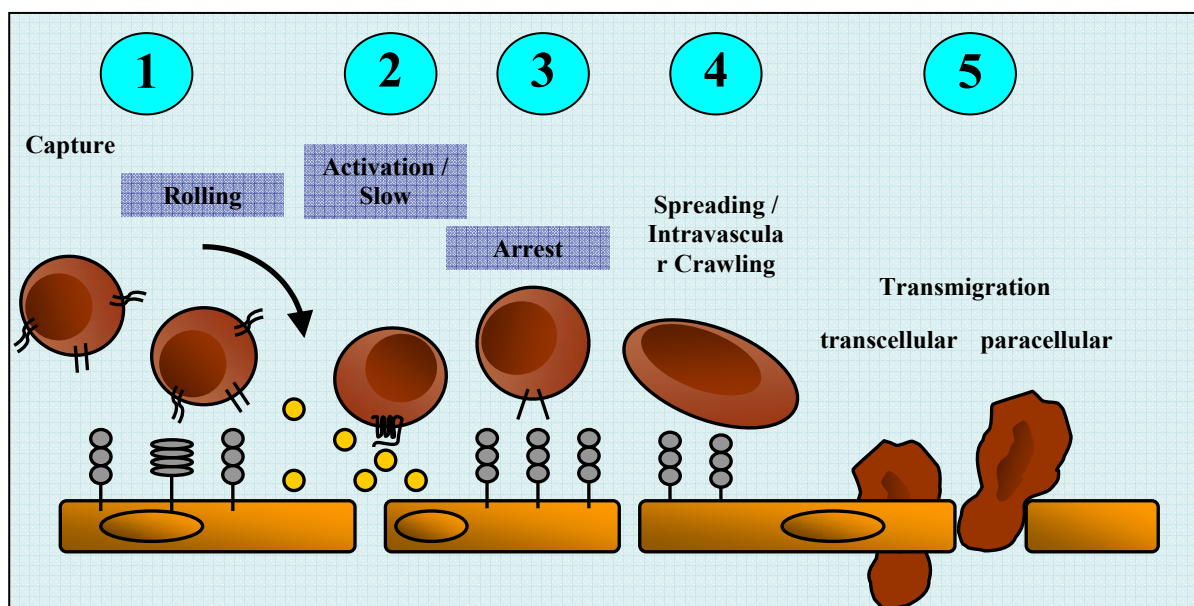


Abb. 2: Erweiterte schematische Darstellung des *Multi-step*-Prozesses der transendothelialen Migration von T-Zellen (modifiziert nach Ley et al., Nat Rev Immunol 7, 2007). Erläuterungen zu den einzelnen Schritten der Interaktion zwischen T-Zellen und Endothelzellen im Text.

Um auf die Interaktion zwischen T-Zellen und Endothelzellen zu fokussieren, wird im folgenden auf die nach derzeitigem Kenntnisstand bekannten Interaktionswege zwischen T-Zellen und dem Endothelzellen eingegangen^{45, 76}.

Zur erfolgreichen Extravasation (transendothelialen Migration) wird ein Lymphozyt im ersten Schritt über die Selektine (CD62P, CD62E) und Adhäsionsmoleküle der Ig-Superfamilie, exprimiert auf den Endothelzellen, „gefangen“ (vgl. Schritt 1 in Abb. 2). Dieser Prozess setzt sich aus den als *capturing* (Einfangen) und *rolling* (Rollen) bezeichneten Schritten zusammen und führt zu einer deutlichen Verlangsamung der Geschwindigkeit des Lymphozyten im Blutfluss. Dabei ermöglichen L-Selektine und Integrine auf den Lymphozyten eine charakteristische on-off Verbindung mit dem Endothel.

Es wird davon ausgegangen, dass diese Verlangsamung der Geschwindigkeit Voraussetzung zu einer Aktivierung von Lymphozyten im weiteren Verlauf der Interaktion zwischen Endothelzellen und Leukozyten ist. Chemokine, ausgeschüttet von dem postischämischen Endothel, werden in der Glykokalix der Endothelzellen präsentiert (vgl. Schritt 2 in Abb. 2). Diese werden von Chemokinrezeptoren auf den Lymphozyten erkannt, so dass eine G-Protein-vermittelte Aktivierung der Lymphozyten stattfinden kann.

Diese Aktivierung erlaubt eine starke Adhäsion zwischen Lymphozyten und dem Endothel über LFA-1 (*Lymphocyte function-associated antigen-1*) und β -Integrinen sowie den endothelialen Adhäsionsmolekülen der Ig-Superfamilie (vgl. Schritt 3 in Abb. 2).

Jüngst wurde durch neue Erkenntnisse das 3- Stufen Modell der Interaktion von Leukozyten und Endothelzellen erweitert. Das klassische Modell bestehend aus *rolling*, *activation* und *arrest* (dunkelblau unterlegt, vgl. Grafik) wurde um das *crawling* und die *transmigration* erweitert. Im Rahmen des *crawling*, des Kriechens der Leukozyten, findet nach erfolgter Adhäsion das *inside-out signalling* in den Leukozyten statt. So werden in Lymphozyten, die am Endothel adhären, vor allem über LFA-1 und MAC-1 (*Macrophage antigen-1*) intrazelluläre Signalwege aktiviert.

Es konnte gezeigt werden, dass der Prozess der transendothelialen Migration (vgl. Schritt 5 in Abb. 2) nicht nur über Adhäsionsmoleküle der Ig-Superfamilie, sondern auch von Adhäsionsmolekülen der JAM-Familie (*Junctional adhesion molecule*) mediiert wird. Diese Moleküle interagieren ebenfalls mit LFA-1 und β -Integrinen auf den Lymphozyten. Nach neuen Erkenntnissen wird von Leukozyten neben der parazellulären Route auch die parazelluläre Route während der transendothelialen Migration gewählt⁷⁶.

1.3.3. Beteiligung von T-Zellen am I/R-Schaden

In aktuellen Studien gibt es Hinweise darauf, dass neben neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten auch T-Zellen an der Ausbildung des hepatischen I/R-Schadens beteiligt sind^{21, 114, 115, 139}. Initial wurde unter Berücksichtigung des klassischen Modells des Gewebeschadens den T-Zellen keine Rolle bei der Ausbildung des postischämischen Gewebeschadens zugesprochen. Protektive Effekte von Immunsuppressiva auf den antigen-unabhängigen I/R-Schaden legten jedoch nahe, dass T-Zellen an der Manifestation des I/R-Schadens der Leber beteiligt sind. So führte neben der Verwendung von Takrolimus (FK506) und Cyclosporin auch eine selektive Lymphozytendepletion mittels FTY720 zu einer signifikanten Reduktion des postischämischen Gewebeschadens der Leber^{1, 55, 107}.

Erste Hinweise auf eine Beteiligung von Lymphozyten bei I/R der Leber gaben Untersuchungen von Clavien und Koautoren²¹. Im Modell der isoliert-perfundierten Rattenleber wurde eine definierte Anzahl von Lymphozyten zugegeben. Es zeigte sich, dass nach kalter hepatischer Ischämie die Lymphozytenzahl im Perfusat abnimmt, dabei verstärkt eine Verlängerung der Ischämiezeit diese Abnahme. In experimentellen Studien konnten Zwacka und Mitarbeiter mittels Immunfluoreszenz zeigen, dass Lymphozyten in der postischämischen Leber akkumulieren. Darüber hinaus wurde demonstriert, dass eine T-Zell-Defizienz mit einer Reduktion des postischämischen Leberschadens einhergeht. Dieser hepatoprotektive Effekt konnte durch adoptiven Transfer von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen aufgehoben werden¹³⁹. Weitergehende Studien konnten demonstrieren, dass insbesondere Th₁-Lymphozyten, eine Subpopulation der CD4⁺ Lymphozyten, eine wichtige Rolle bei der Induktion des hepatischen I/R-Schadens spielen¹¹⁵. Hierzu bediente sich die Arbeitsgruppe um Kupiec-Weglinski STAT-defizienter Mäuse verschiedener Art (STAT, *signal transducer and activator of transcription*). STAT-Proteine sind Transkriptionsfaktoren, die eine Verbindung zwischen Zytokinrezeptor und Zytokin-induzierter Transkription herstellen. Nur eine Stat6-Defizienz, die mit einer eingeschränkten Zellfunktion von Th₁-Zellen einhergeht, führt zu einer Hepatoprotektion, gemessen am Serum GPT.

Diese zahlreichen Hinweise deuten darauf hin, dass T-Zellen an der Ausbildung des I/R-Schadens der Leber beteiligt sind. Über die Mechanismen von T-Zell-Endothelzell-Interaktionen in der postischämischen hepatischen Mikrozirkulation ist jedoch nur wenig bekannt. Bislang liegen keine *in vivo* Untersuchungen vor, welche die Rolle von T-Zellen an der Ausbildung des hepatischen I/R-Schadens analysieren und die Mechanismen der T-Zell-Endothelzell-Interaktionen in der postischämischen Leber näher untersuchen.

1.3.4. Potentielle Interaktion von T-Zellen und Thrombozyten während hepatischer Ischämie-Reperfusion

In zahlreichen Studien konnte nachgewiesen werden, dass Thrombozyten an der Ausbildung des hepatischen I/R-Schadens beteiligt sind. Erste Hinweise gaben Cywes und Koautoren, die an der isoliert-perfundierten Rattenleber mittels Elektronenmikroskopie und Immunhistologie eine Adhäsion von Thrombozyten am Endothel nach kalter I/R zeigten²⁶. In Analogie zu den Experimenten von Clavien und Koautoren mit Lymphozyten an der isoliert-perfundierten Leber konnte auch für Thrombozyten gezeigt werden, dass nach I/R ca. 1/3 der Thrombozyten sequestriert werden¹¹⁸. In immunhistologischen Untersuchungen konnte unter Verwendung P-Selektin-defizienter Tiere gezeigt werden, dass die Thrombozytenakkumulation nach I/R von P-Selektin abhängig ist¹³⁵. Hierzu wurden 2002 nähere *in vivo* Untersuchungen durchgeführt⁵⁸. Die quantitative Analyse der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen in der hepatischen Mikrozirkulation zeigte, dass die postischämische Akkumulation von Thrombozyten in Arteriolen und postsinusoidalen Venolen von P-Selektin abhängig ist, eine P-Selektin-Defizienz sich aber nicht auf die postischämische Akkumulation von Thrombozyten in den Sinusoiden auswirkt. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen während hepatischer I/R einen direkten Einfluss auf den postischämischen hepatozellulären sowie den mikrovaskulären Schaden haben^{58, 59}. So werden eine Reihe proinflammatorischer und prokoagulatorischer Mediatoren freigesetzt^{31, 43, 96, 133}, proapoptotische Effekte auf Hepatozyten ausgelöst als auch die Regeneration des Lebergewebes stark beeinträchtigt^{91, 106}.

Aktuelle *in vitro* Studien konnten zeigen, dass aktivierte CD40-positive T-Zellen Thrombozyten aktivieren können, die ihrerseits das kostimulatorische Molekül CD40Ligand (CD40L) exprimieren²⁷. Diese Interaktion führt zu einer Ausschüttung von RANTES seitens der Thrombozyten und setzt eine positive Feedbackschleife in Gang, welche zu einer anhaltenden Aktivierung und Rekrutierung von T-Zellen führt. Diese Studien waren Anlass der Frage nachzugehen, ob und wenn ja über welche Mechanismen T-Zellen mit Thrombozyten während hepatischer I/R interagieren.

Potentielle Mechanismen einer Interaktion über kostimulatorische Moleküle zwischen T-Zellen, Thrombozyten und dem postischämischen hepatischen Endothel sind die folgenden (vgl. Abb. 3): Kostimulatorische Interaktionen zwischen T-Zellen, Thrombozyten und dem sinusoidalen Endothel könnten über CD40L, exprimiert von T-Zellen und Thrombozyten, und CD40, exprimiert von sinusoidalen Endothelzellen und T-Zellen, stattfinden. CD28-B7-Interaktionen könnten einen weiteren Mechanismus zur reziproken Aktivierung von T-Zellen

und dem sinusoidalen Endothel darstellen. Im Rahmen dieser Dissertationsarbeit wurde u.a. die Hypothese überprüft, dass feste Adhäsion zwischen Thrombozyten und T-Zellen über P-Selektin auf Thrombozyten und PSGL-1 auf T-Zellen mediiert wird.

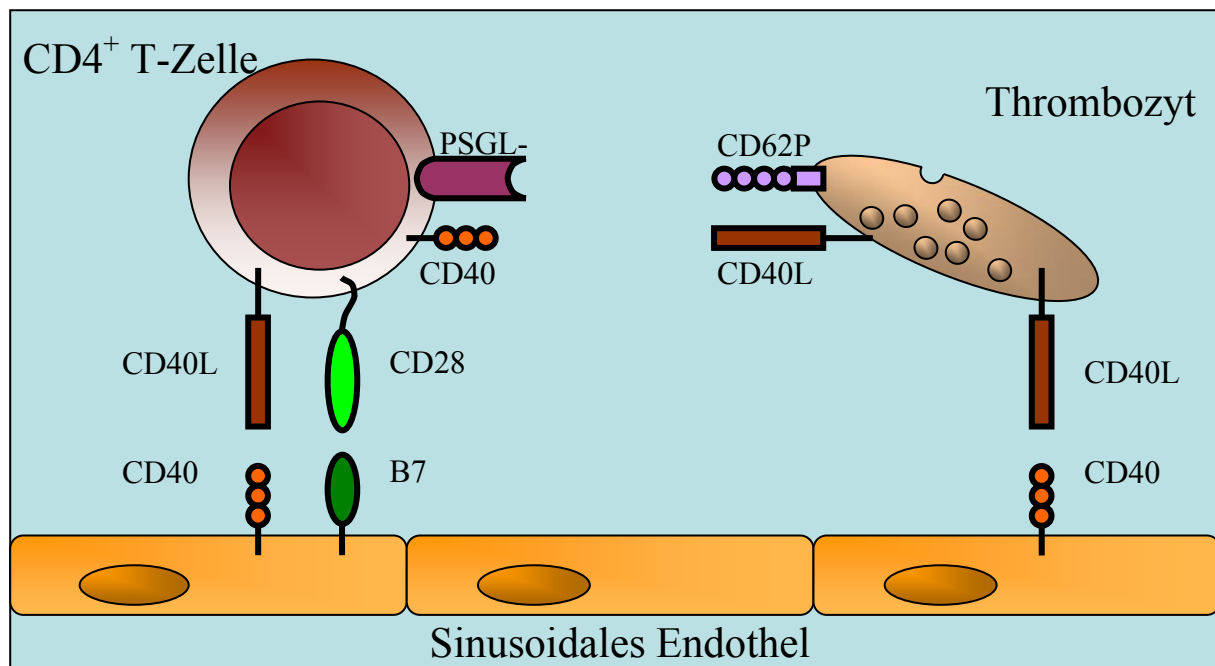


Abb. 3: Repertoire an Interaktionsmöglichkeiten über kostimulatorische Moleküle zwischen T-Zellen, Thrombozyten und dem sinusoidalen Endothel. Erläuterungen im Text.

1.3.5. Potentielle Interaktion von T-Zellen und Kupffer-Zellen während hepatischer Ischämie-Reperfusion

In der Literatur gibt es zahlreiche Belege einer Beteiligung von Kupffer-Zellen an der Ausbildung des I/R-Schadens der Leber. Kupffer-Zellen stellen die residenten Makrophagen der Leber dar und werden während I/R aktiviert^{14, 51}. Sie setzen im Rahmen von I/R Sauerstoffradikale und proinflammatorische Mediatoren wie TNF- α , IL-6 und IL-1 frei^{23, 51, 53, 123}. Die Relevanz der Beteiligung am hepatischen I/R-Schaden von Kupffer-Zellen, die sich innerhalb der Sinusoide mit einer Geschwindigkeit von 2 μ m/min fortbewegen können⁷⁹, wird anhand folgender Studien deutlich: Es konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition der Phagozytoseaktivität von Kupffer-Zellen mit Methylpalmitat die Überlebenszeit von Ratten bei orthotoper Lebertransplantation mehr als dreifach verlängert⁸⁰. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass I/R zu einer Ausschüttung proinflammatorischer Mediatoren durch Kupffer-Zellen führt. Die Serum-Spiegel von TNF- α , IL-1 und IL-6 steigen nach I/R um +482%, +33% und 175%, respektive¹³². Hinzukommend fördern durch Kupffer-Zellen ausgeschüttete Sauerstoffradikale die Ausbildung des hepatischen I/R-Schadens⁷.

Wir formulierten die Hypothese, dass Kupffer-Zellen und Lymphozyten während hepatischer I/R miteinander interagieren und an der Ausbildung des postschämischen Schadens beteiligt sind. Eine Interaktion zwischen Kupffer-Zellen und Lymphozyten während der I/R der Leber wird bereits in zahlreichen Studien vermutet^{50, 74, 139}. Es fehlten jedoch bisher experimentelle Daten, die eine Interaktion zwischen beiden Zellarten belegen und somit die Hypothesen unterstützen. In einem *in vivo* Ansatz experimenteller Untersuchungen zeigen wir erstmals eine direkte Interaktion zwischen T-Zellen und Kupffer-Zellen während hepatischer I/R.

1.4. Potentielle Mechanismen der Antigen-unabhängigen Aktivierung von CD4+ T-Zellen

Das klassische Konzept der T-Zell-Aktivierung beruht auf einer Stimulation durch antigenpräsentierende Zellen (APC) mittels zweier Signale^{29, 30}: Die Verbindung zwischen dem T-Zell-Rezeptor und Antigen-beladenen MHC Klasse II-Molekülen benötigt kostimulatorische Signale über CD28 und CD40L, um eine vollständige Aktivierung von T-Zellen herbeizuführen. Dieses Dogma der T-Zell-Aktivierung hat Einzug in gängige Immunologie-Lehrbücher gehalten und ist in folgendem Schaubild verdeutlicht.

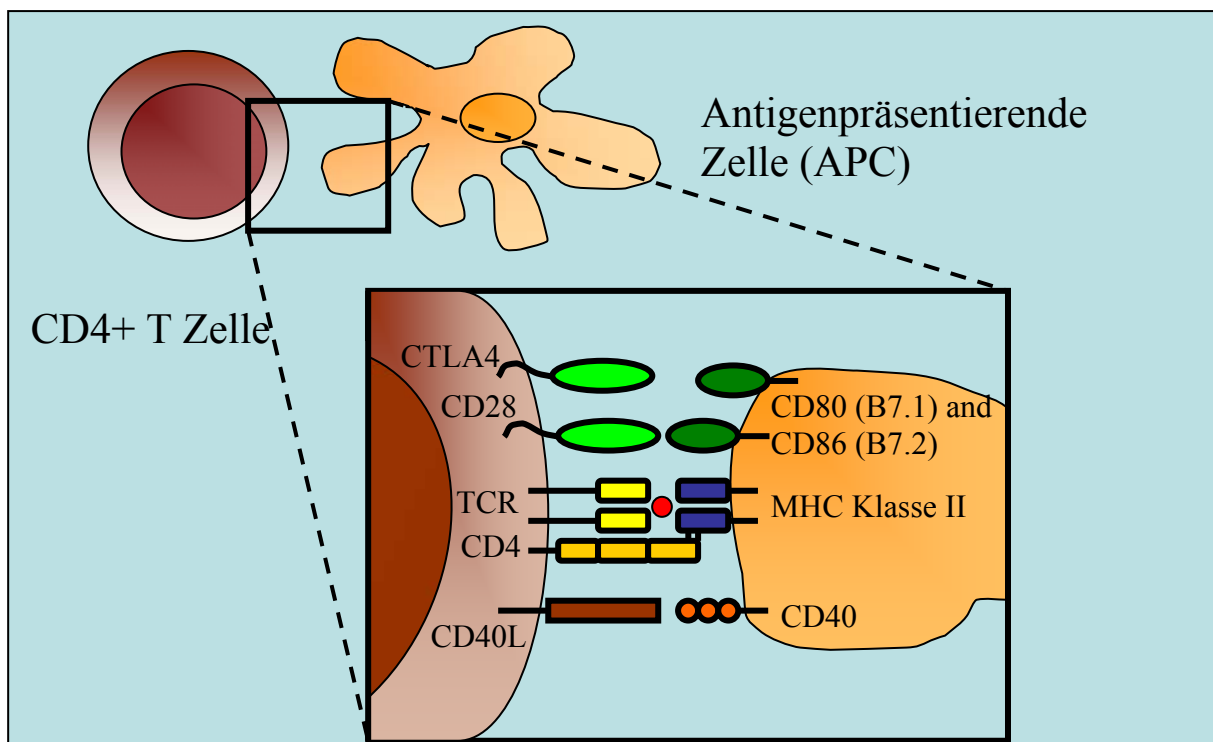


Abb. 4: Kostimulation von T-Zellen, modifiziert nach Bugeon und Dallman¹⁰. Erläuterungen im Text.

Die Mechanismen einer T-Zell-Beteiligung im Rahmen des hepatischen I/R-Schaden sind jedoch noch nicht vollständig verstanden. Nach Definition stellt der I/R-Schaden ein Alloantigen-unabhängiges Ereignis dar. Es ist unter Berücksichtigung von oben genanntem unklar, über welche Mechanismen T-Zellen antigen-unabhängig während hepatischer I/R aktiviert werden. Aktuelle Studien vermögen Erklärungsansätze zu bieten: Es gibt Hinweise darauf, dass das o.g. Dogma der T-Zell-Aktivierung in Frage gestellt werden muss. Riley und Mitarbeiter konnten zeigen, dass eine Änderung der Regulation T-Zell-Rezeptor-induzierter Gene unabhängig von einer T-Zell-Rezeptor-MHC II Interaktion auftreten kann ¹⁰³. Im *Journal of Immunology* wurde im Jahr 2000 berichtet, dass CD40-CD40L-Interaktionen zu einer veränderten Expression von Kostimulations- und Adhäsionsmolekülen auf antigen-präsentierenden Zellen führen, während Interaktionen über CD28 vorwiegend aktivierend auf T-Zellen wirken ³⁵. Diese gegenseitige Beeinflussung der Aktivität war, so konnte gezeigt werden, ohne das Vorhandensein eines Antigens möglich.

Die aufgeführten Erkenntnisse sind von Bedeutung im Kontext einer CD4+ T-Zell-Beteiligung am mikrovaskulären hepatischen I/R-Schaden, da gezeigt werden konnte, dass sinusoidale Endothelzellen der Leber alle Charakteristika von antigenpräsentierenden Zellen aufweisen, wie z.B. MHC Klasse II-Moleküle, B7 und CD40 Moleküle ⁷⁸.

Die Klärung der Mechanismen einer Antigen-unabhängigen Aktivierung von CD4+ T-Zellen ging in dieser Studie über die Untersuchung der o.g. kostimulatorischen Mechanismen hinaus. Hypothetisch und in der Literatur anhand zahlreicher Hinweise belegt sind weitere Aktivierungsmechanismen von T-Zellen, unabhängig von kostimulatorischer Ligandenbindung, möglich. In der Arbeitsgruppe um Granger wurde beschrieben, dass Sauerstoffradikale NF-κB-Signalwege in T-Zellen aktivieren können ⁶⁶. Darüber hinaus wurde berichtet, dass IL-6 und RANTES T-Zellen in der Abwesenheit von Antigenen aktivieren können ^{3, 54}. In einer aktuellen immunhistologischen Studie wird hinzukommend davon ausgegangen, dass Chemokine wie z.B. CXCL 9, 10 und 11 direkt an der Aktivierung und Beeinflussung der Funktion von CD4+ T-Zellen während I/R beteiligt sind ¹³⁸.

Um die Mechanismen einer Antigen-unabhängigen Aktivierung von CD4+ T-Zellen während hepatischer I/R zu untersuchen, wurde zum einen erstmals der Einfluss kostimulatorischer Aktivierungswege von CD4+ T-Zellen auf den hepatischen I/R-Schaden untersucht, zum anderen wurde der Einfluss proinflammatorischer Moleküle auf die Aktivität von T-Zellen in diesem Setting untersucht.

2. ZIELSETZUNG

Es wurden daher folgende Ziele für diese Dissertationsarbeit formuliert:

- 1) Analyse der Rekrutierung von T-Zell-Subpopulationen in den postischämischen hepatischen Mikrogefäßen *in vivo* mit Fokus auf den Typ, die mikrovaskuläre Lokalisation und die Kinetik von T-Zell-Endothelzell-Interaktionen
- 2) Charakterisierung der einer Interaktion von CD4⁺ T-Zellen mit Thrombozyten in der postischämischen hepatischen Mikrozirkulation zugrundeliegenden Mechanismen
- 3) Untersuchung der Beteiligung von CD4⁺ T-Zellen an der Ausbildung des mikrovaskulären hepatischen I/R-Schadens
- 4) Analyse der pathophysiologischen Rolle von MHC-Klasse II-Molekülen auf sinusoidalen Endothelzellen bei T-Zell-vermittelten Effekten während I/R
- 5) Untersuchung der Interaktion von Kupffer-Zellen mit CD4⁺ T-Zellen während hepatischer I/R unter dem Aspekt einer potentiellen reziproken Aktivierung

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Modell

3.1.1. Vorbemerkungen

Alle im Folgenden beschriebenen Untersuchungen wurden in der Zeit von Juli 2003 bis Mai 2005 mit Genehmigung der zuständigen Behörde der Regierung von Oberbayern (AZ: 116-03) am Institut für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt.

3.1.2. Versuchstiere

Weibliche Wildtyp-, CD4^{-/-}, CD40L^{-/-} und CD28^{-/-} C57Bl/6 Mäuse (alle Charles River, Sulzfeld, Deutschland) mit einem Körpergewicht von 20-25 g dienten als Versuchstiere. P-Selektin-defiziente Tiere wurden aus eigener Zucht des Institutes für Chirurgische Forschung bezogen, ursprünglich generiert von Prof. Beaudet, Houston, Texas, USA. Unter kontrolliertem 12h-Tag-/Nachtzyklus hatten die Mäuse Zugang zu Wasser und Standardfutter (ssniff Spezialdiäten, Soest, Deutschland) *ad libitum*.

3.1.3. Narkose

3.1.3.1. Atmung

Zur Einleitung der Narkose wurde ein Gemisch aus Isofluran (Forene®, Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland) in einer Konzentration von 5 Vol% und Lachgas (N₂O) bei einer FiO₂ von 0,35 verwendet. Für den weiteren Versuchsablauf wurde eine Isofluran-konzentration von 1,5 Vol.% aufrechterhalten. Dieses Protokoll galt sowohl für die Versuchstiere, als auch für Spendertiere, die zur Separation von T Zellen oder Thrombozyten herangezogen wurden.

3.1.3.2. Lagerung und Makrohämodynamik

In Narkose liegende Tiere wurden auf einer Heizplatte fixiert (Referenztemperatur 37°C), die Körpertemperatur wurde mittels einer rektalen Temperatursonde kontrolliert.

Die linke *Arteria carotis* wurde unter Verwendung eines Operationsmikroskops (Leitz, Wetzlar, Deutschland) mit einem Polypropylenkatheter (Innendurchmesser 0,28mm, Portex, Lythe, Großbritannien) kanüliert. Über diesen Katheter war, erstens, die kontinuierliche

Überwachung des mittleren arteriellen Druckes (MAP) möglich. Mit Hilfe eines Druckaufnehmers (Statham Transducer Typ P 23 ID, Statham Instruments Inc., Oxnard, USA) und eines Elektromanometers (Press. Ampl. 863E154E, Siemens Medizinische Technik, München, Deutschland) wurde der MAP in mmHg gemessen. Zweitens konnte über den Katheter eine kontinuierliche Volumensubstitution mittels NaCl 0,9% (0,2ml/h; Perfusor V, B. Braun, München, Deutschland) erfolgen. Drittens erfolgte über den implantierten Katheter die intraarterielle Applikation von fluoreszenzmarkierten T-Zellen, Thrombozyten bzw. Fluoreszenzmarkern.

3.1.4. Chirurgische Technik

3.1.4.1. Reversible partielle Ischämie der Leber

Im Anschluss an die Insertion des arteriellen Katheters in die *A. carotis* wurde eine mediane Laparotomie durchgeführt. Mittels eines Gefäßclips wurde eine reversible warme Ischämie des linken Leberlappens durch Abklemmen des zuführenden Gefäß-Nerven-Bündels herbeigeführt⁵. Nach Ischämieinduktion wurde die Bauchhöhle mittels 5-0 Polyesterfäden bei liegendem Clip verschlossen. Während der Ischämie wurden die Körperkerntemperatur und der MAP protokolliert.

3.1.4.2. Reperfusion

Der die Blutzufuhr abklemmende Microclip wurde nach 90 Minuten Ischämie durch Wiedereröffnung der Bauchhöhle entfernt. Zur intravitalen Videofluoreszenzmikroskopie wurde der reperfundierte linke Leberlappen ausgelagert, um die hepatische Mikrozirkulation jeweils nach 30 oder 120 Minuten zu visualisieren und um eine quantitative Analyse zu machen. Auf der Auslagerungsvorrichtung war der Leberlappen unter einer kontinuierlichen Superfusion, um eine Austrocknung zu verhindern.

3.1.5. Kontrolltiere

Kontrolltiere (sham-operierte Tiere) unterliefen das gleiche oben beschriebene Protokoll mit Katheterinsertion in die *A. carotis* und medianer Laparotomie. Im Gegensatz zu den Versuchsgruppen fand bei sham-operierten Tieren lediglich ein kurzfristiges Abklemmen (ca. 3 Sekunden) des Gefäß-Nerven-Bündels des linken Leberlappens statt. Im Anschluss an die Reperusionszeit fand auch bei Kontrolltieren eine Analyse der hepatischen Mikrozirkulation mittels intravitaler Videofluoreszenzmikroskopie statt.

3.1.6. Positive Separation von T-Zellen

3.1.6.1. MACS[®] Technik (Magnetic Associated Cell Sorting)

Zur Visualisierung von T-Zell-Endothelzell-Interaktionen wurden CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen aus Milzen syngener Spendertiere durch magnetische Zellsortierung mittels eines MiniMACS[™] Separators (Magnet und Separationssäulen) und CD4- bzw. CD8-Microbeads (Miltenyi Biotec GmbH) isoliert. Die Sortierung von Zellen mit dem MACS-Separatorkit erfolgte nach den Protokollen des Herstellers in einem Positivseparationsverfahren.

Es werden zwei Prinzipien der Zellseparation unterschieden: die Positiv- und die Negativseparation. Beiden Prinzipien ist gemeinsam, dass sie mit Antikörpern arbeiten, die gegen bestimmte Oberflächenantigene von Zellen gerichtet sind. Die verwendeten Antikörper sind an magnetische Partikel, auch als Microbeads bezeichnet, gekoppelt ⁸⁸. Im Falle der Positivseparation ist der Antikörper gegen die zu isolierende Zellart gerichtet, während bei der Negativseparation Antikörper eingesetzt werden, die nicht erwünschte Zellarten aus einer Zellsuspension entfernen.

Das Protokoll der Zellseparation gestaltete sich wie folgt. In einem ersten Schritt der Positivseparation wurden die aus der Milz gewonnenen PBS-Zellsuspensionen mit dem Microbead-assoziierten CD4-Antikörper bzw. CD8-Antikörper über 20 Minuten bei einer Temperatur von 4°C inkubiert (Antikörper siehe Tabelle 1).

Tab. 1: Verwendete Antikörper zur MACS-Separation

CD4 (L3T4)	Monoklonal IgG _{2b}	Ratte anti-Maus	MicroBeads konjugiert	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
CD8a (Ly-2)	Monoklonal IgG _{2a}	Ratte anti-Maus	MicroBeads konjugiert	

Die MACS-Säulen wurden mit PBS Puffer (PAN Systems GmbH) equilibriert, daraufhin wurden die mit dem gleichen Puffer gewaschenen Zellen auf die Säulen gegeben. Nachdem die Suspension die mit Stahlwolle gefüllte Säule unter dem Einfluss eines Magnetfeldes durchlaufen hat und dadurch die Microbead-assoziierten Zellen zurückgehalten wurden, wurde die Säule in einem zweiten Schritt außerhalb des Magnetfeldes mit PBS eluiert. (Abb. 5) Die Anzahl gewonnener T-Zellen wurde in jeder Probe mit Hilfe eines Coulter-Counters (Coulter[®] AC-T Serie; Coulter Corporation, Miami, USA) bestimmt, anschließend wurden diese mit 10µM Carboxyfluoreszein-Diazetat-Succinimidyl-Ester (CFDA-SE; Molecular

Probes Inc., Eugene, OR) über 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Pro Versuch wurden 1×10^7 CFDA-SE markierte CD4+ T-Zellen bzw. $0,7 \times 10^7$ CFDA-SE markierte CD8+ T-Zellen i.a. appliziert.

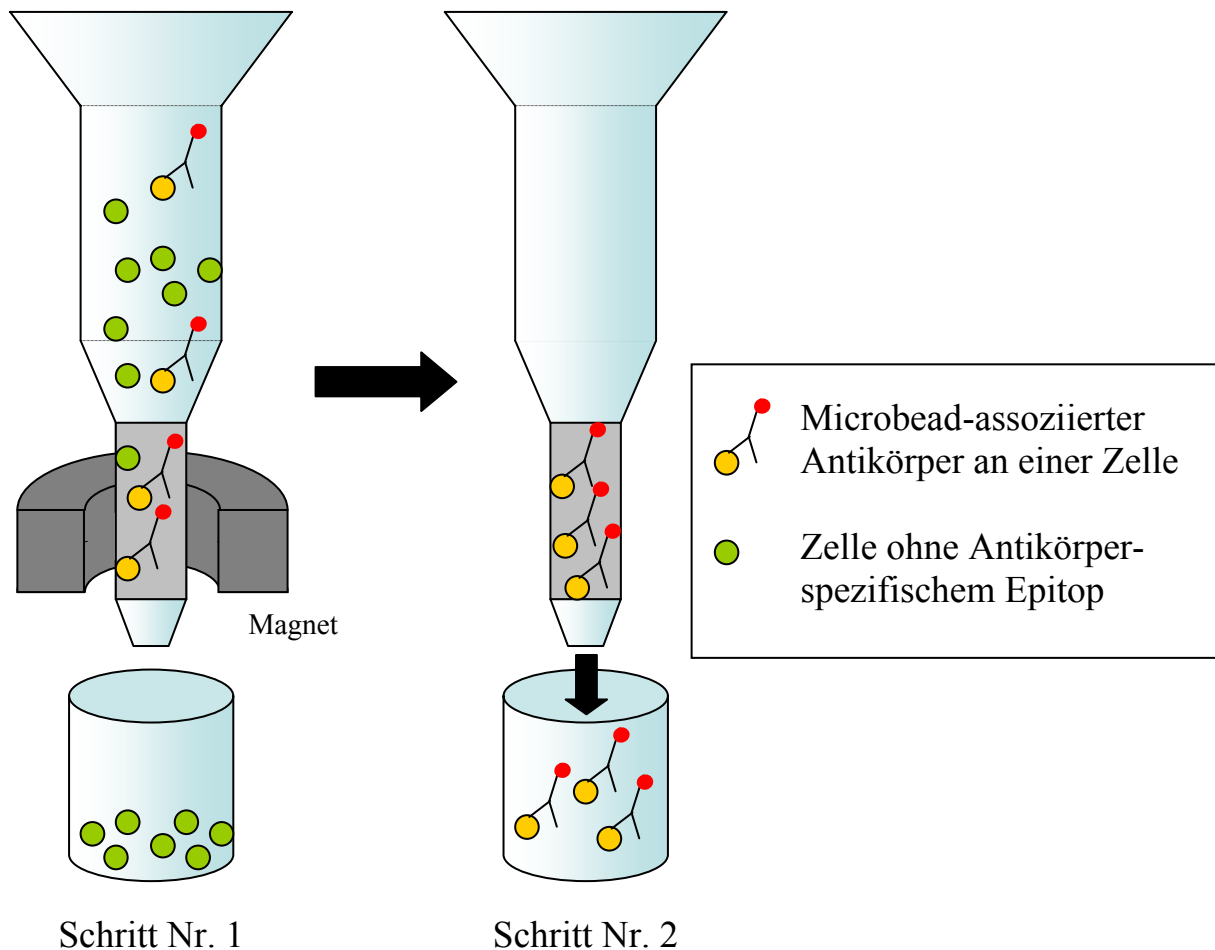


Abb. 5: Positivseparation mit Hilfe von Microbead-assoziierten Antikörpern

3.1.6.2. Aktivitätsmessung von T Zellen nach positiver Separation

In der Literatur belegen zahlreiche Hinweise, dass MACS™ Microbeads biodegradierbar sind und *in vivo* abgebaut werden. Hinzukommend findet keine Aktivierung der isolierten Zellen durch die Antikörper statt. Die isolierten Zellen sind bezüglich Funktion durch den Isolierprozess nicht eingeschränkt und können direkt verwendet werden^{88, 92, 95}. Mit dem Ziel diese Aussagen zu validieren und gleichzeitig zu untersuchen, welcher Reinheitsgrad an CD4+ bzw. CD8+ T-Zellen durch die Positivseparation erreicht wurde, wurden mit Hilfe der Durchflusszytometrie eigene Untersuchungen durchgeführt.

Die Durchflusszytometrie (FACS-Analyse) erlaubt die Analyse einzelner Zellen unter standardisierten Bedingungen. Morphologische und immunologische Eigenschaften von

heterogenen Zellproben können mittels Photodetektoren für Streulicht und Fluoreszenz untersucht werden. Photodetektoren für das Streulicht sind in einer orthogonalen Geometrie angeordnet: vorwärts gestreutes Licht (*forward light scatter*, FSC) erlaubt Aussagen über Zellgröße und Zellaggregation, während seitwärts gestreutes Licht (*side light scatter*, SSC) Aussagen über Granularität, Dichte und Oberflächenbeschaffenheit der Zellen erlaubt ¹¹³. Drei weitere Photodetektoren zur Bestimmung der Fluoreszenzintensität sind ebenfalls orthogonal zum die Zellen enthaltenen Flüssigkeitsstrahl angeordnet und erlauben die quantitative Bestimmung gebundener fluoreszenzmarkierter Antikörper.

Um den Aktivitätsstatus der isolierten Zellen zu überprüfen, wurden zum einen durch MACSTM Microbeads separierte und zum anderen CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen in Vollblutproben untersucht (n=3). Im Rahmen einer Fluoreszenzdoppelmarkierung wurden die Aktivitätsparameter CD62L, CD44 und CD69 ⁴⁴ mit Hilfe von FITC-konjugierten Antikörpern dargestellt, während CD4- und CD8-Epitope auf den T-Zellen mittels PE-konjugierter Antikörper dargestellt wurden (Antikörper siehe Tabelle 2).

Tab. 2: Verwendete Antikörper zur FACS-Analyse

CD4 (L3T4)	Monoklonal IgG _{2a}	Ratte anti-Maus	R-PE-konjugiert (490/580 nm)	Alle Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
CD8b.2 (Ly-3.2)	Monoklonal IgG ₁	Ratte anti-Maus	R-PE-konjugiert (490/580 nm)	
CD62L (L- Selectin, LECAM- 1, Ly-22)	Monoklonal IgG _{2a}	Ratte anti-Maus	FITC-konjugiert (488/520 nm)	
CD44 (Pgp-1, Ly- 24)	Monoklonal IgG _{2b}	Ratte anti-Maus	FITC-konjugiert (488/520 nm)	
CD69 (Very Early Activation Antigen)	Monoklonal IgG ₁	Hamster anti- Maus	FITC-konjugiert (488/520 nm)	

3.1.6.3. Vitalitätsmessung von T-Zellen nach positiver Separation

Als Marker für die Vitalität von T Zellen gilt die Integrität der Zellmembran. Diese kann mit Hilfe von Propidiumiodid untersucht werden. Zellen, die Propidiumiodid aufnehmen, können als nicht vital angesehen werden ¹¹³. Untersuchungen der Vitalität wurden an CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen nach positiver Separation durchgeführt (n=3).

3.1.7. Thrombozytenseparation

Die Untersuchung von Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen bedurfte der Separation und Rhodamin 6G-Markierung von Thrombozyten⁸¹. Aus syngeneten Spendertieren wurde in Narkose durch kardiale Punktion Vollblut entnommen und in Polypropylen-Röhrchen gesammelt. Je 1 ml Vollblut wurde in 200 µl Alsevers Puffer (38 mM Zitronen-Säure, 75 mM Trisodium citrat/100 nM Dextrose), 15 µl PGE₁ (Serva, Heidelberg, Deutschland) und 500 µl PBS aufgenommen. Die Thrombozyten wurden *in vitro* mit 50 µl 0,05% Rhodamin 6G (Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) pro ml Vollblut fluorochromiert. Nach 10 Minuten Zentrifugation bei 250 x g wurde das demarkierte thrombozytenreiche Plasma in 1000µl PBS und 200µl Alsevers-Puffer aufgenommen und bei 2000 x g erneut über 10 Minuten zentrifugiert. Das resultierende Thrombozyten-Pellet wurde in 0,1 ml D-PBS (PAN Systems GmbH) resuspendiert. Nach jeder Thrombozytenseparation wurde die Anzahl der Thrombozyten mit Hilfe eines Coulter-Counters (Coulter® AC-T Serie; Coulter Corporation, Miami, USA) bestimmt. Den Versuchsmäusen wurden 100 x 10⁶ mit Rhodamin 6G markierte Thrombozyten i.a. appliziert. Bei einer physiologischen Thrombozytenzahl von ca. 600 x 10³ pro µl Vollblut (Blutvolumen der Maus ca. 5,85 ml/100g) entspricht dies einem Anteil markierter Thrombozyten an der Gesamtpopulation zirkulierender Thrombozyten von ca. 10-20%.

3.1.8. Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

3.1.8.1. Technischer Aufbau

In Epi-Illuminationstechnik an einem Leitz Orthoplan Mikroskop mit einer Ploemo-Pak-Lichtquelle (Leitz, Wetzlar, Deutschland) und einer 100 Watt Quecksilberlampe (HBP; Osram GmbH, München, Deutschland) wurde der ausgelagerte linke Leberlappen untersucht. Die Verwendung zweier Filterblöcke ermöglichte die Darstellung unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoffe. Das Umschalten zwischen dem Filterblock I_{2/3} (Anregung 450-490 nm; Emission: 525 nm, Leitz) und dem Filterblock N2 (Anregung 530-560 nm; Emission: 580 nm, Leitz) ermöglichte die Visualisierung von CFDA-SE-markierten T-Zellen und Rhodamin-6G-markierten Thrombozyten in identischen Arealen der hepatischen Mikrozirkulation. Mit einem 25x Wasserimmersionsobjektiv (W 25x/0.6; Leitz) wurde unter Verwendung einer *charge-coupled device* (CCD)-Videokamera (FK 6990, Cohu, Prospektive Measurements, San Diego, USA) auf dem Bildschirm (Diagonale: 33cm; Sony, München, Deutschland) eine

500-fache Vergrößerung erreicht. Ein Videozeitgenerator (VTG-33, For-A-Company, Tokyo, Japan) blendete Datum und Uhrzeit in das Videosignal ein, welches mit einer Videoanlage (S-VHS Panasonic AG 7330, Matsushita Electric, Tokyo, Japan) aufgezeichnet wurde (Abb. 6). Die Aufzeichnung ermöglichte eine spätere *off-line* Videoanalyse der hepatischen Mikrozirkulation an einer computergestützten Auswerteeinheit (CAP IMAGE, Dr. Zeintl, Heidelberg, Deutschland) ¹³⁷.

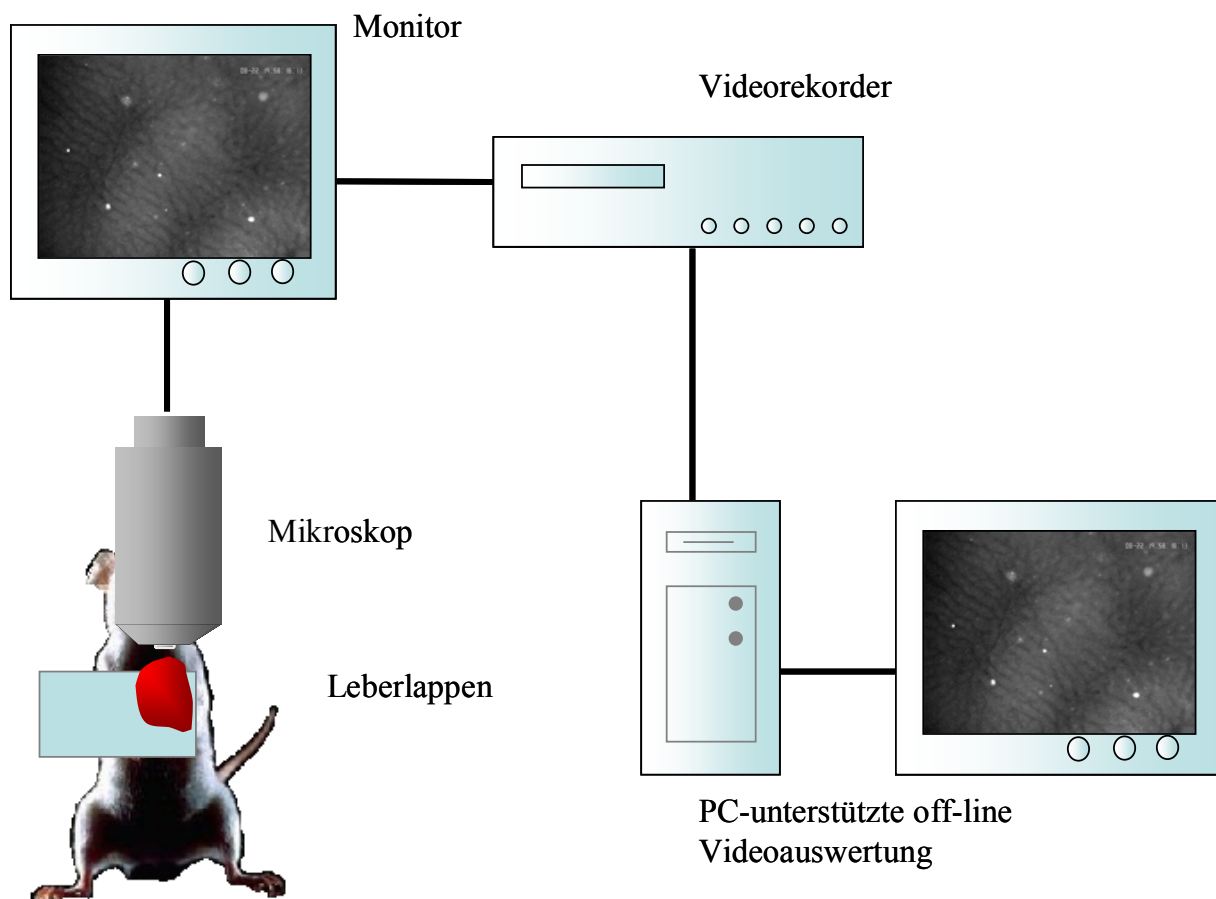


Abb. 6: Schematische Darstellung des Arbeitsplatzes der intravitalmikroskopischen Untersuchungen. Nach chirurgischer Präparation wurde am ausgelagerten linken Leberlappen die hepatische Mikrozirkulation mittels Kamera dargestellt und aufgezeichnet. Dies ermöglichte eine PC-unterstützte *off-line* Videoauswertung.

3.1.8.2. T-Zell-Endothelzell-Interaktion

Interaktionen zwischen CFDA-SE markierten T-Zellen und Endothelzellen in der postischämischen hepatischen Mikrozirkulation wurden in Sinusoiden und postsinusoidalen Venolen unter Verwendung des I_{2/3}-Filterblocks analysiert.

In Sinusoiden wurde die T-Zell-Endothelzell-Interaktion als Anzahl akkumulierter bzw. transmigrierter T-Zellen pro Azinus quantifiziert. Es wurden pro Versuch 10 Azini untersucht.

In 7-10 postsinusoidalen Venolen pro Versuch wurden rollende und adhärenente T-Zellen mittels computergestützter *off-line* Videoauswertung quantifiziert. In einem definierten Gefäßsegment von 100 µm Länge galten die T-Zellen als *Roller*, welche eine imaginäre orthogonale Hilfslinie in der Mitte dieses Gefäßsegmentes mit einer signifikant geringeren Geschwindigkeit passierten als T-Zellen im Zentralstrom. Die Ergebnisse sind in der Dimension Anzahl der Zellen pro Sekunde pro Millimeter Durchmesser der Gefäße angegeben. Adhärenente T-Zellen wurden definiert als Zellen, die länger als 20 Sekunden ohne Positionsänderung am Endothel anhafteten. Über den Gefäßdurchmesser und die Länge des definierten Gefäßsegmentes konnte unter Annahme einer zylindrischen Geometrie des Gefäßabschnittes die Endotheloberfläche berechnet werden ⁵, so dass die quantitative Auswertung adhärenenter T-Zellen als Zahl der Zellen pro Quadratmillimeter Endotheloberfläche angegeben ist.

3.1.8.3. Emigration von T-Zellen

Zur Quantifizierung von Emigrationsvorgängen wurde in der *off-line* Videoauswertung nach extravasierten Zellen gesucht. Extravasierte Zellen haben die Sinusoide verlassen und finden sich im perivaskulären Raum wieder. Extravasation liegt vor, wenn sich eine fluoreszenzmarkierte T-Zelle in einer Fokusebene mit den benachbarten Sinusoiden scharf darstellen lässt. (Abb. 7) Die quantitative Auswertung emigrierter T-Zellen ist als Zahl der Zellen pro Azinus angegeben.

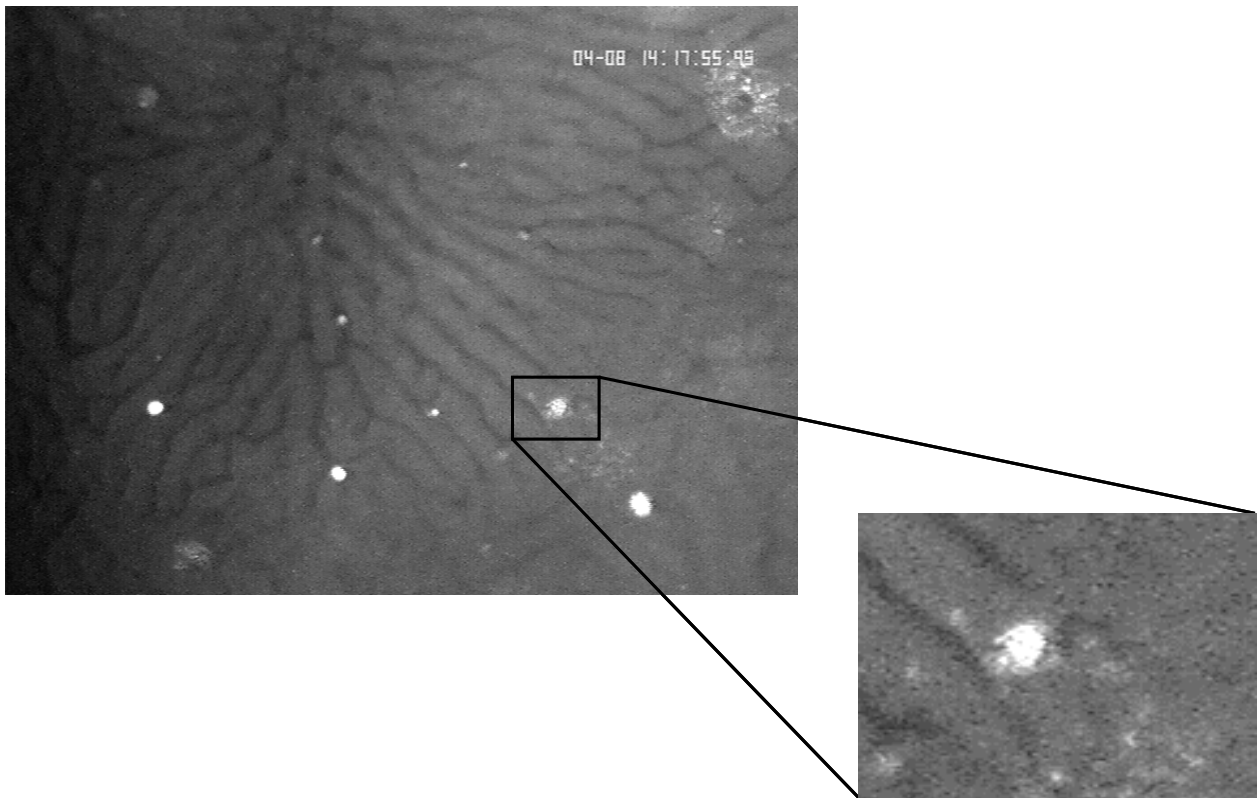


Abb. 7: Emigration von T-Zellen mit vergrößertem Bildausschnitt. Bildausschnitt mit Akkumulation von CD4⁺ T-Zellen in der hepatischen Mikrozirkulation nach 30 min Reperfusion. Adhärenzte CD4⁺ T-Zellen sind deutlich sichtbar innerhalb der Sinusoide. Im vergrößerten Bildausschnitt zeigt sich eine extravasierte CD4⁺ T-Zelle. Die Zelle befindet sich im perivaskulären Raum, die angrenzenden Sinusoide sind klar dargestellt.

3.1.8.4. Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion

Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen wurden unter Verwendung des N₂-Filterblocks in 10 Sinusoiden und 7-10 postsinusoidalen Venolen pro Versuch untersucht. Analog der Analyse von T-Zell-Endothelzell-Interaktionen (siehe 3.1.8.2.) wurden oben genannte Kriterien bei der computergestützten *off-line* Videoanalyse angewandt.

3.1.8.5. Kolokalisation von T-Zellen und Thrombozyten

Kolokalisationsereignisse zwischen CD4⁺ T-Zellen und Thrombozyten in Sinusoiden wurden nach 90 Minuten Ischämie gefolgt von 30 Minuten Reperfusion untersucht. Nach Applikation von CFDA-SE markierten CD4⁺ T-Zellen wurden anschließend Rhodamin-markierte Thrombozyten appliziert. Durch Wechsel der Filter am Fluoreszenzmikroskop konnten sowohl T-Zellen (I_{2/3}-Filterblock) als auch Thrombozyten (N₂-Filterblocks) in identischen Arealen visualisiert werden. Kolokalisationsuntersuchungen fanden in Azini statt, die mindestens zwei akkumulierte T-Zellen aufwiesen. Während der *off-line frame by frame*

Videoanalyse wurden Bilder der Akkumulation von T-Zellen mit Bildern der Thrombozytenakkumulation überlagert. Eine direkte Nachbarschaft von CFDA-SE markierten CD4⁺ T-Zellen mit Rhodamin-markierten Thrombozyten in Sinusoiden bestätigte das Vorliegen einer Kolo-kalisation. Die quantitative Auswertung erfolgte durch Berechnung des Anteils kolo-kalisierter CD4⁺ T-Zellen an der Gesamtzahl akkumulierter CD4⁺ T-Zellen in einem Azinus [%].

3.1.8.6. Sinusoidale Perfusion

Nach Applikation des Plasmamarkers FITC-Dextran konnte die sinusoidale Perfusion anhand der Plasmakontrastierung in 7-10 Azini analysiert werden. Innerhalb eines Azinus wurde die Anzahl nichtperfundierter Sinusoide in Relation zur Anzahl aller sichtbarer Sinusoide gesetzt um somit das sinusoidale Perfusionsdefizit zu ermitteln (Angabe in Prozent) ⁶⁷.

3.1.8.7. Leukozyten-Endothelzell-Interaktion

Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen wurden unter Verwendung des N₂-Filterblocks in 7-10 postsinusoidalen Venolen pro Versuch untersucht. Analog der Analyse von T-Zell-Endothelzell-Interaktionen (siehe 3.1.8.2.) wurden oben genannte Kriterien bei der computergestützten *off-line* Videoanalyse angewandt.

3.1.8.8. Phagozytoseaktivität von Kupffer-Zellen

Intravitalmikroskopisch lässt sich die Phagozytoseaktivität von Kupffer-Zellen unter Verwendung von fluoreszenzmarkierten Latex-Beads (Fluoresbrite™ Carboxylate YG 1.0 micron Microspheres, Diameter 0.925µm; Polysciences Inc., Warrington, PA; 3x10⁸ / kg KG) bestimmen. Nach 120 min Reperfusion wurden die Latex-Beads in einem Bolus von 200 µl PBS i.a. appliziert und mittels des I_{2/3}-Filterblocks in der postischämischen hepatischen Mikrozirkulation visualisiert. Weil Latex-Beads der Größe 1 µm überwiegend von Kupffer-Zellen phagozytiert werden, stellt die Kinetik der Clearance von Latex-Beads in der postischämischen Leber ein Maß für die Phagozytoseaktivität der Kupffer-Zellen dar ¹²⁷. Über einen Zeitraum von 5 min wurden 30 randomisiert bestimmte Azini intravitalmikroskopisch bezüglich der Akkumulation von Latex-Beads analysiert. Während der *off-line* Videoanalyse wurde die Kinetik der Latex-Bead-Clearance bestimmt, indem das prozentuale Verhältnis von sich bewegenden Latex-Beads zu der Anzahl adhärenter Latex-Beads gebildet wurde. Ergebnisse sind angegeben als Prozent der sich in Bewegung befindlichen Latex-Beads [%] in

einem Intervall von einer Minute. Dieser Wert ist jeweils gemittelt aus sechs Einzelmessungen (sechs Azini, die jeweils 10 Sekunden lang analysiert wurden).

3.1.9. Plasmaproben und Plasmaparameter

Am Ende jedes Versuches wurde arterielles Blut in heparinisierten Eppendorf Cups gesammelt und zur Plasmagewinnung bei 12000 U/min über 10 min zentrifugiert (Centrifuge 5414, Eppendorf Gerätebau, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Das Plasma wurde abpipettiert und bis zum Zeitpunkt der Messungen bei -80°C eingefroren. Zur Quantifizierung des hepatozellulären Schadens nach I/R wurden die Aktivitäten der hepatischen Transaminasen, Aspartat-Amino-Transferase (AST/GOT) und Alanin-Amino-Transferase (ALT/GPT), bestimmt [IU/l]. Die spektrophotometrischen Analysen wurden im Institut für Klinische Chemie des Klinikums der Universität München entsprechend den Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie durchgeführt. Zur Standardisierung wurden die Ergebnisse der Enzymaktivität auf ein Gesamteiweiß von 4,92 g/dl normiert.

3.1.10 Histologie

3.1.10.1. Probengewinnung

Gewebeproben der Leber wurden am Ende des Versuches entnommen und sofort in 4% Paraformaldehyd (pH 7,5) fixiert. Die Einbettung erfolgte in Paraffin, nach Aushärtung wurden an einem Schlittenmikrotom 4 µm-Schnitte angefertigt.

3.1.10.2. Granulozyten Naphthol AS-D Chlorazetat Esterase-Färbung für Leukozytenemigration

Naphthol AS-D Chlorazetat-Esterase wird zur Färbung von Zellen der Granulopoese verwendet. In Monozyten und Lymphozyten ist die Aktivität dieses Enzyms nur schwach oder nicht vorhanden. Mittels eines Naphthol AS-D Chlorazetat-Esterase Kits (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) wurde in Paraffinschnitten Transmigration von Neutrophilen bestimmt. Nach Entparaffinieren in absteigender Alkoholreihe wurden die Gewebeschnitte bei 37°C über 30 min in Naphthol AS-D Chlorazetat-Lösung lichtgeschützt inkubiert, nach kurzem Spülen wurde mit Hämalaun gegengefärbt. Neutrophile Granulozyten stellen sich unter dieser Färbeprozedur rot granuliert dar. Die Anzahl extravasierter Granulozyten wurde quantitativ erfasst, indem in 10 HPFs (*high power field* = 0,09766 mm² bei einer Mikroskopvergrößerung von x400) Zellen im perivaskulären Raum gezählt wurden.

3.2. Versuchsprotokolle

Entsprechend der unter Punkt 2 definierter Ziele wurden fünf verschiedene experimentelle *in vivo* Protokolle angewendet

- 1) zur Analyse der Rekrutierung von T-Zell-Subpopulationen in der postischämischen Leber,
- 2) zur Untersuchung der Beteiligung von CD4⁺ T-Zellen an der postischämischen Rekrutierung von Thrombozyten und Leukozyten sowie der Ausbildung des mikrovaskulären hepatischen I/R-Schadens,
- 3) zur Analyse der Kolo-kalisation von CD4⁺ T-Zellen und Thrombozyten in der hepatischen Mikrozirkulation,
- 4) mit dem Ziel zu untersuchen, ob die Verbindung zwischen T-Zell-Rezeptor und MHC-Klasse II-Molekülen auf sinusoidalen Endothelzellen bei den T-Zell-vermittelten Effekten während I/R eine Rolle spielt,
- 4) zur systematischen Analyse der Beteiligung von Kupffer-Zellen an der postischämischen Rekrutierung von CD4⁺ T-Zellen und
- 5) zur Darstellung des Einflusses von CD4⁺ T-Zellen auf die Aktivität von Kupffer-Zellen während hepatischer I/R.

3.2.1. Rekrutierung von T-Zell-Subpopulationen in der postischämischen Leber

Wie in der Einleitung bereits erwähnt, gibt es Hinweise auf eine Beteiligung von Lymphozyten am I/R-Schaden der Leber^{21, 139}. Es konnte gezeigt werden, dass vorwiegend CD4⁺ T-Zellen in der postischämischen Leber akkumulieren^{115, 139}. Oben genannten Studien ist jedoch gemeinsam, dass weder Auskunft über die Art und die Kinetik einer T-Zell-Akkumulation in der Leber noch über die mikrovaskuläre Lokalisation akkumulierter Zellen gegeben wird. *In vivo* Untersuchungen zur Klärung dieser Fragen liegen bisher noch nicht vor.

3.2.1.1. Versuchsgruppen

Um diese Fragen *in vivo* zu eruieren, wurden folgende experimentellen Gruppen untersucht. CD4⁺ T-Zellen, isoliert von syngenem Spendertieren, wurden intravitalmikroskopisch nach 90 min Ischämie und 30 bzw. 120 min Reperfusion in der hepatischen Mikrozirkulation von Wildtyp-Mäusen (WT) dargestellt. In einer schein-operierten Gruppe (sham) wurden die intravitalmikroskopischen Untersuchungen nach Durchführung identischer chirurgischer Verfahren, jedoch ohne Induktion einer Ischämie, durchgeführt. Um zu analysieren, ob CD8⁺

T-Zellen während hepatischer I/R rekrutiert werden, wurden Experimente nach Applikation von CD8+ T-Zellen durchgeführt.

Die Gruppengröße der experimentellen Gruppen betrug jeweils 6 Tiere (n=6). Eine Übersicht der Versuchsgruppen gibt Tabelle 3.

Tab. 3: Versuchsgruppen zur Analyse der Rekrutierung von T-Zell-Subpopulationen in der postischämischen Leber (I/R Ischämie-Reperfusion; WT Wildtyp)

Versuchstiere	Applikation von	Gruppengröße
WT I/R	WT CD4+ T-Zellen	n=6
WT sham	WT CD4+ T-Zellen	n=6
WT I/R	WT CD8+ T-Zellen	n=6
WT sham	WT CD8+ T-Zellen	n=6

3.2.1.2. Versuchsablauf

An Wildtyp-Tieren wurde unter Inhalationsanästhesie durch Abklemmen des Gefäß-Nerven-Bündels eine reversible Ischämie des linken Leberlappens für 90 min induziert (Abb. 7). Als Kontrolle wurden schein-operierte Wildtyp-Tiere untersucht. Nach 30 und nach 120 min Reperfusion wurden mittels intravitalmikroskopischer Analyse nach oben bereits beschriebenem Verfahren T-Zell-Endothelzell-Interaktionen in der hepatischen Mikrozirkulation dargestellt. Hierzu wurden nach 25-minütiger Reperfusion CFDA-SE markierte T-Zellen, gewonnen aus syngeneten Spendertieren, i.a. appliziert. In Abhängigkeit von der Versuchsgruppe wurden entweder 1×10^7 CD4+ T-Zellen oder $0,7 \times 10^7$ CD8+ T-Zellen in einem Volumen von 250 μ l injiziert. Am Versuchsende wurden Blut- und Gewebeproben entnommen. Mittels einer Überdosis Pentobarbital wurden die Versuchstiere anschließend euthanasiert.

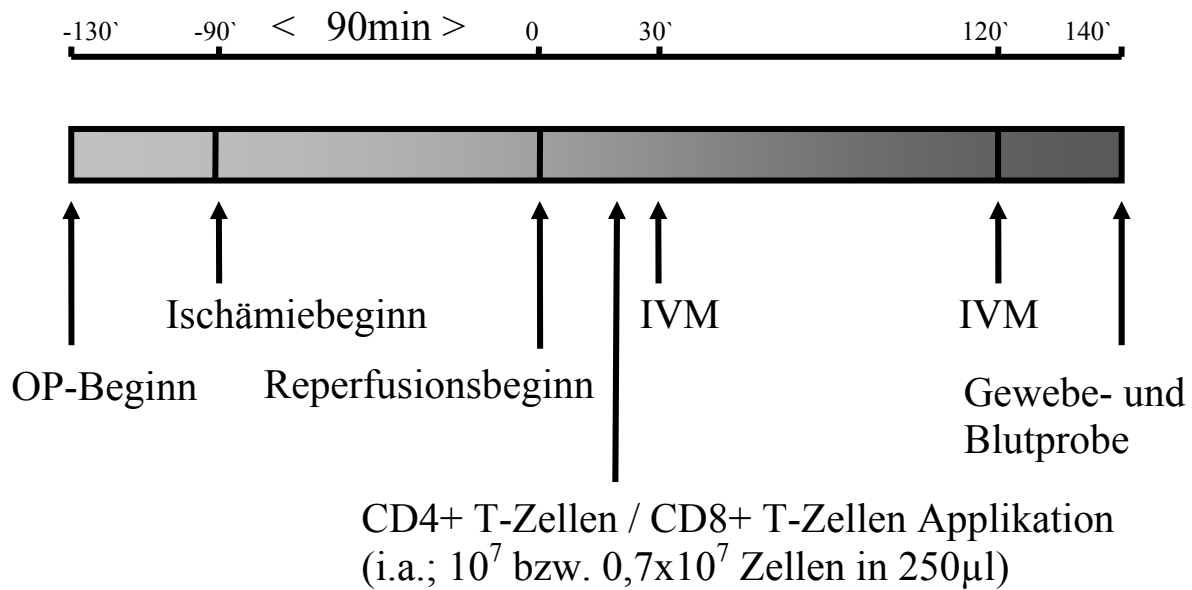


Abb. 7: Experimentelles Protokoll der Analyse der Rekrutierung von T-Zell-Subpopulationen in der postischämischen Leber.

3.2.2. Beteiligung von CD4+ T-Zellen an der postischämischen Rekrutierung von Thrombozyten und Leukozyten sowie an der Ausbildung des mikrovaskulären hepatischen I/R-Schadens

Von der Hypothese ausgehend, dass CD4+ T-Zellen mit Hilfe ihres Repertoires an kostimulatorischen Molekülen, wie z.B. CD28 und CD40L (vgl. Einleitung), sowohl mit Thrombozyten als auch mit dem postischämischen sinusoidalen Endothel interagieren, untersuchten wir in einem dritten Versuchsaufbau, welchen Einfluss CD4+ T-Zellen auf die Ausbildung des hepatischen I/R-Schadens haben. Hierzu wurden Thrombozyten-Endothelzell- und Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen *in vivo* unter Verwendung von Wildtyp-Tieren, CD4-defizienten Tieren sowie Tieren mit einer Defizienz für CD40L und CD28 (WT, CD4^{-/-}, CD40L^{-/-}, CD28^{-/-}) untersucht. Hinzukommend wurde das sinusoidale Perfusionsdefizit als Ausdruck des mikrovaskulären I/R-Schadens mittels Applikation des Plasmamarkers FITC Dextran in den Versuchsgruppen analysiert.

3.2.2.1. Versuchsgruppen

Die Tabelle 4 gibt einen Überblick über die Versuchsgruppen zur Untersuchung der Beteiligung von CD4+ T-Zellen an der postischämischen Rekrutierung von Thrombozyten und Leukozyten sowie an der Ausbildung des mikrovaskulären hepatischen I/R-Schadens.

Tab.4: Versuchsgruppen zur Untersuchung der Beteiligung von CD4+ T-Zellen an der postischämischen Rekrutierung von Thrombozyten und Leukozyten sowie an der Ausbildung des mikrovaskulären hepatischen I/R-Schadens (I/R Ischämie-Reperfusion; WT Wildtyp)

Versuchstiere	Applikation von	Gruppengröße
WT sham	WT Thrombozyten, Rhodamin, FITC Dextran	n=6
WT I/R	WT Thrombozyten, Rhodamin, FITC Dextran	n=6
CD4 ^{-/-} I/R	WT Thrombozyten, Rhodamin, FITC Dextran	n=6
CD40L ^{-/-} I/R	WT Thrombozyten, Rhodamin, FITC Dextran	n=6
CD28 ^{-/-} I/R	WT Thrombozyten, Rhodamin, FITC Dextran	n=6

3.2.2.2. Versuchsablauf

Mit Ausnahme der schein-operierten Versuchsgruppe wurde in den oben aufgeführten Versuchsgruppen an Mäusen eine Ischämie des linken Leberlappens für 90 Minuten induziert (Abb. 8). Nach 30-minütiger Reperfusion wurden fluoreszenzmarkierte Thrombozyten appliziert. Die Thrombozyten wurden von Wildtyp-Spendertieren während der Ischämiedauer der Versuchstiere gewonnen und, wie bereits beschrieben, *in vitro* mit Rhodamin 6G gefärbt. Mittels Intravitalmikroskopie wurden Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen über einen Zeitraum von 10 min analysiert. Im Anschluss daran wurden zur Färbung von Leukozyten 70 µl Rhodamin appliziert. Hierdurch konnte die Interaktion von Leukozyten mit dem Endothel postsinusoidaler Venolen dargestellt werden. Nach quantitativer Analyse dieser Interaktionen wurden in einem weiteren Schritt 70 µl FITC-Dextran appliziert. Ein Wechsel des Filterblocks ermöglichte daraufhin die quantitative Auswertung der sinusoidalen Perfusion. Nach der Durchführung der intravitalmikroskopischen Untersuchungen wurden Blut- und Gewebeproben entnommen und der Versuch durch eine Überdosis Pentobarbital beendet.

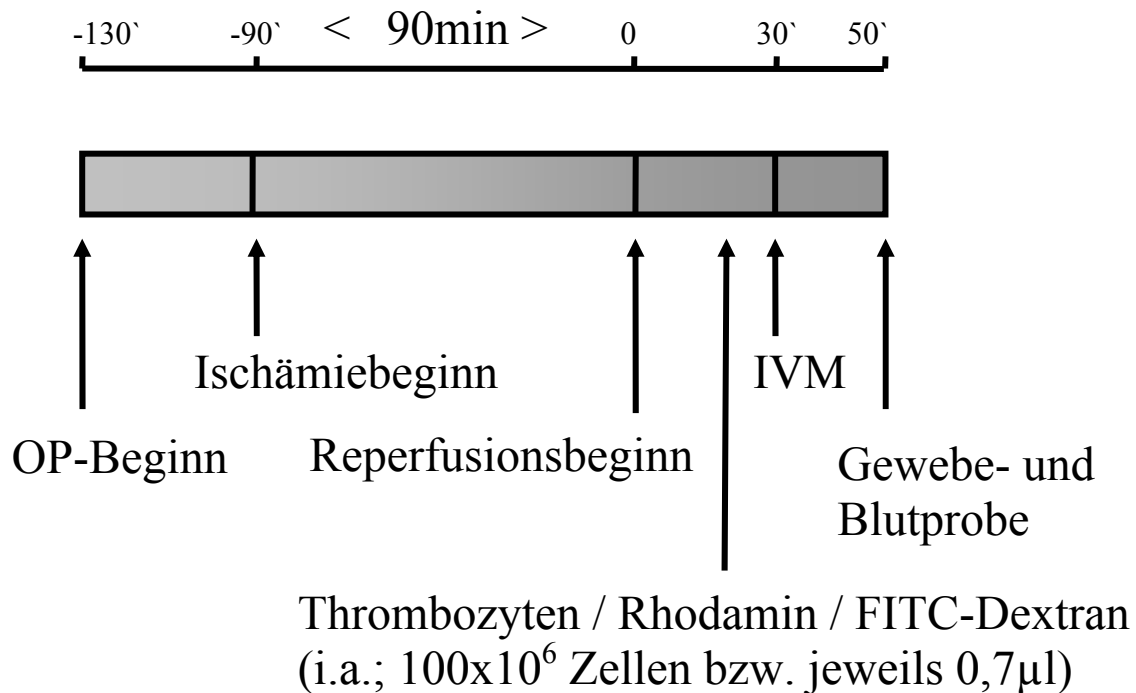


Abb. 9: Experimentelles Protokoll zur Untersuchung der Beteiligung von CD4⁺ T-Zellen an der postischämischen Rekrutierung von Thrombozyten und Leukozyten sowie an der Ausbildung des mikrovaskulären hepatischen I/R-Schadens.

3.2.3. Kolokalisation von CD4⁺ T-Zellen und Thrombozyten in der hepatischen Mikrozirkulation

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, sind Thrombozyten an der Ausbildung des hepatischen I/R-Schadens beteiligt.⁵⁷ Eine kürzlich veröffentlichte *in vitro* Studie konnte zeigen, dass CD40L-positive T-Zellen Thrombozyten aktivieren können, die ihrerseits CD40 exprimieren²⁷. Diese Daten leiteten zu der Fragestellung über, ob und auf welche Weise T-Zellen mit Thrombozyten während hepatischer I/R interagieren. Da eine Interaktion über CD40-CD40L lediglich als eine kostimulatorische Verbindung angesehen werden kann, jedoch nicht die Potenz einer festen, adhäsiven Bindung aufweist, gingen wir der Hypothese nach, dass über P-Selektin vermittelt eine feste Verbindung zwischen T-Zellen und Thrombozyten möglich ist. Wie in der Einleitung beschrieben, ist in der Literatur bekannt, dass Thrombozyten P-Selektin exprimieren. Der entsprechende Counterpart einer adhäsiven Verbindung, P-Selektin Glykoprotein Ligand (PSGL-1), wird auf T-Zellen exprimiert.

Ziel des zweiten Abschnittes dieser Arbeit war es daher, in einem *in vivo* Ansatz zu untersuchen, ob T-Zellen mit Thrombozyten während hepatischer I/R über CD40-CD40L und über P-Selektin-PSGL-1-Verbindungen interagieren. Interaktionen zwischen T-Zellen und Thrombozyten wurden dargestellt, indem Kolokalisationsereignisse zwischen beiden

Zelltypen in der postischämischen hepatischen Mikrozirkulation intravitalmikroskopisch quantifiziert wurden.

3.2.3.1. Versuchsgruppen

Folgende experimentelle Gruppen wurden untersucht (Tab. 5). Nach Induktion einer I/R an Lebern von Wildtyp-Mäusen wurden nach 30 min Reperfusion fluoreszenzmarkierte CD4+ T-Zellen intraarteriell appliziert. Ohne Verzögerung wurden in einem zweiten Schritt fluoreszenzmarkierte Thrombozyten appliziert. Während T-Zellen mit CFDA-SE angefärbt wurden, wurden Thrombozyten mit Rhodamin-6G markiert. Aufgrund der unterschiedlichen Emissionsspektren der Farbstoffe war eine simultane Darstellung der Zelltypen in der hepatischen Mikrozirkulation mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie möglich.

Tab. 5: Versuchsgruppen zur Kolo-kalisation von CD4+ T-Zellen und Thrombozyten in der hepatischen Mikrozirkulation (I/R Ischämie-Reperfusion; WT Wildtyp)

Versuchstiere	Applikation von	Gruppengröße
WT I/R	WT CD4+ T-Zellen WT Thrombozyten	n=6
WT I/R	CD40L-/- CD4+ T-Zellen CD40L-/- Thrombozyten	n=6
WT I/R	P-Sel-/- CD4+ T-Zellen P-Sel-/- Thrombozyten	n=6

In der ersten experimentellen Gruppe wurden sowohl CD4+ T-Zellen als auch Thrombozyten von Wildtyp-Mäusen isoliert. Hierdurch konnte der Frage nachgegangen werden, ob eine Kolo-kalisation zwischen beiden Zelltypen während hepatischer I/R stattfindet.

In einer zweiten Versuchsgruppe wurde analysiert, ob Verbindungen über kostimulatorisch wirksame CD40L Interaktionen Kolo-kalisationsereignisse zwischen Thrombozyten und T-Zellen während hepatischer I/R beeinflussen. Hierzu wurden CD4+ T-Zellen als auch Thrombozyten von CD40L defizienten Spendertieren isoliert und den Wildtyp-Mäusen entsprechend dem Protokoll appliziert.

Um zu untersuchen, ob P-Selektin Interaktionen zwischen T-Zellen und Thrombozyten mediiert, wurden den Wildtyp-Versuchstieren in einer dritten Versuchsgruppe im Anschluss an die Reperfusionphase CD4⁺ T-Zellen und Thrombozyten appliziert, welche von P-Selektin defizienten Tieren isoliert wurden.

Die Gruppengröße der experimentellen Gruppen betrug jeweils 6 Tiere (n=6).

3.2.3.2. Versuchsablauf

Nach Induktion von 90 min Ischämie in Wildtyp Tieren, gefolgt von 30 min Reperfusion, wurden CFDA-SE markierte CD4⁺ T-Zellen (1×10^7) und Rhodamin-markierte Thrombozyten (100×10^6) appliziert (Abb.9). Durch Wechseln des Filterblockes während der intravitalmikroskopischen Analyse war eine simultane Darstellung von CD4⁺ T-Zellen und Thrombozyten in identischen Arealen der hepatischen Mikrozirkulation möglich. Die Durchführung der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie nahm jeweils 20 min in Anspruch. Daraufhin wurden Blut- und Gewebeproben entnommen. Durch Injektion einer Überdosis Pentobarbital wurden die Versuchstiere anschließend euthanasiert.

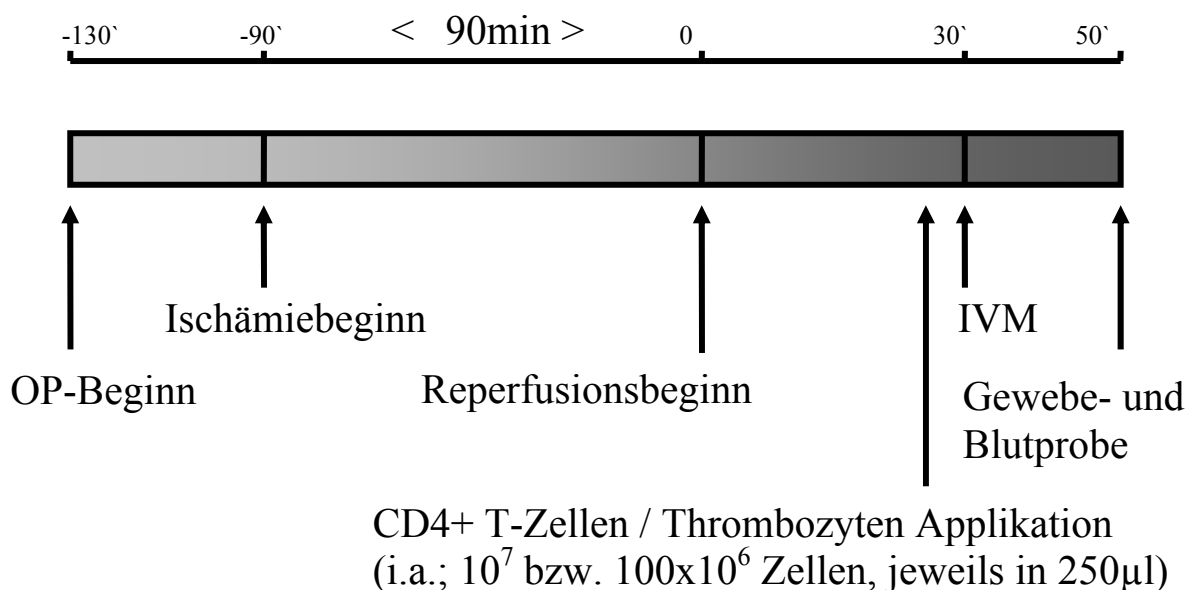


Abb. 10: Experimentelles Protokoll der intravitalmikroskopischen Untersuchung zur simultanen Darstellung von CD4⁺ T-Zellen und Thrombozyten in der postischämischen hepatischen Mikrozirkulation.

3.2.4. Auswirkungen einer MHC-Klasse-II-Blockade auf die Ausbildung des hepatischen I/R Schadens

Wie in der Einleitung beschrieben, wird der durch I/R hervorgerufene Schaden *per definitionem* als ein Alloantigen-unabhängiges Ereignis gewertet. Zur vollständigen

Aktivierung von T-Zellen ist jedoch, so das zentrale Dogma der Immunologie, eine Verbindung zwischen Alloantigen-beladenen MHC-Klasse-II-Molekülen und dem T-Zell-Rezeptor notwendig, begleitet von kostimulatorischen Signalen^{29, 30}. Trotz dieser Diskrepanz wird die Hypothese formuliert, dass während I/R sinusoidale Endothelzellen T-Zellen MHC-Klasse-II-abhängig aktivieren. Um diese Hypothese zu stützen, werden Modelle herangezogen, die von einer Degradation autogener Proteine durch Sauerstoffradikale ausgehen, so dass diese allogen erscheinen. Ob MHC-Klasse-II-vermittelte Effekte überhaupt eine Rolle während hepatischer I/R spielen, wurde noch nicht *in vivo* untersucht. Ziel dieser Versuchsreihe war es daher zu prüfen, ob die Verbindung zwischen T-Zell-Rezeptor und MHC-Klasse-II-Molekülen auf sinusoidalen Endothelzellen bei den T-Zell-vermittelten Effekten eine Rolle spielt.

3.2.4.1. Versuchsgruppen

In der folgenden Tabelle (Tab. 6) sind die Versuchsgruppen aufgeführt, mit Hilfe derer die Auswirkung einer MHC-Klasse-II-Blockade auf die Ausbildung des hepatischen I/R-Schadens untersucht wurde.

Tab.6: Versuchsgruppen zur Untersuchung der Auswirkung einer MHC-Klasse-II-Blockade auf die postischämische Rekrutierung von Thrombozyten und die Ausbildung des mikrovaskulären hepatischen I/R- Schadens (I/R Ischämie-Reperfusion; WT Wildtyp)

Versuchstier	Antikörper	Applikation von	Gruppengröße
WT	Kontrollantikörper	WT Thrombozyten, Rhodamin, FITC Dextran	n=6
WT I/R	MHC-Klasse-II- blockierender Antikörper	WT Thrombozyten, Rhodamin, FITC Dextran	n=6

3.2.4.2. Versuchsablauf

In Analogie zu dem unter 3.2.3.2. beschriebenen Versuchsablauf wurden auch diesen Versuchstieren nach 90 Minuten Ischämie und 30 Minuten Reperfusion Rhodamin-gefärbte Thrombozyten appliziert, gefolgt von der Applikation von Rhodamin und FITC Dextran. Mittels Intravitalmikroskopie wurden Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen, Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen und die sinusoidale Perfusion quantitativ analysiert. Vor

Versuchsbeginn wurde einer Versuchsgruppe ein Kontrollantikörper appliziert, während der zweiten Gruppe 10 Minuten vor Ischämiebeginn ein MHC-Klasse-II-blockierender Antikörper (LEAFTM Purified anti-mouse I-A/I-E, BioLegend, Biozol, Eching, Deutschland) injiziert wurde^{47, 75}. Der Durchführung der intravitalmikroskopischen Untersuchungen folgte die Entnahme von Blut- und Gewebeproben. Der Versuch wurde durch eine Überdosis Pentobarbital beendet.

3.2.5. Potentielle Interaktion von CD4+ T-Zellen und Kupffer-Zellen während hepatischer Ischämie-Reperfusion

Wie in der Einleitung bereits erwähnt, wird in zahlreichen Studien eine Interaktion zwischen Lymphozyten und Kupffer-Zellen während I/R der Leber vermutet^{50, 74, 139}. Eine experimentelle Auseinandersetzung mit dieser Hypothese fehlt jedoch bis dato. Ziel dieses Teils der Dissertationsarbeit war es demnach zu untersuchen, ob und wenn ja über welche Mechanismen eine Interaktion zwischen CD4+ T-Zellen und Kupffer-Zellen während hepatischer I/R stattfindet.

3.2.5.1. Versuchsgruppen

Um zu überprüfen, ob Kupffer-Zellen an der Akkumulation von CD4+ T-Zellen in der postischämischen Leber beteiligt sind, wurden Kupffer-Zellen in einer Versuchsgruppe mittels Gadoliniumchlorid (GdCl₃) depletiert. Die potentielle Rolle von Sauerstoffradikalen, überwiegend freigesetzt von Kupffer-Zellen, an der postischämischen Rekrutierung von CD4+ T-Zellen, wurde nach Applikation des Radikalfängers Glutathion untersucht. Die Verwendung IL-6-defizienter Tiere erlaubte in einer weiteren Versuchsgruppe die Analyse der Rolle von IL-6 auf die postischämische Aktivierung von CD4+ T-Zellen. Schließlich untersuchten wir durch Applikation TNF- α Rezeptor-defizienter CD4+ T-Zellen in einer weiteren Versuchsgruppe den Einfluss von TNF- α auf die postischämische Akkumulation von CD4+ T-Zellen. Schein-operierte sowie eine Wildtyp Versuchsgruppe nach Applikation von CD4+ T-Zellen dienten als Kontrolle. Die folgende Tabelle (Tab. 7) sowie die Abbildung 8 erlauben einen Überblick über die Versuchsgruppen.

Tab. 7: Untersuchung der Beteiligung von Kupffer-Zellen an der postischämischen Rekrutierung von CD4⁺ T-Zellen (I/R Ischämie-Reperfusion; WT Wildtyp)

Versuchstiere	Applikation von	Gruppengröße
WT sham	WT CD4 ⁺ T-Zellen	n=6
WT I/R	WT CD4 ⁺ T-Zellen	n=6
WT I/R	GdCl ₃ , WT CD4 ⁺ T-Zellen	n=6
WT I/R	Glutathion, WT CD4 ⁺ T-Zellen	n=6
IL6 ^{-/-} I/R	WT CD4 ⁺ T-Zellen	n=6
WT I/R	TNF- α -R ^{-/-} CD4 ⁺ T-Zellen	n=6

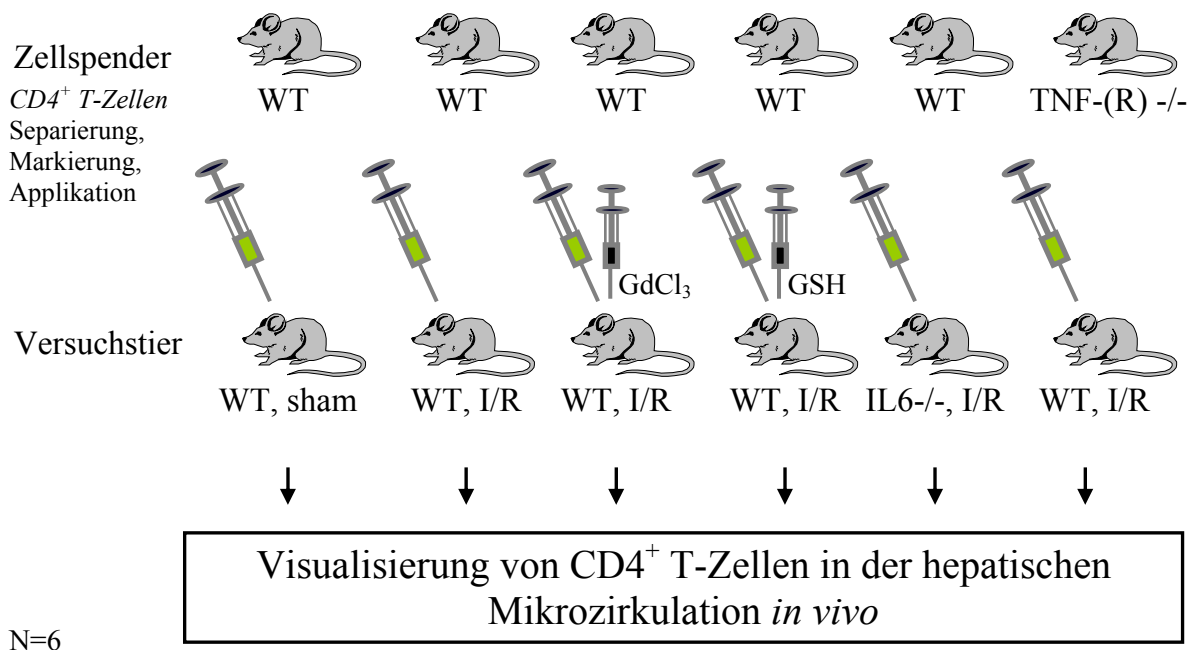


Abb. 8: Schematische Darstellung der Versuchsgruppen zur Untersuchung der Beteiligung von Kupffer-Zellen an der postischämischen Rekrutierung von CD4⁺ T-Zellen (I/R Ischämie-Reperfusion; WT Wildtyp, GdCl₃ Gadoliniumchlorid)

3.2.5.2. Versuchsablauf

In diesem Teil der Arbeit wurde das gleiche experimentelle Protokoll angewandt wie bereits in 3.2.1.2 beschrieben. Nach 90-minütiger Ischämie und 30-minütiger Reperfusion wurden T-Zell-Endothelzell-Interaktionen mittels Intravitalmikroskopie untersucht. Eine zweite quantitative Analyse erfolgte nach 120-minütiger Reperfusion. Im Anschluss an die

intravitalmikroskopischen Untersuchungen wurden Blut- und Gewebeproben entnommen. Die Versuchstiere wurden mit einer Überdosis Pentobarbital euthanasiert.

Präoperativ wurden in zwei Versuchsgruppen die Versuchstiere mit GdCl₃ bzw. Glutathion behandelt. Die Applikation von GdCl₃ erfolgte als Bolus-Injektion 24 Stunden vor Durchführung des Experimentes über eine der Schwanzvenen der Versuchsm Maus. Als Träger wurde isotone Kochsalzlösung verwendet, GdCl₃ lag in einer Konzentration von 10 mg/kg vor. Glutathion (Tationil® 600, Roche, Mailand, Italien) wurde in 300 µl isotoner Kochsalzlösung in einer Konzentration von 0.5 mM appliziert. Beginn der Applikation war 20 Minuten vor Reperfusion, Ende der kontinuierlichen Infusion war direkt nach Abschluss der zweiten intravitalmikroskopischen Untersuchung (Zeitpunkt: 130 min nach Reperfusionsbeginn).

3.2.6. Einfluss von CD4+ T-Zellen auf die Aktivität von Kupffer-Zellen während hepatischer Ischämie-Reperfusion

Wie bereits im vorhergehenden Teil dieser Arbeit erwähnt, wird in der Literatur eine reziproke Aktivierung von CD4+ T-Zellen und Kupffer-Zellen während hepatischer I/R diskutiert^{50, 74, 139}. Unter 3.2.5 haben wir uns in einem *in vivo* experimentellen Ansatz der Frage zugewandt, ob Kupffer-Zellen die postischämische Rekrutierung von CD4+ T-Zellen in der Leber beeinflussen. Im Gegensatz dazu untersucht dieser Teil der Studie, ob CD4+ T-Zellen die Aktivität von Kupffer-Zellen beeinflussen können. Hierzu verwendeten wir wiederum einen intravitalmikroskopischen Ansatz. Als Marker der Aktivität von Kupffer-Zellen wurde die Phagozytoseaktivität von Kupffer-Zellen anhand der Clearance von fluoreszenzmarkierten Latex-Beads quantitativ analysiert.

3.2.6.1. Versuchsgruppen

Die Phagozytoseaktivität von Kupffer Zellen wurde in schein-operierten Wildtyp-Tieren, in Wildtyp-Tieren nach I/R und in CD4-defizienten Tieren nach I/R untersucht. Tabelle 8 gibt einen Überblick über die Versuchsgruppen.

Tab. 8: Versuchsgruppen zur Analyse des Einflusses von CD4+ T-Zellen auf die Aktivität von Kupffer-Zellen während hepatischer Ischämie-Reperfusion (I/R Ischämie-Reperfusion; WT Wildtyp)

Versuchstiere	Applikation von	Gruppengröße
WT sham	Latex-Beads	n=6
WT I/R	Latex-Beads	n=6
CD4-/- I/R	Latex-Beads	n=6

3.2.6.2. Versuchsablauf

Der Ablauf der Versuche zur Untersuchung der Phagozytoseaktivität von Kupffer-Zellen gestaltete sich wie unter 3.1.8.8. beschrieben. Nach 90 Minuten Ischämie gefolgt von 120 Minuten Reperfusion wurden fluoreszenzmarkierte Latex-Beads appliziert. Über einen Zeitraum von 5 Minuten wurde daraufhin die Kinetik der Latex-Bead-Akkumulation quantitativ analysiert. Mittels einer Überdosis Pentobarbital wurden die Versuchstiere zum Ende des Versuches euthanasiert.

3.3. Statistik

Die Ergebnisse sind als Mittelwert (MW) \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Für sämtliche statistische Auswertungen wurde das Software-Paket Sigma-Stat (Jandel Scientific, Erkrath, Deutschland) verwendet. Nach Durchführung der nicht-parametrischen Kruskal-Wallis-ANOVA wurden statistische Unterschiede mit Hilfe des Student-Newman-Keuls-Tests untersucht. Unterschiede wurden bei $p < 0,05$ als signifikant angesehen.

4. ERGEBNISSE

4.1. Positive Selektion von T-Zellen

Zellisolierung mittels MACS[®] Technik führt, so in der Literatur beschrieben, zu keiner Aktivierung oder Einschränkung der Funktion der isolierten Zellen^{88, 92, 95}. Es wurden mittels FACS Analyse eigene Untersuchungen angestellt, um diesen Sachverhalt zu verifizieren.

4.1.1. Aktivitätsstatus selektionierter T-Zellen

Mittels FACS Analyse wurde die Expression von Adhäsionsmolekülen auf T-Zellen quantitativ untersucht; die mittlere Fluoreszenzintensität der gebundenen fluoreszierenden Antikörper spiegelt die Expression der Adhäsionsmoleküle wieder. Eine Aktivierung von T-Zellen würde durch eine verstärkte Expression von CD44 und dem *early activation parameter* CD69 sichtbar, sowie durch eine verringerte Expression von CD62-L (*shedding* von L-Selektin bei Aktivierung). Die positive Selektion von T-Zellen führte zu keiner Aktivierung dieser, wie in der quantitativen Analyse unten sichtbar. Im Vergleich zu den Vollblutproben wurde kein signifikanter Unterschied in der mittleren Fluoreszenzintensität bei den positiv selektionierten T-Zellen sichtbar. Abbildung 10 zeigt exemplarisch die Ergebnisse der Untersuchung der Aktivität von CD4⁺ T-Zellen in Vollblut und nach positiver Selektion aus der Milz. Ein ähnliches Bild fehlender Aktivierung nach Anwendung der MACS[®] Technik wurde für CD8⁺ T-Zellen beobachtet.

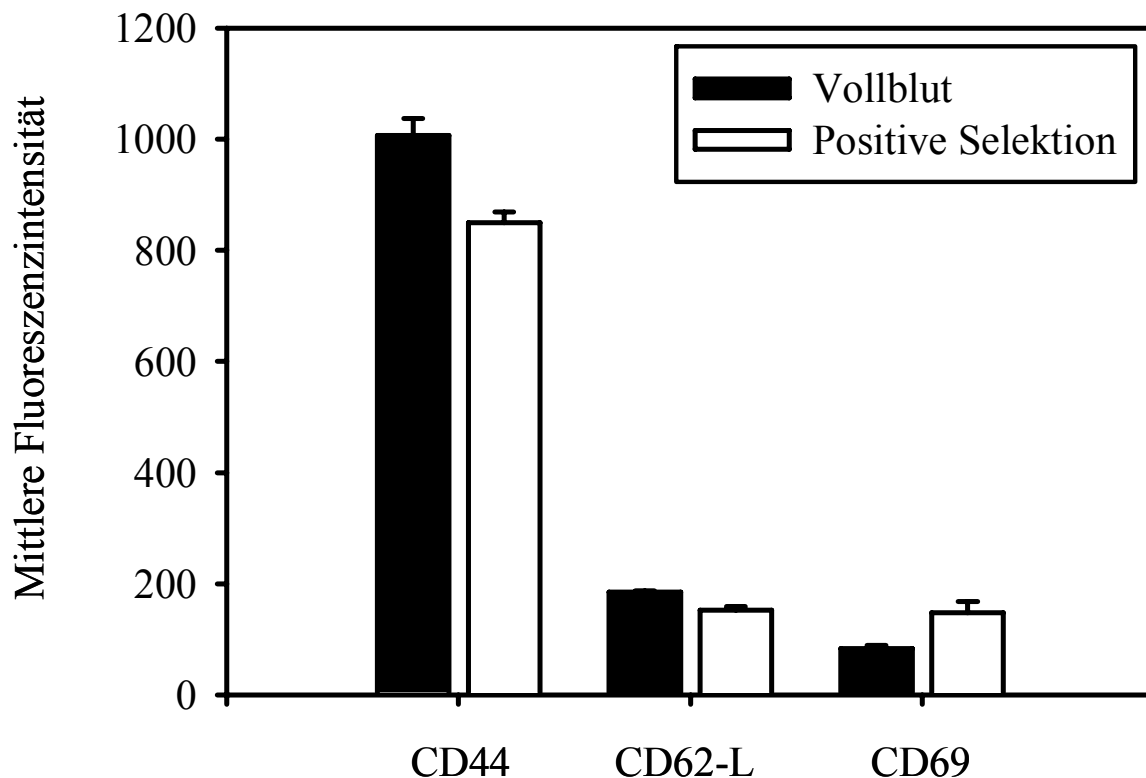


Abb. 10: Aktivitätsstatus positiv selektionierter CD4⁺ T-Zellen. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität nach Inkubation der Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen CD44, CD62-L sowie CD69. Die schwarzen Säulen repräsentieren CD4⁺ T-Zellen aus Vollblutproben, die weißen Säulen stellen positiv selektionierte CD4⁺ T-Zellen aus der Milz dar. Es ist keine Aktivierung der Zellen als Folge der positiven Selektion sichtbar. N=3

4.1.2. Vitalitätsstatus selektionierter T-Zellen

Zur Bestimmung der Vitalität von T-Zellen wurden nach positiver Selektion Untersuchungen mit Propidiumiodid angefertigt. Für CD4⁺ T-Zellen lag die Viabilität bei $94,2 \pm 0,4$ %, während die Viabilität für CD8⁺ T-Zellen bei $88,0 \pm 1,6$ % lag.

4.2. Analyse der Rekrutierung von T-Zell-Subpopulationen in der hepatischen Mikrozirkulation

Im folgenden Abschnitt wird die Analyse der Rekrutierung von T-Zell-Subpopulationen in der postischämischen hepatischen Mikrozirkulation *in vivo* zusammengefasst. Bei allen *in vivo* Experimenten zeigten die Versuchstiere im Verlauf des Experiments, unabhängig von Kontroll- oder Ischämiegruppe, keine signifikanten Änderungen des mittleren arteriellen

Blutdrucks. Die Körpertemperatur wurde in allen Versuchsgruppen kontinuierlich kontrolliert und lag zwischen 36° und 37° C.

4.2.1. Rekrutierung von CD4+ und CD8+ T-Zellen in der hepatischen Mikrozirkulation

Fluoreszenzmarkierte CD4+ und CD8+ T-Zellen wurden nach Applikation mittels Intravitalmikroskopie in der hepatischen Mikrozirkulation visualisiert. Die folgenden Bilder vermitteln exemplarisch einen Eindruck der intravitalmikroskopischen Beobachtungen. In der Leber der schein-operierten Tiere sind nur vereinzelt adhärente CD4+ T-Zellen sichtbar. Im Gegensatz dazu führt I/R zu einer verstärkten Akkumulation von CD4+ T-Zellen in Sinusoiden und in geringerem Ausmaß auch in postsinusoidalen Venolen.

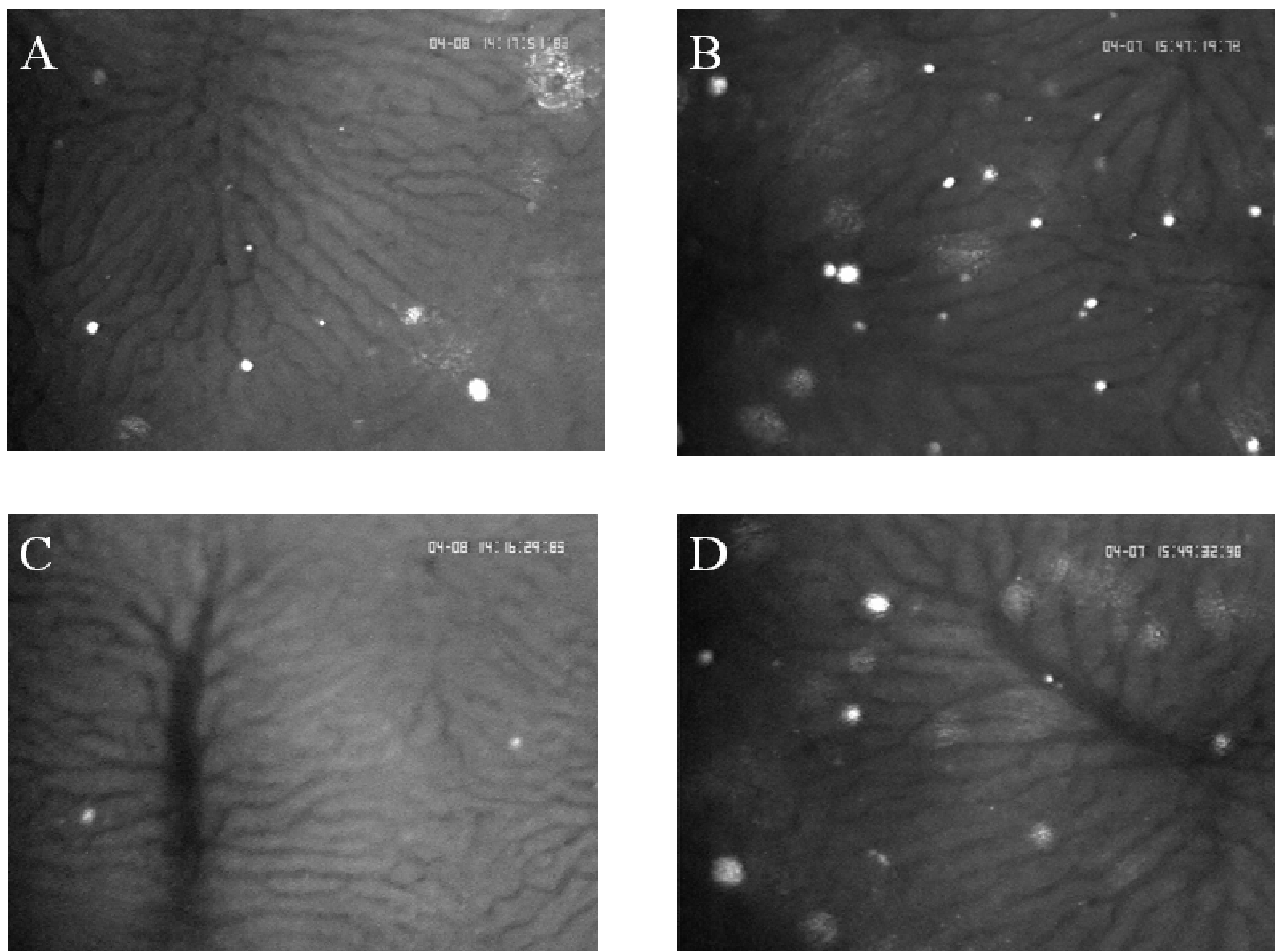


Abb. 11: CD4+ T-Zellen in der hepatischen Mikrozirkulation. Bild A zeigt die Akkumulation fluoreszenzmarkierter CD4+ T-Zellen in Sinusoiden in Kontrolltieren, während Bild B die Akkumulation in Sinusoiden nach I/R zeigt. Sichtbar ist die verstärkte Akkumulation CD4+ T-Zellen nach I/R. In der unteren Reihe (Bilder C und D) ist die Akkumulation CD4+ T-Zellen in postsinusoidalen Venolen zu sehen, links in Kontrolltieren, rechts nach I/R. (I/R: Ischämie-Reperfusion)

In der quantitativen Analyse zeigte sich, dass in schein-operierten Tieren nur eine geringe Akkumulation von CD4+ T-Zellen zu beobachten ist. Im Gegensatz dazu führte I/R zu einer signifikanten Zunahme der Anzahl akkumulierter CD4+ T-Zellen in Sinusoiden nach 30 und nach 120 Minuten Reperfusion (vgl. Abb. 12). In postsinusoidalen Venolen war jedoch die Anzahl postschämisch akkumulierter CD4+ T-Zellen nur tendenziell, aber nicht signifikant, erhöht.

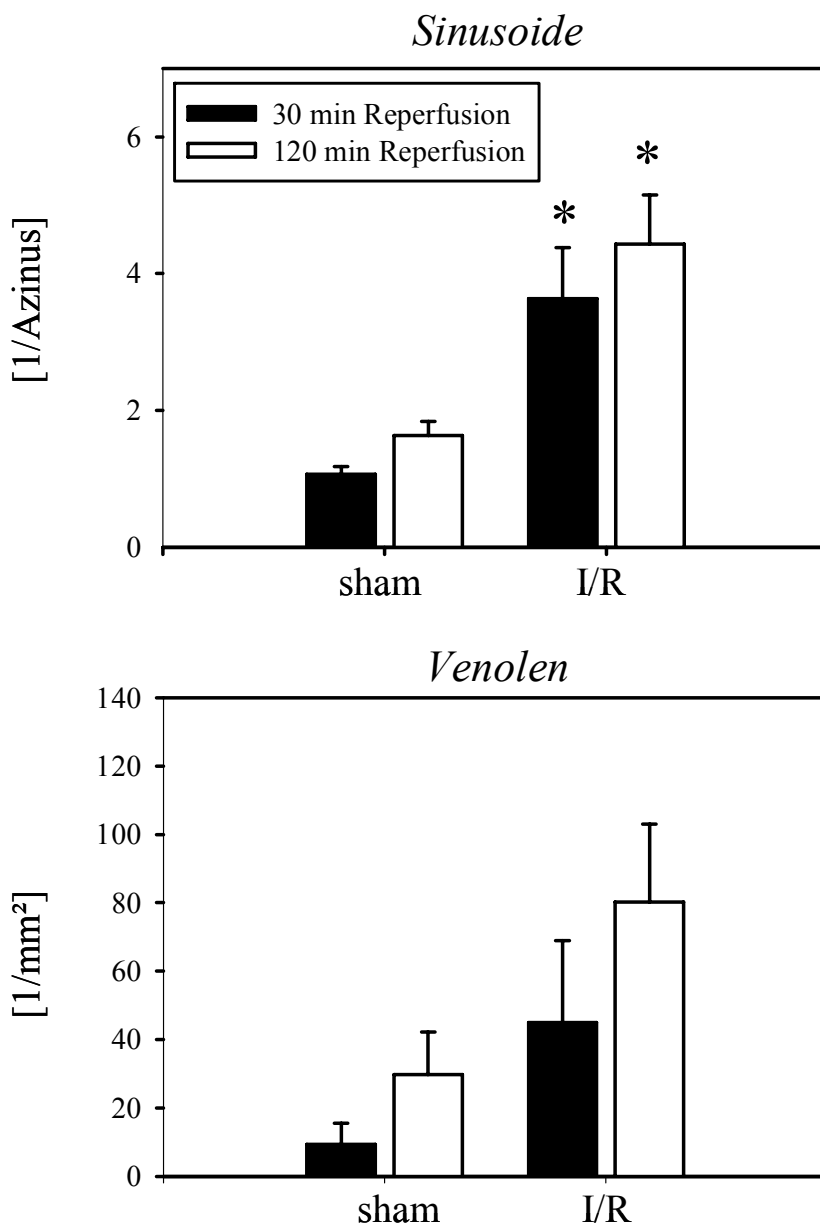


Abb. 12: Quantitative Auswertung der Akkumulation von CD4+ T-Zellen in Sinusoiden und postsinusoidalen Venolen. In der Kontrollgruppe ist nur eine geringe Akkumulation von CD4+ T-Zellen in Sinusoiden zu beobachten. Dahingegen führt I/R zu einer signifikanten Zunahme der Anzahl akkumulierter CD4+ T-Zellen in Sinusoiden nach 30 und nach 120 min Reperfusion. In postsinusoidalen Venolen zeigte sich die Anzahl postschämisch akkumulierter CD4+ T-Zellen nur tendenziell, aber nicht signifikant, erhöht. N=6, *p<0,05 vs. sham. (I/R: Ischämie-Reperfusion)

Im Gegensatz zu CD4+ T-Zellen war die postischämische Rekrutierung von CD8+ T-Zellen in allen Segmenten der hepatischen Mikrozirkulation gering und unterschied sich nicht zwischen den experimentellen Gruppen.

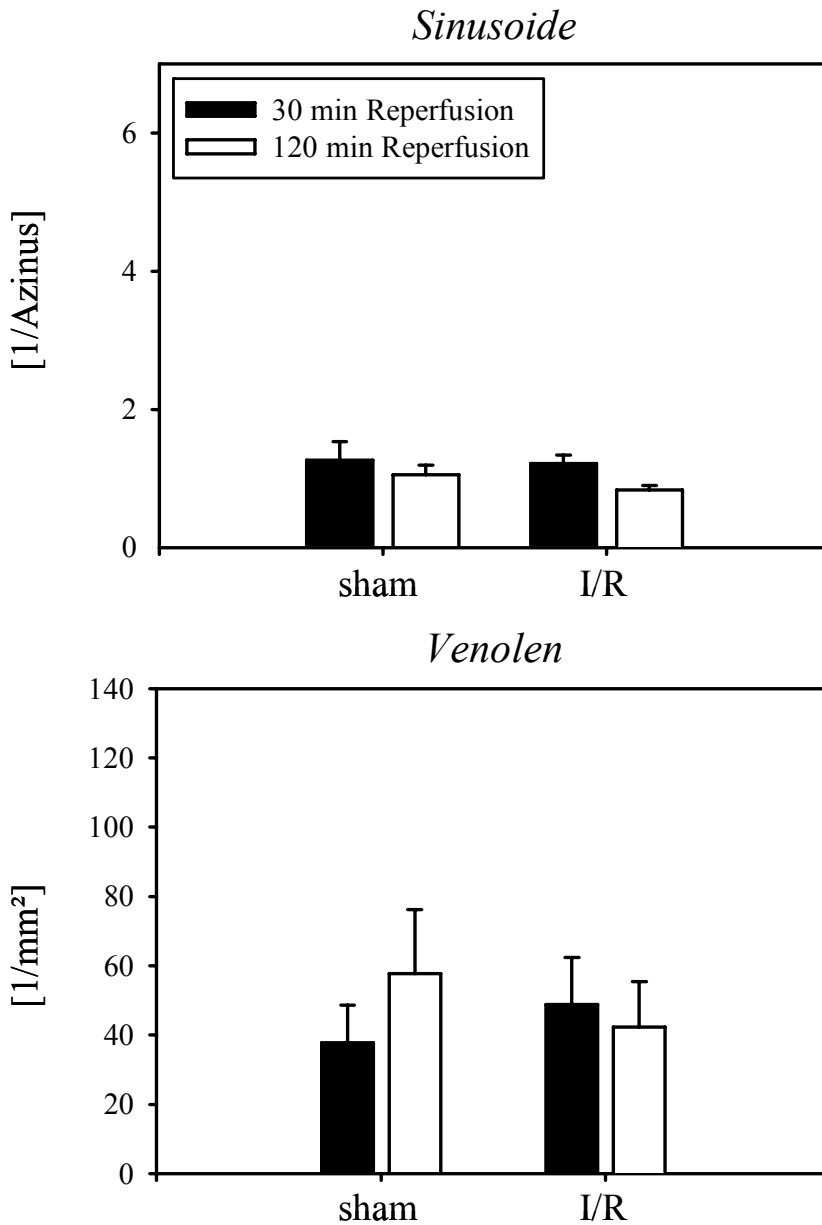


Abb. 13: Quantitative Auswertung der Akkumulation von CD8+ T-Zellen in Sinusoiden und postsinusoidalen Venolen. Die postischämische Anzahl akkumulierter CD8+ T-Zellen war in Sinusoiden und postsinusoidalen Venolen gering und unterschied sich nicht zwischen den experimentellen Gruppen. N=6

4.2.2. Emigration von CD4+ T-Zellen in der postischämischen hepatischen Mikrozirkulation

Die Emigration von CD4+ T-Zellen wurde quantifiziert, indem Zellen im perivaskulären Raum ausgezählt wurden.

Nach 30-minütiger Reperfusion fanden sich 13% der akkumulierten CD4+ T-Zellen im perivaskulären Raum. Eine Verlängerung der Reperusionszeit auf 120 Minuten führte zu einer signifikanten Zunahme der Emigration auf 25%.

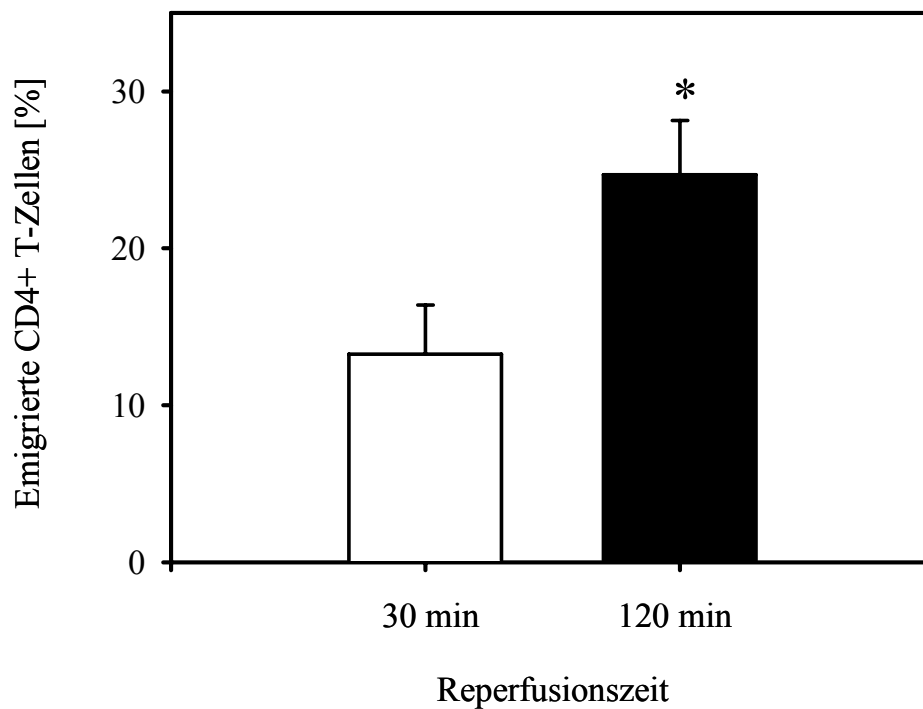


Abb. 14: Quantitative Auswertung der Emigration von CD4+ T-Zellen in der postischämischen hepatischen Mikrozirkulation. Dargestellt ist die Emigration CD4+ T-Zellen als Quotient extravasierter Zellen zur Gesamtzahl akkumulierter CD4+ T-Zellen in Sinusoiden. Eine Verlängerung der Reperusionszeit auf 120 Minuten führte zu einer signifikanten Zunahme der Emigration auf 25%. *p<0,05 vs. 30min.

4.3. Analyse der Beteiligung von CD4⁺ T-Zellen an der Ausbildung des postischämischen hepatischen I/R-Schadens

Drittes Ziel dieser Studie war es zu untersuchen, über welche Mechanismen CD4⁺ T-Zellen an der Ausbildung des postischämischen hepatischen I/R-Schadens beteiligt sind. Intravitalmikroskopisch wurde daher mittels Verwendung CD4-defizienter Tiere der Einfluss von CD4⁺ T-Zellen auf Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen sowie auf das sinusoidale Perfusionsdefizit untersucht. Mit dem Ziel die Mechanismen einer solchen Beteiligung näher darzustellen, wurden gleiche Experimente auch unter Verwendung CD40L- und CD28-defizienter Tiere durchgeführt. Schließlich wurde in diesem Teil der Studie noch der Einfluss von CD4⁺ T-Zellen auf die Emigration von neutrophilen Granulozyten sowie auf die Ausbildung des hepatozellulären Schadens untersucht.

4.3.1. Quantitative Analyse der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen

Nach I/R zeigte sich eine signifikante Zunahme der Anzahl akkumulierter Thrombozyten im Vergleich zu der schein-operierten Gruppe. Im Gegensatz dazu war die Thrombozytenakkumulation signifikant geringer in CD4-, CD40L- und CD28-defizienten Tieren.

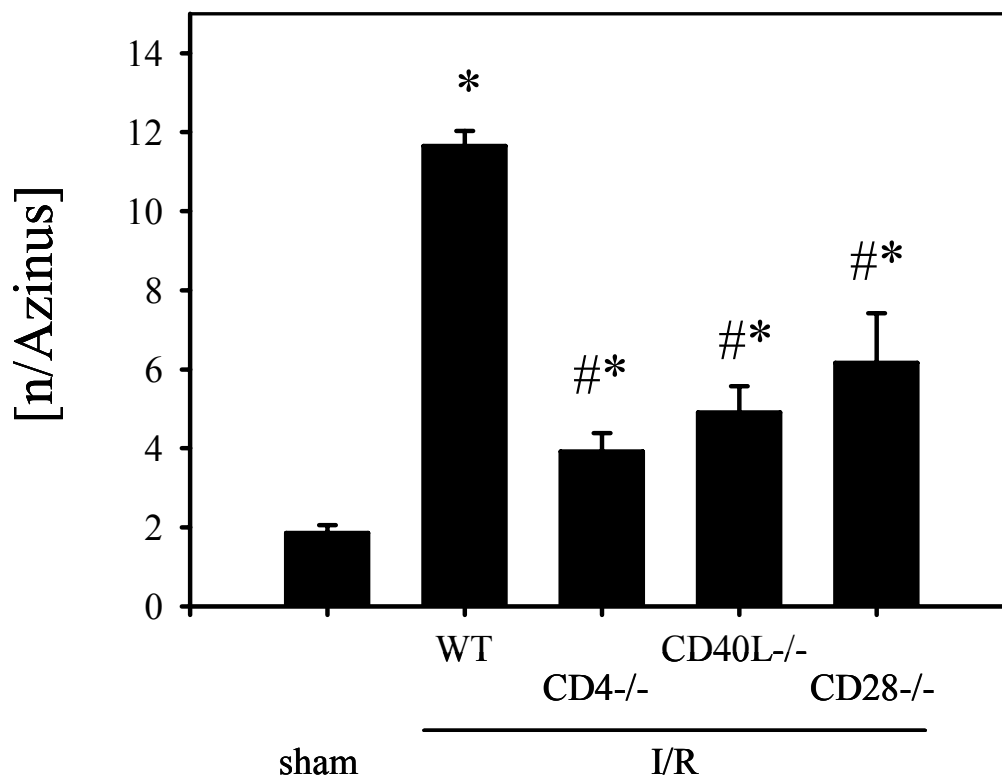


Abb. 17: Thrombozytenakkumulation in Sinusoiden. I/R führte zu einer signifikanten Zunahme der Anzahl akkumulierter Thrombozyten in Sinusoiden im Vergleich zur schein-operierten Gruppe. Dahingegen führte eine CD4⁺ T-Zell-Defizienz zu einer Signifikanten Reduktion der postischämischen Akkumulation von Thrombozyten. Ebenso war die postischämische Thrombozytenakkumulation in CD40L- und CD28-defizienten Tieren signifikant vermindert im Vergleich zur Wild-Typ Gruppe. N=6, *p<0,05 vs. sham, #p<0,05 vs. I/R WT (I/R: Ischämie-Reperfusion; WT: Wild-Typ)

4.3.2. Quantitative Analyse der Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen

I/R führte zu einer signifikanten Zunahme der Anzahl akkumulierter Leukozyten in postsinusoidalen Venolen. Nicht nur in CD4 defizienten Tieren, sondern auch bei Defizienz von CD40L und CD28 war die Anzahl akkumulierter Leukozyten signifikant gegenüber der Kontrollgruppe geringer.

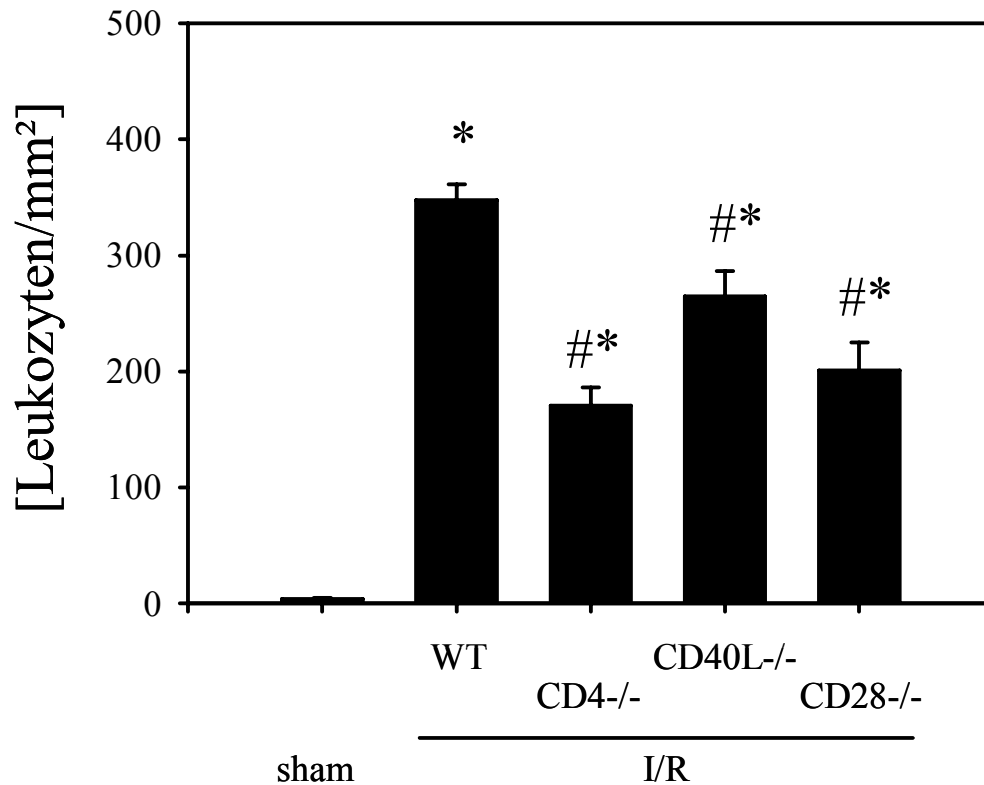


Abb. 18: Quantitative Analyse der Akkumulation von Leukozyten in postsinusoidalen Venolen. Dargestellt ist die Anzahl akkumulierter Leukozyten in sham-operierten Tieren und nach I/R in Wildtyp Tieren und CD4-, CD40Ligand sowie CD28- defizienten Tieren. N=6, * $p < 0,05$ vs. sham, # $p < 0,05$ vs. I/R WT (I/R: Ischämie-Reperfusion; WT: Wild-Typ)

4.3.3. Quantitative Analyse der Sinusoidalen Perfusion

Zur Abschätzung des durch I/R induzierten hepatischen mikrovaskulären Schadens wurde das sinusoidale Perfusionsdefizit bestimmt. Das sinusoidale Perfusionsdefizit beschreibt den prozentualen Anteil der Sinusoide eines Azinus, welche in Folge der I/R nicht mehr perfundiert sind. I/R führte zu einer signifikanten Einschränkung der Perfusion im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Im Gegensatz dazu war das sinusoidale Perfusionsdefizit signifikant vermindert in CD4-, CD40L- und CD28-defizienten Mäusen.

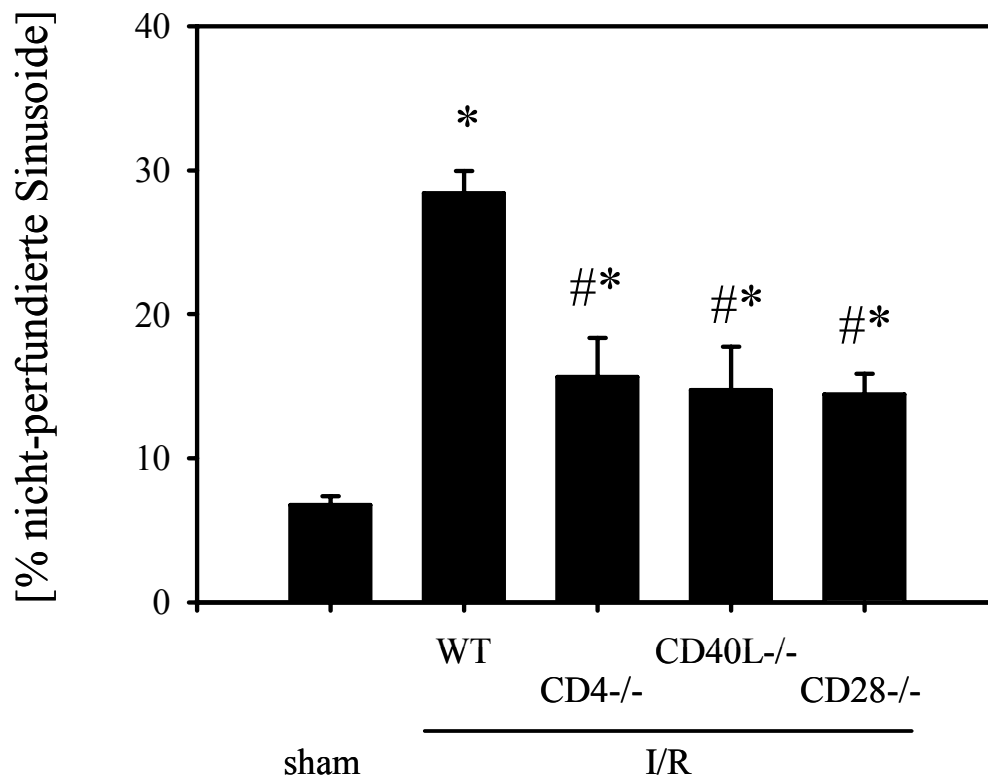


Abb. 19: Quantitative Analyse des sinusoidalen Perfusionsdefizits. Der Anteil nicht perfundierter Sinusoide zur Gesamtzahl aller Sinusoide eines Azinus ist nach I/R deutlich erhöht. Dieses postischämische sinusoidale Perfusionsdefizit ist in CD4- und CD40L- sowie in CD28-defizienten Tieren signifikant vermindert. N=6, *p<0,05 vs. sham, #p<0,05 vs. I/R WT (I/R: Ischämie-Reperfusion; WT: Wild-Typ)

4.3.4. Quantitative Analyse der Emigration von neutrophilen Granulozyten

Die Emigration von neutrophilen Granulozyten wurde histologisch nach Anwendung der Granulozyten Naphthol AS-D Chlorazetat Esterase-Färbung quantitativ analysiert. Die Anzahl emigrierter Neutrophile war nach I/R signifikant höher im Vergleich zur schein-operierten Gruppe. In CD4- und CD28-defizienten Tieren war die postischämische Emigration dahingegen signifikant vermindert. Überraschenderweise zeigte sich in CD40L-defizienten Tieren ein massiver Rückgang der Neutrophilenemigration.

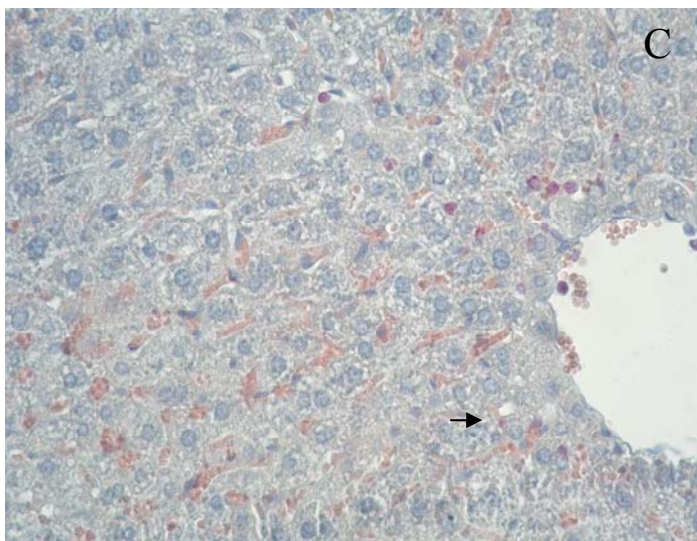
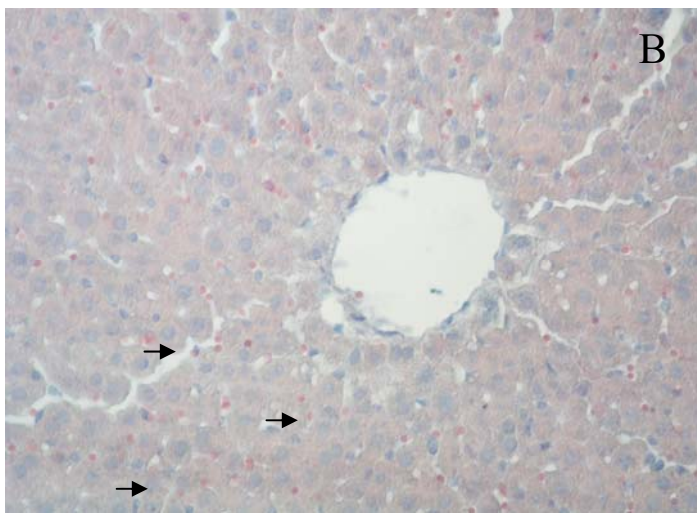
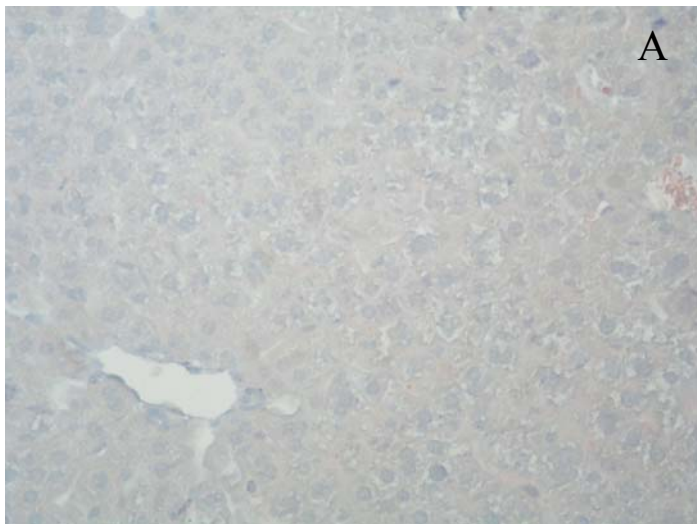


Abb. 20: Emigration von neutrophilen Granulozyten. Exemplarische histologische Bilder aus einem sham-operierten Tier (Bild A), einem Tier nach I/R (Bild B) und einem CD4 T-Zell-defizienten Tier (Bild C). Die Pfeile deuten jeweils auf emigrierte neutrophile Granulozyten hin. (I/R: Ischämie-Reperfusion)

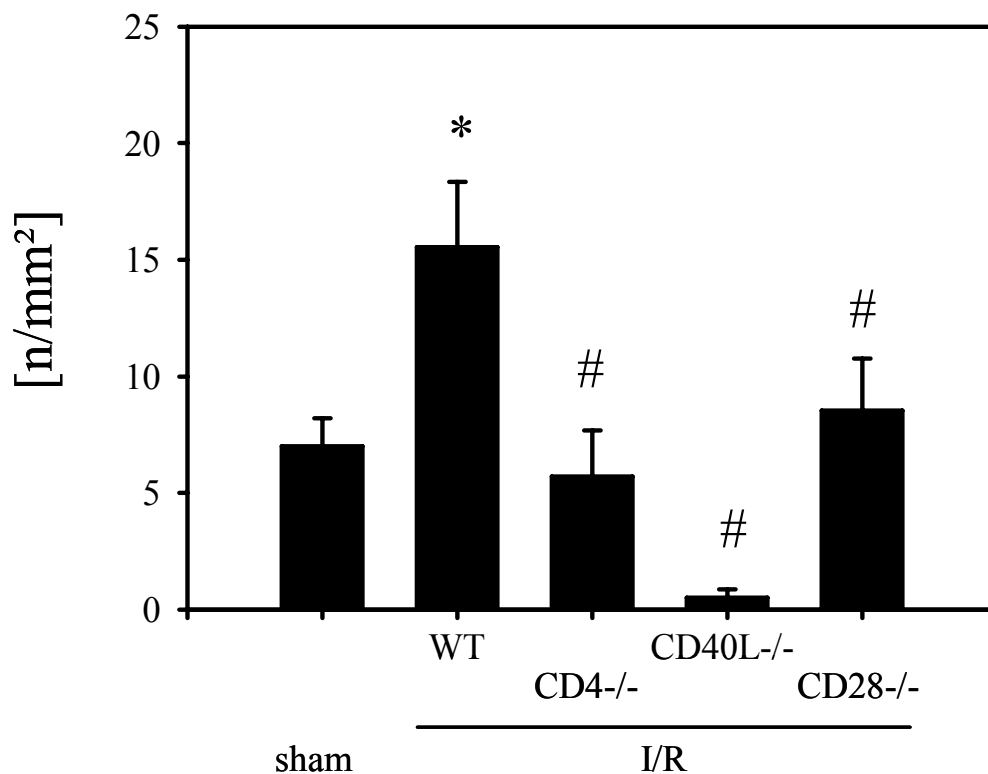


Abb. 21: Quantitative Analyse der Emigration von Neutrophilen. Emigrierte neutrophile Granulozyten wurden in histologischen Gewebeproben mittels der Naphthol AS-D Chlorazetat Esterase-Färbung angefärbt und mikroskopisch ausgezählt. I/R führte zu einem signifikanten Anstieg der Anzahl emigrierter Neutrophile. Die Anzahl emigrierter Neutrophiler war dahingegen in CD4- und CD28-defizienten Tieren signifikant geringer. In CD40L-defizienten Tieren war überraschenderweise ein annähernd vollkommenes Fehlen einer Emigration von Neutrophilen zu beobachten. N=6, *p<0,05 vs. sham, #p<0,05 vs. I/R WT (I/R: Ischämie-Reperfusion; WT: Wild-Typ)

4.3.5. Quantitative Analyse der hepatozellulären Schadens

Neben der Bestimmung des sinusoidalen Perfusionsdefizites ist ein weiterer Parameter zur Bestimmung des hepatischen mikrovaskulären Schadens die Analyse der GOT und GPT Werte. Die Aktivität der hepatischen Transaminasen war im Vergleich zur schein-operierten Gruppe signifikant angestiegen. Dahingegen waren mit Ausnahme der GOT Werte in CD40L-defizienten Mäusen die GOT / GPT Werte signifikant geringer in CD4-, CD40L- und CD28-defizienten Tieren.

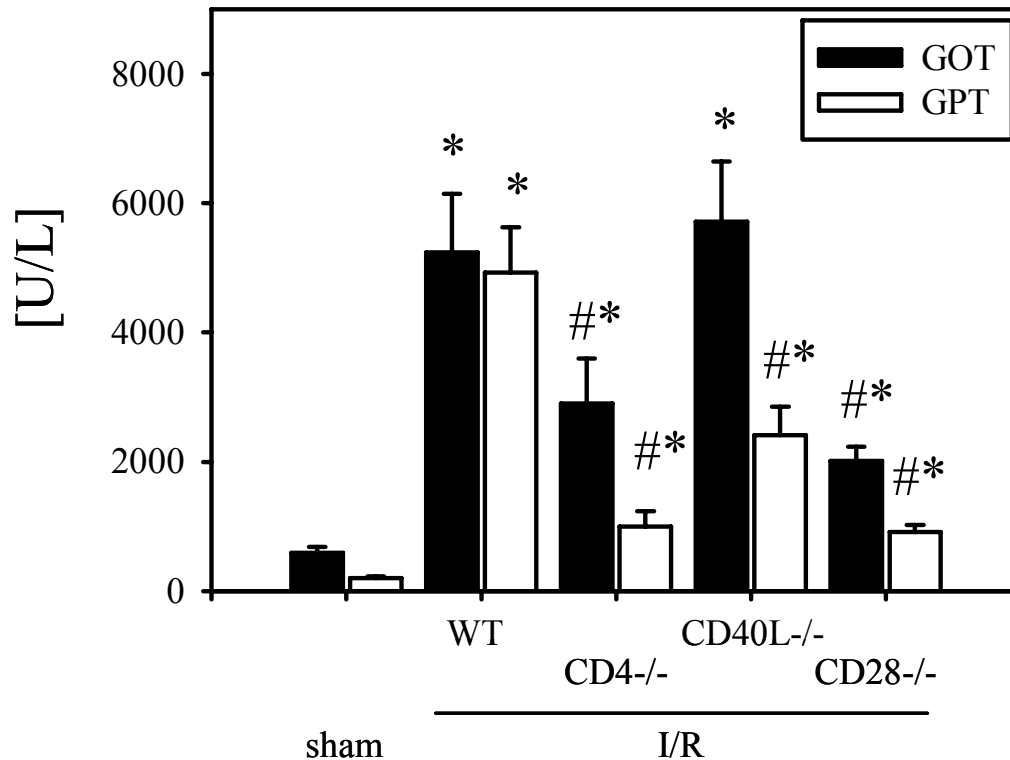


Abb. 22: Aktivität der hepatischen Transaminasen. I/R führte zu einer signifikanten Steigerung der Aktivität der hepatischen Transaminasen GOT und GPT. Mit Ausnahme der GOT Werte in CD40L-defizienten Tieren war die Aktivität der hepatischen Transaminasen signifikant geringer in CD4^{-/-}, CD40L^{-/-} und CD28^{-/-} defizienten Tieren. N=6, *p<0,05 vs. sham, #p<0,05 vs. I/R WT (I/R: Ischämie-Reperfusion; WT: Wild-Typ)

4.4. Analyse der Interaktion von CD4⁺ T-Zellen mit Thrombozyten in der Leber bei I/R

Drittes Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, über welche Mechanismen CD4⁺ T-Zellen mit Thrombozyten in der postischämischen hepatischen Mikrozirkulation interagieren. Mittels intravitalmikroskopischer Untersuchung wurde *in vivo* die Interaktion von CD4⁺ T-Zellen und Thrombozyten dargestellt. Die folgenden intravitalmikroskopischen Bilder entstanden in direkter Abfolge nach Wechsel des Filterblocks, wie in den Methoden unter 3.2.3.2. bereits beschrieben.

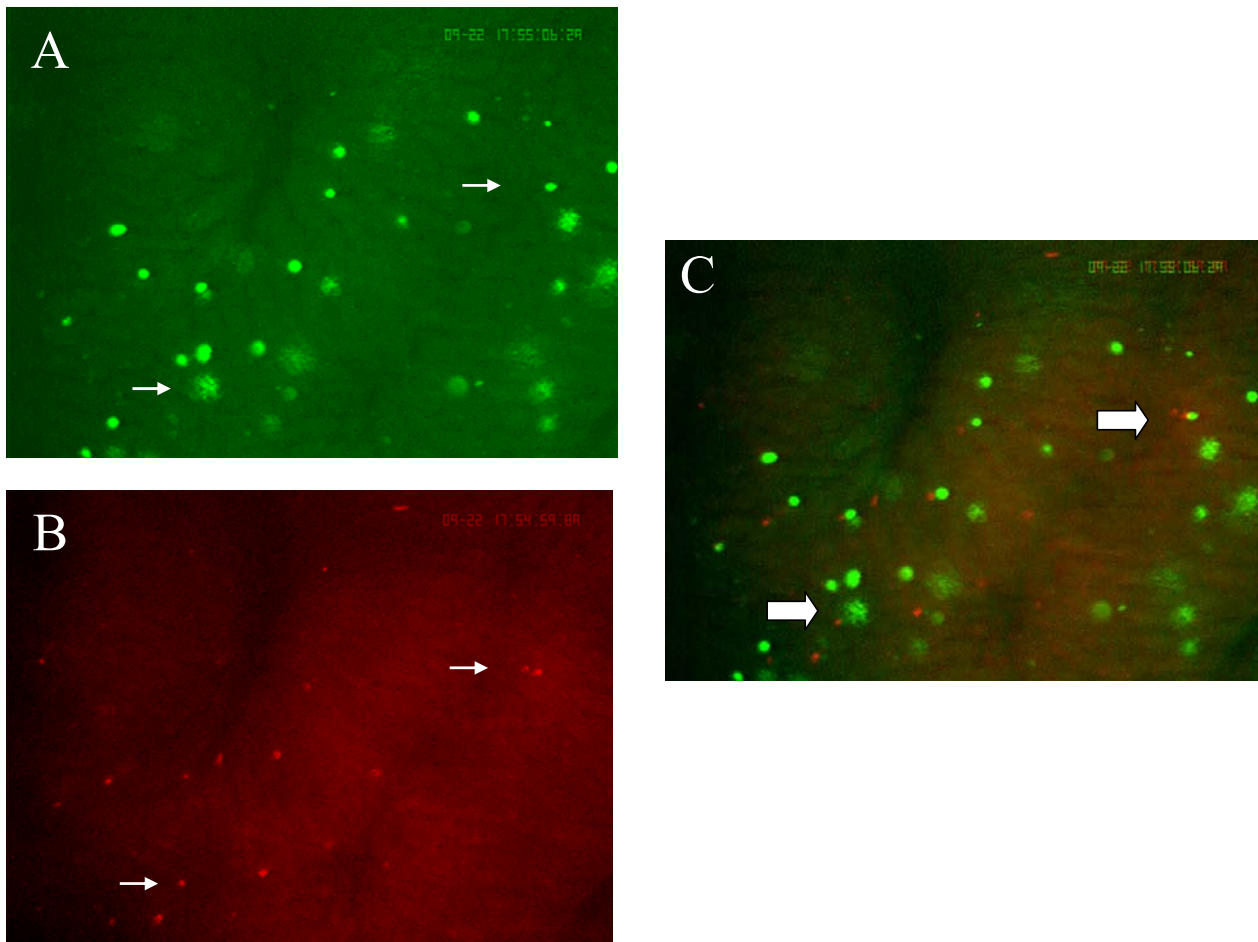
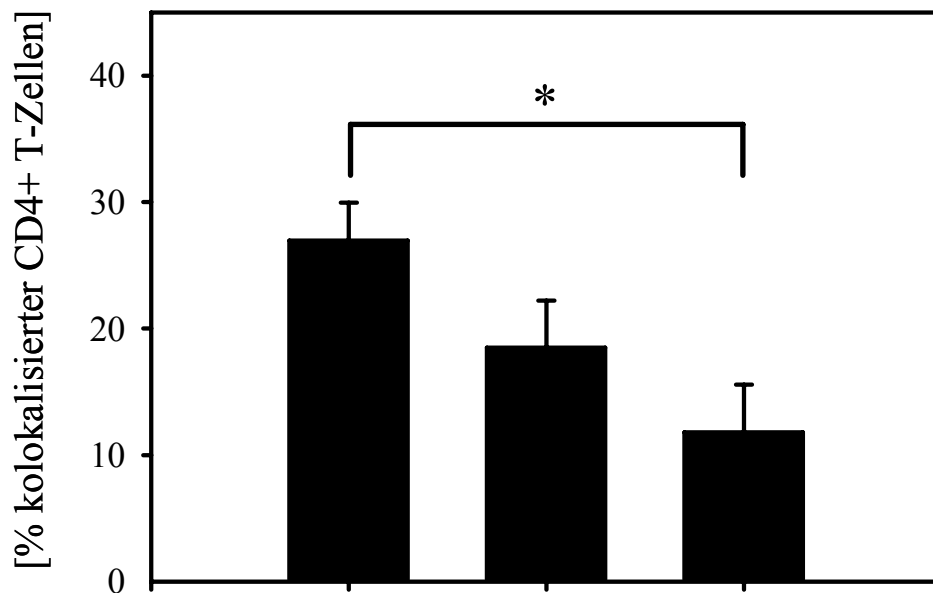


Abb. 23: Kolokalisation von CD4⁺ T-Zellen und Thrombozyten in der hepatischen Mikrozirkulation. Bild A zeigt die Akkumulation CFDA-SE-markierter CD4⁺ T-Zellen in Sinusoiden. Die Akkumulation Rhodamin-markierter Thrombozyten ist im gleichen Azinus dargestellt (Bild B). Beide Bilder entstanden in direkter Abfolge nach Wechsel des Filterblocks. Während der *off-line frame by frame* Videoanalyse wurden beide Bilder überlappt, wie in Bild C zu sehen, um Kolokalisation von CD4⁺ T-Zellen und Thrombozyten festzustellen (siehe Pfeile).

Die quantitative Analyse ergab, dass ca. 30 Prozent der akkumulierten CD4⁺ T-Zellen mit Thrombozyten in hepatischen Sinusoiden kolokalisiert sind. Thrombozyten und CD4⁺ T-Zellen mit fehlender Expression von CD40L zeigten tendenziell einen geringeren Prozentsatz an Kolokalisationsereignissen. Diese Tendenz erreichte jedoch keine statistische Signifikanz. Im Gegensatz dazu führte die P-Selektin Defizienz auf Thrombozyten zu einer signifikanten Reduktion von Kolokalisationsereignissen zwischen T-Zellen und Thrombozyten. (Abb. 16) Dies ist ein Hinweis dafür, dass feste Interaktion zwischen CD4⁺ T-Zellen und Thrombozyten überwiegend über Adhäsionsmoleküle wie P-Selektin auf Thrombozyten und PSGL-1 auf CD4⁺ T-Zellen mediiert wird, während kostimulatorische Verbindungen wie CD40-CD40L unterstützend wirken.



Endothel:	WT	WT	WT
CD4+ T-Zellen:	WT	CD40L-/-	WT
Thrombozyten:	WT	CD40L-/-	CD62P-/-

Abb. 24: Quantitative Analyse der Kolokalisation von CD4+ T-Zellen und Thrombozyten in der hepatischen Mikrozirkulation. Annähernd 30% der postischämisch akkumulierten CD4+ T-Zellen sind mit Thrombozyten kolokalisiert. Während eine Defizienz an CD40L lediglich mit einem tendenziell geringeren Prozentsatz an Kolokalisationsereignissen einherging, war eine P-Selektin Defizienz auf Thrombozyten mit einer signifikanten Reduktion von Kolokalisationsereignissen assoziiert. N=6, *p<0,05 (WT: Wild-Typ)

4.5. Analyse der Auswirkungen einer MHC-Klasse-II-Blockade auf die Ausbildung des hepatischen I/R-Schaden

Versuchstieren wurde nach Ischämie ein MHC-Klasse-II-Antikörper bzw. ein Kontrollantikörper appliziert. Hierdurch wurde untersucht, ob die Verbindung zwischen T-Zell-Rezeptor und MHC-Klasse-II-Molekülen auf sinusoidalen Endothelzellen bei den T-Zell-vermittelten Effekten eine Rolle spielt. Die Blockade von MHC-Klasse-II-Molekülen hatte weder einen Effekt auf die Thrombozytenrekrutierung noch auf den postischämischen Gewebeschaden.

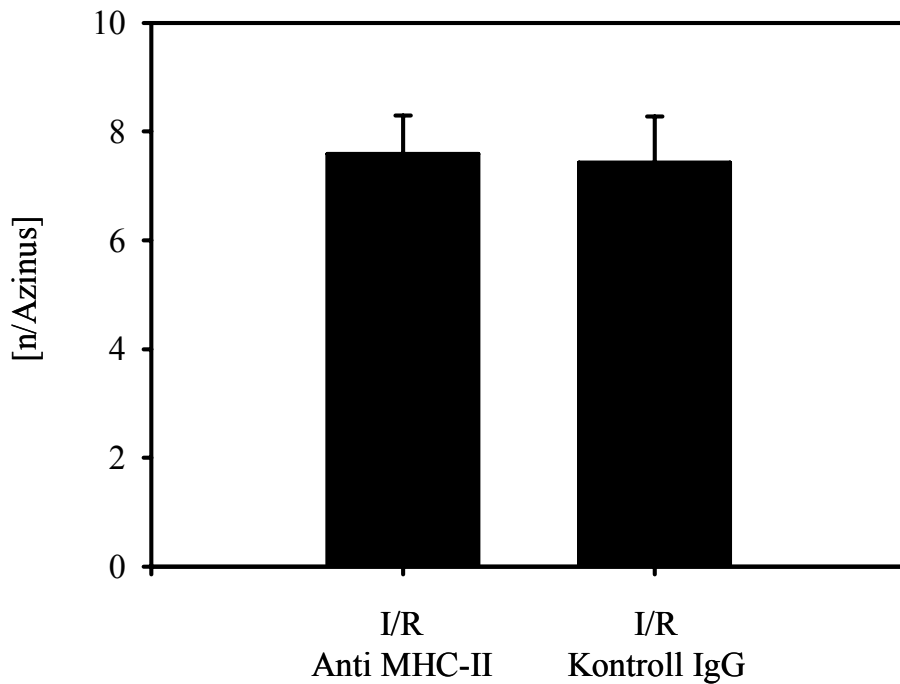


Abb. 25: Thrombozytenakkumulation in hepatischen Sinusoiden. Die Blockade von MHC-Klasse-II-Molekülen hatte keinen Effekt auf die Thrombozytenrekrutierung in Sinusoiden nach I/R der Leber. Die Anzahl akkumulierter Thrombozyten war nach Applikation eines Anti-MHC-II-Antikörpers (links) vergleichbar der Anzahl akkumulierter Thrombozyten nach Applikation eines Kontroll-Antikörpers (rechts). (I/R: Ischämie-Reperfusion)

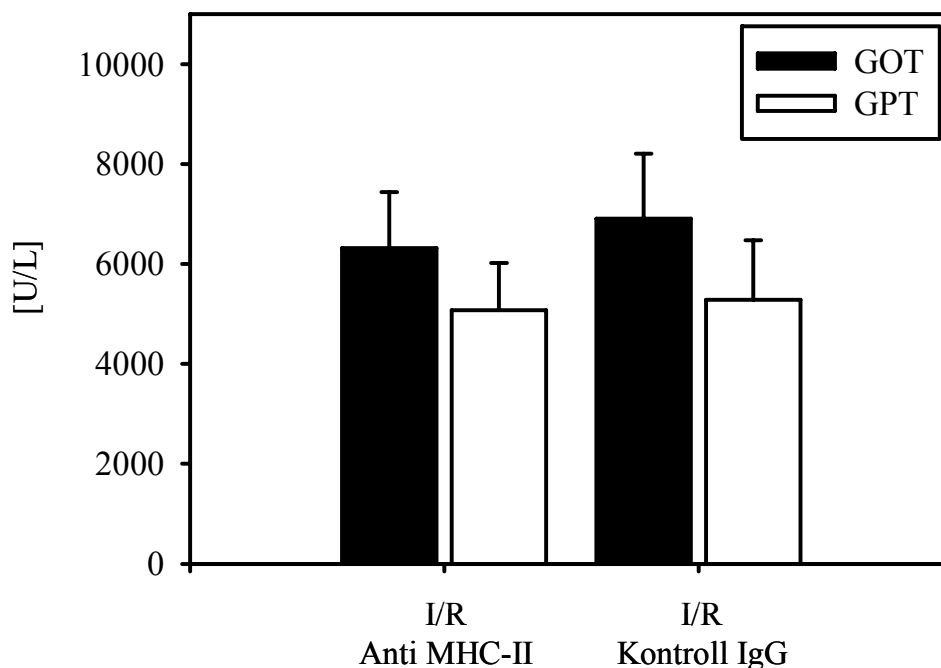


Abb. 26: Aktivität der hepatischen Transaminasen. Links dargestellt ist die Aktivität der hepatischen Transaminasen nach Applikation eines MHC-Klasse-II-Antikörpers. Im Vergleich zur Applikation eines Kontrollantikörpers hat die Blockade von MHC-Klasse-II-Molekülen keinen Effekt auf die Ausbildung des postischämischen Gewebeschaadens. (I/R: Ischämie-Reperfusion)

4.6. Analyse der Interaktion zwischen CD4+ T-Zellen und Kupffer-Zellen während hepatischer I/R

In der aktuellen Literatur wird diskutiert, wie in der Einleitung bereits dargestellt, dass die von Kupffer-Zellen freigesetzten proinflammatorischen Mediatoren während I/R CD4+ T-Zellen beeinflussen. Diese Hypothese ist bisher noch nicht in einem experimentellen Ansatz *in vivo* analysiert worden. In dieser Studie wurde demnach das Ziel verfolgt zu untersuchen, ob Kupffer-Zellen mit CD4+ T-Zellen während hepatischer I/R interagieren, insbesondere ob Kupffer-Zellen CD4+ T-Zellen aktivieren können.

4.6.1. Quantitative Analyse der Kupffer-Zell-abhängigen Aktivierung von CD4+ T-Zellen

Im Gegensatz zur Scheinoperation führte hepatische I/R zu einer signifikanten Zunahme der Akkumulation von CD4+ T-Zellen in Sinusoiden. Die I/R induzierte Akkumulation und Emigration von CD4+ T-Zellen wurde nach Depletion von Kupffer-Zellen dahingegen nahezu vollständig verhindert. Sowohl das Abfangen freier Radikale als auch die Unterbrechung der TNF- α und IL-6-Signalwege gingen mit einer signifikanten Abnahme der Anzahl akkumulierter und emigrierter CD4+ T-Zellen nach 30 und nach 120 Minuten Reperfusion einher.

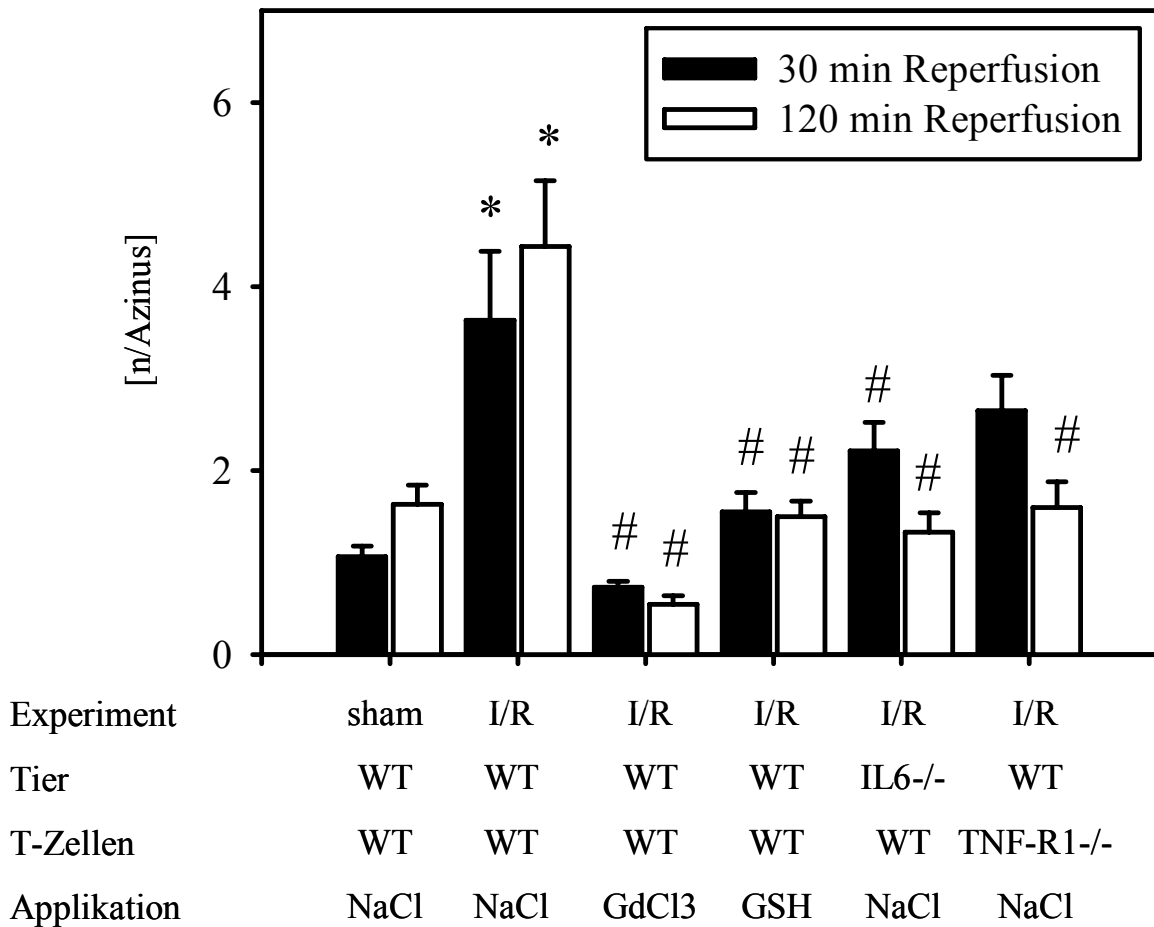


Abb. 27: Rekrutierung von CD4⁺ T-Zellen in Sinusoiden. I/R führt zu einer Zunahme der Anzahl akkumulierter CD4⁺ T-Zellen in Sinusoiden im Vergleich zur schein-operierten Gruppe (s.o.). Depletion von Kupffer-Zellen mittels Gadoliniumchlorid (GdCl₃) ist mit einer signifikanten Reduktion der Akkumulation von CD4⁺ T-Zellen assoziiert. Sowohl das Abfangen von Sauerstoffradikalen, als auch die Unterbrechung von IL6- und TNF- α Signalling-Wegen reduzierte die Anzahl akkumulierter CD4⁺ T-Zellen signifikant. * $p < 0,05$ vs. sham, # $p < 0,05$ vs. I/R WT (I/R: Ischämie-Reperfusion; WT: Wild-Typ)

Tab. 9: Emigration von CD4+ T-Zellen, Angabe in Prozent emigrierter Zellen zur Gesamtzahl akkumulierter Zellen in Sinusoiden. I/R führte zu einer signifikanten Zunahme der Emigration von CD4+ T-Zellen im Vergleich zur schein-operierten Gruppe. Im Gegensatz dazu war die Emigration signifikant vermindert nach Depletion von Kupffer-Zellen durch Gadoliniumchlorid (GdCl₃), nach Abfangen freier Sauerstoffradikale durch Glutathion (GSH) und nach Unterbrechung des TNF- α und IL-6 Signalweges. (I/R: Ischämie-Reperfusion; WT: Wild-Typ)

Experiment	Schein-Operation	I/R	I/R	I/R	I/R	I/R
Tier	WT	WT	WT	WT	IL6-/-	WT
T-Zellen	WT	WT	WT	WT	WT	TNF-R1-/-
Applikation	NaCl	NaCl	GdCl ₃	GSH	NaCl	NaCl
30 min Reperfusion	11,3 %	13,3 %	10,2 %	9,4 %	6,9 %	10,8 %
120 min Reperfusion	14,8 %	24,7 %	14,0 %	9,9 %	14,6 %	4,4 %

4.6.2. Quantitative Analyse der CD4+ T-Zell-abhängigen Aktivierung von Kupffer-Zellen

Um zu untersuchen, ob CD4+ T-Zellen im Gegenzug die Aktivität von Kupffer-Zellen beeinflussen, wurde die Phagozytoseaktivität von Kupffer-Zellen untersucht. Wie in den Methoden bereits dargestellt, ist die Kinetik der Latex-Beads Adhärenz ein Maß der Aktivität der Kupffer-Zellen. I/R führt zu einer eingeschränkten Phagozytoseaktivität im Vergleich zur schein-operierten Gruppe. Die Phagozytoseaktivität ist in CD4+ T-Zell-defizienten Tieren stärker eingeschränkt als im Vergleich zur Wildtyp Gruppe.

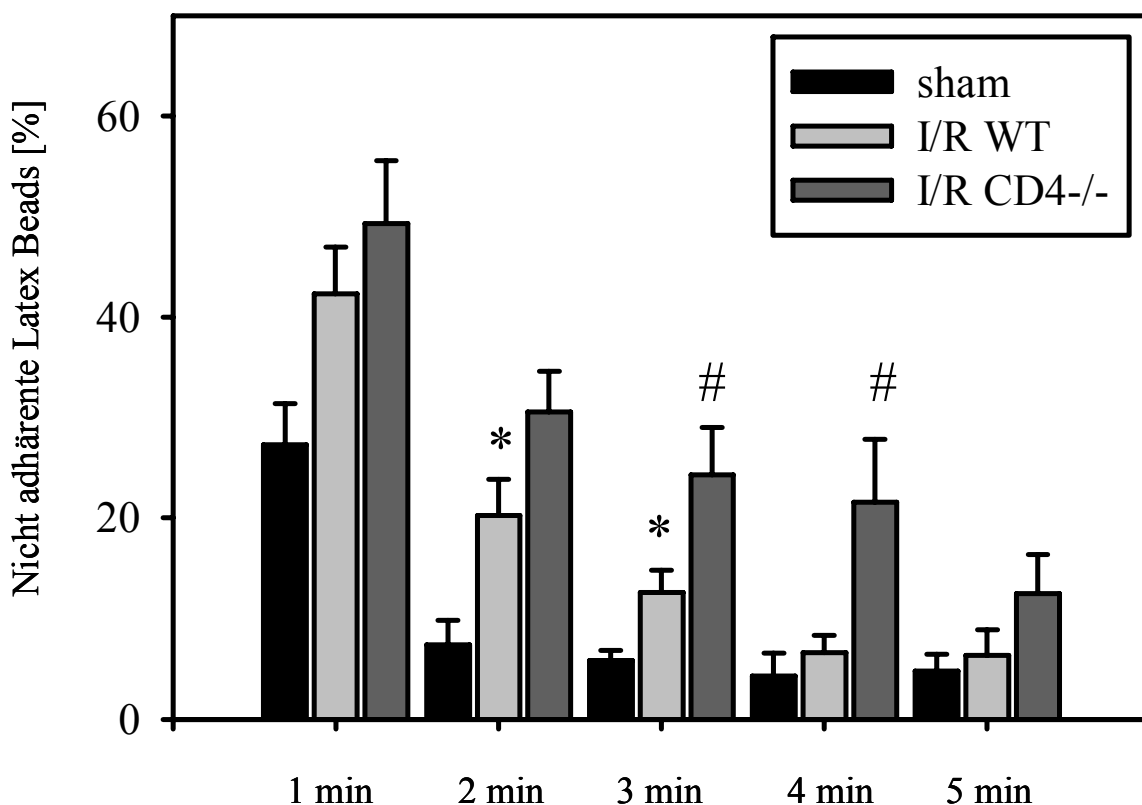


Abb. 28: Quantitative Analyse der Phagozytoseaktivität von Kupffer-Zellen. I/R führt zu einer eingeschränkten Phagozytoseaktivität. Im Vergleich zur schein-operierten Gruppe ist die Anzahl nicht adhärenter Latex-Beads erhöht, 2 und 3 Minuten nach Applikation der Latex-Beads sogar signifikant. Die Phagozytoseaktivität ist in CD4- T-Zell-defizienten Tieren stärker eingeschränkt als im Vergleich zur Wildtyp Gruppe. * $p < 0,05$ vs. sham, # $p < 0,05$ vs. I/R WT (I/R: Ischämie-Reperfusion; WT: Wild-Typ)

5. DISKUSSION

5.1. Diskussion der Methodik

5.1.1. Versuchstiere

Im Rahmen dieser Dissertationsarbeit wurden die Mechanismen einer CD4⁺ T-Zell-Interaktion mit dem postischämischen hepatischen Endothel untersucht. Um den Typ, die mikrovaskuläre Lokalisation und die Kinetik der T-Zell-Endothelzell-Interaktionen in den postischämischen hepatischen Mikrogefäßen *in vivo* darzustellen, bedienten wir uns des Tiermodells. Nach selektiver Anfärbung zellulärer Komponenten durch Fluoreszenzfarbstoffe ist im Tiermodell die Visualisierung der hepatischen Mikrozirkulation mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie möglich. Für alle Experimente wurden Mäuse des Stammes C57Bl/6 gewählt. Dies ist durch folgende Vorteile des C57Bl/6 Stammes begründet: Die intravitalmikroskopische Analyse der hepatischen Mikrozirkulation ist dem Kleintiermodell (Maus, Ratte, Hamster) vorbehalten, da Lebergröße und Dicke der Leberkapsel limitierend wirken. Die Spezies der Maus ist immunologisch sehr gut charakterisiert, es sind zahlreiche Antikörper gegen Mausantigene kommerziell erhältlich. Darüber hinaus erlauben eine Vielzahl von gentechnisch veränderten, defizienten Tieren (z.B. P-Selektin, CD4, CD28, CD40L) die selektive und isolierte Analyse molekularer und humoraler Mechanismen, die für die Regulation der CD4⁺ T-Zell-Endothelzell-Interaktion von Bedeutung sind. So konnte gezeigt werden, dass in CD4-defizienten Tieren selektiv T-Helfer Zellen fehlen und das Vorkommen zytotoxischer T-Zellen nicht kompensatorisch erhöht ist¹⁰⁰. Der Stamm der CD57Bl/6 Maus eignet sich darüber hinaus insbesondere aufgrund der anatomischen Besonderheiten seiner Leberanatomie zur intravitalmikroskopischen Untersuchung. Pathophysiologisch relevante Strukturen (präsinusoidale Arteriolen, Sinusoide, postsinusoidale Venolen) treten bis an die Oberfläche und lassen sich gut darstellen. Aufgrund tief liegender portaler Gefäße und der limitierten Eindringtiefe der Fluoreszenzmikroskopie lässt sich jedoch der portalvenöse Zustrom in diesem System nicht untersuchen⁸⁴. Ferner ist das Modell der reversiblen lobären I/R an der Maus ein etabliertes Modell zur Untersuchung der hepatischen Mikrozirkulation und in der Literatur mehrfach beschrieben^{5, 9, 46, 58, 59}. Die aufgeführten Vorteile des Mäusemodells unter Verwendung des C57Bl/6 Stammes im Einklang mit der Konstanz der Daten, insbesondere in den Kontrollgruppen, sowie der breiten Etablierung des Modells der reversiblen lobären I/R an

der Maus lassen den Schluss zu, dass ein geeignetes Modell zur Untersuchung der mikrovaskulären Mechanismen der CD4+ T-Zell-Endothelzell-Interaktion angewendet wurde.

5.1.2. Narkose und Chirurgische Technik

Die Einleitung und Aufrechterhaltung der Narkose erfolgte mittels Isofluran, welches gegenüber anderen Inhalationsanästhetika kaum hepatisch metabolisiert wird. Des Weiteren gibt es bisher keine Hinweise auf eine Hepatotoxizität bei Verwendung von Isofluran. Wie in vorherigen Studien bereits belegt, ist das angewandte experimentelle Protokoll makro- und mikrohämodynamisch stabil. Es ist im Verlauf der Experimente mit keinen Veränderungen des mittleren arteriellen Druckes assoziiert, ebenso ist die mittlere sinusoidale Erythrozytenfließgeschwindigkeit in sham-operierten Tieren und Tieren nach I/R gleich⁵⁹. Ebenso wurden bei der Messung der Körpertemperatur keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen registriert. Die Temperatur ließ sich während des gesamten Versuchsablaufes zwischen 36° C und 37° C halten.

Im Rahmen der chirurgischen Präparation wurde mittels Mikroclip eine reversible Ischämie des linken Leberlappens durchgeführt. Die Platzierung des Mikroclip erfolgte nach mikrochirurgischer Anlernphase atraumatisch im Hilusbereich des linken Leberlappens und ermöglichte so eine erfolgreiche Reperfusion. Um bei liegendem Gefäßclip ein Austrocknen oder Abkühlen der abdominalen Organe zu verhindern, wurde nach Platzierung des Gefäßclips für die Zeit der Ischämie die Bauchhöhle mittels Naht verschlossen.

5.1.3. Isolierung und Markierung von T-Zellen

Um die Interaktion von T-Zellen mit dem hepatischen Endothel *in vivo* mittels intravitale Fluoreszenzmikroskopie darzustellen, wurden T-Zellen von syngenem Spendertieren isoliert und *ex vivo* mittels CFDA-SE markiert. Dies garantierte eine ausreichende Beladung der T-Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff und ermöglichte das reproduzierbare Gewinnen einer definierten Anzahl markierter T-Zellen.

Die Isolierung der T-Zellen erfolgte aus der Milz von syngenem Spendertieren mittels magnetisch markierter CD4 bzw. CD8 Antikörper (miniMACS / *magnetic cell sorting system*) gemäß den Angaben des Herstellers. Im Rahmen eigener durchflusszytometrischer Untersuchungen konnten wir feststellen, dass unter Anwendung des miniMACS eine reproduzierbare Herstellung von T-Zell-Suspensionen mit einer Reinheit von >95% möglich war.

Intravitalmikroskopisch konnte unlängst gezeigt werden, dass die intraportale Applikation von aktivierten T-Zellen zu einer nahezu vollständigen Akkumulation der Zellen in der Leber führt⁶³. Daher stellten wir in weiteren durchflusszytometrischen Untersuchungen sicher, dass der in dieser Arbeit angewandte Separationsprozess zu keiner Aktivierung der T-Zellen führt. Hierzu wurde die Expression zellulärer Aktivitätsparameter (CD62L, CD44, CD69) auf isolierten T-Zellen mit der auf T-Zellen aus unbehandelten Blutproben von Kontrolltieren verglichen⁴⁴. Der Separationsprozess führte zu keiner Aktivierung von T-Zellen, da die Expression der Aktivitätsparameter zwischen T-Zellen aus unbehandelten Blutproben und mittels miniMACS isolierten T-Zellen gleich ist.

Mittels Propidiumiodid wurde darüber hinaus durchflusszytometrisch sichergestellt, dass die Lebensfähigkeit der Zellen nach dem Separationsprozess gegeben ist (Viability > 88% für CD8+ T-Zellen und >94% für CD4+ T-Zellen).

Zusammenfassend stellten wir in eigenen Voruntersuchungen sicher, dass die bei den Experimenten verwendeten T-Zell-Suspensionen eine Reinheit von >95% aufwiesen und lebensfähige sowie nicht aktivierte T-Zellen enthielten⁶¹.

5.1.4. Thrombozytenseparation

Ähnlich der Separation von T-Zellen wurden auch Thrombozyten aus syngeneten Spendertieren isoliert und *ex vivo* mittels Rhodamin-6G markiert, um eine ausreichende Beladung der Thrombozyten mit dem Fluoreszenzfarbstoff zu gewährleisten⁸¹. Die Separation von Thrombozyten aus Vollblut von Spendertieren fand bereits in diversen vorherigen Studien des Instituts Anwendung und erfolgte nach etabliertem Verfahren. Es konnte bereits in Vorstudien mittels Durchflusszytometrie anhand der vorliegenden Konstanz der Expression von P-Selektin gezeigt werden, dass es im Rahmen der Thrombozytenseparation zu keiner Aktivierung der Thrombozyten kommt^{57, 122}.

5.1.5. Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

Unter intravitaler Fluoreszenzmikroskopie versteht man den Einsatz fluoreszierender Farbstoffe zur selektiven Anfärbung und mikroskopischen Visualisierung von Zellen mit dem Ziel der Beobachtung ihrer Wechselwirkungen in der Mikro-zirkulation⁸⁷. Sie ist in diversen Organen (z.B. Haut⁷⁷, Darm¹¹⁷, Muskel¹⁷, Lunge¹²⁰, Bauchspeicheldrüse⁹⁸, Arterien⁸²) als etabliertes Verfahren zur Analyse der pathophysiologischen Vorgänge auf Ebene der

Mikrozirkulation beschrieben und findet Anwendung nicht nur in Modellen der I/R, sondern auch im weiteren Feld der Inflammationsforschung oder der Onkologie.

5.1.5.1. Technisches Setup

Die Durchführung der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie erfordert im Mausmodell die chirurgische Präparation des linken Leberlappens, so dass die hepatische Mikrozirkulation mit Hilfe des Objektivs visualisiert werden kann. Um eine Traumatisierung und eine dadurch herbeigeführte Induktion von Leberschäden zu vermeiden, wurde nach ausgedehnter mikrochirurgischer Anlernphase eine *no-touch* Technik zur Mobilisation des Leberlappens eingesetzt: Durch die Platzierung des Leberlappens in einem Bett aus Modelliermasse wurde eine mechanische Obstruktion der hepatischen Mikrozirkulation sowie der afferenten und efferenten Gefäße des Leberlappens während der intravitalmikroskopischen Untersuchung vermieden.

Wie aus den experimentellen Protokollen ersichtlich, wurden z. T. unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe appliziert, um eine simultane Visualisierung von verschiedenen Zelltypen in der hepatischen Mikrozirkulation zu erreichen. Dies gelang durch Wechsel des Filterblocks im Intravitalmikroskop und garantierte eine annähernd simultane Darstellung unterschiedlicher Zelltypen, z.B. Thrombozyten und T-Zellen. Darüber hinaus wurde hierdurch die Untersuchung von Zellinteraktionen ermöglicht.

Alle intravitalmikroskopischen Beobachtungen wurden mittels Videorekorder aufgezeichnet. Dies ermöglichte eine Analyse der Daten nach dem entsprechenden Versuch und verkürzte die Beobachtungszeit und damit die verwendete Lichtenergie während des Versuches erheblich. Ein möglicher phototoxischer Effekt wurde dadurch so weit als möglich reduziert^{105, 121}. Die Konstanz der Daten, insbesondere in den Kontrollgruppen, lässt schließen, dass die chirurgische Technik, die Applikation von Fluoreszenzfarbstoffen und die intravitalmikroskopische Untersuchung zu vernachlässigende Effekte auf die Induktion des I/R-Schadens der Leber ausüben.

Wie bereits angesprochen erfolgte die Analyse der mikrozirkulatorischen Daten *off-line* nach Abschluss des Experiments. Eine quantitative Auswertung der gewonnenen Bilder erfolgte nach etabliertem Verfahren mit Hilfe des computerunterstützten Auswertesystem CAMAS[®], *computer assisted microcirculation analysis system*^{5, 57, 81, 89}.

5.1.5.2. Mikrozirkulatorische Parameter

Erstmals wurde im Rahmen dieser Studie eine Analyse der Art, der mikrovaskulären Lokalisation und der Kinetik der T-Zell-Endothelzell-Interaktionen in der Leber nach I/R durchgeführt. Bisherige Studien konnten lediglich *ex vivo* immunhistologisch¹³⁹, elektronenmikroskopisch¹¹² oder im Rahmen der Beobachtung der T-Zell-Retention bei isoliert-perfundierter Leber^{20, 21} auf eine Beteiligung von CD4+ T-Zellen bei hepatischer I/R hinweisen. Die in dieser Studie durchgeführten intravitalmikroskopischen Untersuchungen erlaubten erstmals eine quantitative Analyse der T-Zell-Endothelzell-Interaktionen *in vivo* und gaben darüber hinaus erstmals Auskunft über die mikrovaskuläre Lokalisation von T-Zellen in den hepatischen Mikrogefäßen (z.B. die in der Studie beschriebene Emigration von T-Zellen) und über die Interaktion von CD4+ T-Zellen mit Thrombozyten in der hepatischen Mikrozirkulation.

Eine Beteiligung von Thrombozyten an den Pathomechanismen der hepatischen I/R wurde initial ebenfalls *ex vivo* beobachtet^{25, 26, 135}. In aktuellen Studien wurde intravitalmikroskopisch die mikrovaskuläre Lokalisation von akkumulierten Thrombozyten nach hepatischer I/R beschrieben und eine Abhängigkeit von P-Selektin sowie ICAM-1 ausgemacht⁵⁷⁻⁵⁹. Im Rahmen unserer Studie gelang es erstmals, die Interaktion von CD4+ T-Zellen und Thrombozyten *in vivo* darzustellen, indem zwei Fluoreszenzfarbstoffe eine simultane Visualisierung der beiden Zelltypen in den hepatischen Mikrogefäßen zuließen. Darüber hinaus konnte unter Verwendung von CD4-, CD40L- und CD28-defizienten Tieren eine Abhängigkeit der postischämischen Thrombozytenrekrutierung von CD4+ T-Zellen in den hepatischen Mikrogefäßen gezeigt werden.

Nebst der quantitativen Analyse der Akkumulation und Emigration von Leukozyten in der postischämischen hepatischen Mikrozirkulation^{126, 128, 129} ist auch das sinusoidale Perfusionsdefizit ein etabliertes Maß zur Darstellung des I/R-Schadens der Leber *in vivo*^{6, 67, 85}. Im Gegensatz zur Quantifizierung des mikrovaskulären I/R-Schadens diente die Bestimmung der Serumtransaminasen der Abschätzung des hepatozellulären Schadens. Die solitäre Bestimmung des Parameters GOT erschien aufgrund seiner Präsenz in vielen verschiedenen Geweben, wie z.B. Herz¹³⁴ und Darm¹¹, als nicht repräsentativ zur Darstellung des hepatischen I/R-Schadens. Demgegenüber wird die Bestimmung von GPT als sensitiver und spezifischer Parameter von Leberschäden angesehen^{24, 119}. In Kombination spiegeln GOT und GPT zuverlässig den hepatozellulären Schaden wider¹⁹.

Um zu untersuchen, ob die Aktivierung von CD4+ T-Zellen während I/R der Leber von MHC Klasse-II-Molekülen abhängig ist, wurde in einem experimentellen Ansatz der MHC Klasse-

II-Komplex mittels Antikörper nach etabliertem Schema inhibiert^{47, 75}. Die Kontrollgruppe wurde hierbei mit einem Isotyp-Antikörper behandelt.

Die selektive Depletion von Kupffer-Zellen mittels $GdCl_3$ erlaubte die Untersuchung der $CD4^+$ T-Zell-Aktivierung in Abhängigkeit von Kupffer-Zellen. Die Applikation von $GdCl_3$ ist ein etabliertes Verfahren zur Untersuchung der Kupffer-Zell-Funktion, da zirkulierende Monozyten und andere Makrophagen gegenüber dem seltenen Erdmetall weniger anfällig sind⁴². In eigenen weitergehenden Untersuchungen konnten wir mittels Fluoreszenzmikroskopie zeigen, dass im verwendeten Modell die Applikation von $GdCl_3$ zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl von Kupffer-Zellen führt⁴¹. Neben dem Abfangen von Sauerstoffradikalen durch Glutathion nach in der Literatur beschriebener Technik⁷ wurde der Einfluss von Kupffer-Zellen auf die Aktivierung von $CD4^+$ T-Zellen auch unter Verwendung von IL-6- und TNF- α -Rezeptor-defizienten Tieren untersucht.

Mit dem Ziel, die Aktivität von Kupffer-Zellen in Abhängigkeit von $CD4^+$ T-Zellen zu untersuchen, wurde die Phagozytoseaktivität von Kupffer-Zellen in Wildtyp- und in $CD4$ -defizienten Tieren *in vivo* mittels fluoreszenzmarkierter Latex-Beads untersucht. Wie in den Methoden bereits beschrieben, führt die Applikation von Latex-Beads der Größe $1\mu m$ zu einer selektiven Phagozytose durch Kupffer-Zellen, so dass die Kinetik der Akkumulation von Latex-Beads in der postischämischen Leber ein Maß für die Phagozytoseaktivität der Kupffer Zellen darstellt¹²⁷. In Einklang mit vorherigen Ergebnissen dieser bereits etablierten Methode^{104, 127} konnten auch wir zeigen, dass die Phagozytoseaktivität in Wildtyp-Tieren nach I/R abnimmt. In dieser Dissertationsarbeit wurde erstmalig untersucht, inwieweit die Phagozytoseaktivität der Kupffer-Zellen von $CD4^+$ T-Zellen moduliert wird.

5.1.6. Versuchsprotokoll

Zur Induktion einer Ischämie des linken Leberlappens wurde das Gefäß-Nerven-Bündel über einen Zeitraum von 90 Minuten mittels Mikroclip okkludiert. Die Auswahl der Ischämiezeit folgte mehreren Studien^{58-60, 135}; es konnte gezeigt werden, dass eine Ischämie von 30-90 Minuten als klinisch relevant anzusehen ist und eine 90 Minuten dauernde Ischämie den oberen Grenzwert einer reversiblen Ischämie des linken Leberlappens darstellt. Eine Verlängerung der Ischämiezeit auf 120 Minuten führt zu einer nicht reversiblen Schädigung des hepatischen Endothels, so dass eine Untersuchung der Interaktion zwischen T-Zellen und Endothelzellen nicht mehr möglich ist.

5.2. Diskussion der Ergebnisse

Wie in der Einleitung bereits erwähnt, gewinnt die hepatische I/R nicht nur während der Transplantation der Leber klinische Relevanz, sondern auch bei chirurgischen Manövern, die eine Unterbindung des Blutflusses im Organ bedingen. Dabei manifestiert sich der hepatische I/R-Schaden, so konnte in zahlreichen Studien gezeigt werden^{8, 22, 49, 85}, auf Ebene der Mikrozirkulation. Proinflammatorische Zytokine und Sauerstoffradikale initiieren den mikrovaskulären hepatischen I/R-Schaden und führen zu einer verstärkten Expression von Adhäsionsmolekülen mit einer konsekutiven Zunahme der Interaktionen von Neutrophilen und Thrombozyten mit dem postischämischen hepatischen Endothel^{51, 52, 57, 58}.

5.2.1. Akkumulation von CD4+ T-Zellen in der postischämischen hepatischen Mikrozirkulation

Die unerwarteten protektiven Effekte von Immunsuppressiva gaben erste Hinweise auf eine Beteiligung von Lymphozyten an der Ausbildung des antigen-unabhängigen I/R-Schadens. Kawano und Mitarbeiter zeigten eine verbesserte Überlebensrate von Ratten bei autologer orthotoper Rattenlebertransplantation durch Takrolimus- bzw. FK 506-Applikation 16 Stunden vor der Transplantation⁵⁵. Saxton und Koautoren konnten zeigen, dass die Applikation von Cyclosporin 24 Stunden vor Ischämie der Leber bei Ratten die Apoptose vermindert¹⁰⁷. Schließlich wurde 2002 veröffentlicht, dass Lymphozytendepletion mit FTY 720, einem sich in der Etablierungsphase befindlichem Immunsuppressivum, den hepatozellulären Schaden nach I/R reduziert¹. Erste Hinweise auf eine Beteiligung von Lymphozyten bei I/R gaben Untersuchungen im Modell der isoliert-perfundierten Rattenleber²¹. Nachdem eine definierte Anzahl an Lymphozyten zugegeben wurde, zeigte sich, dass nach kalter hepatischer Ischämie die Lymphozytenzahl im Perfusat abnimmt. Eine Verlängerung der Ischämiezeit verstärkte diese Abnahme. Auch mittels Immunfluoreszenz konnte eine T-Zell-Infiltration in der Mäuseleber nach I/R induziertem Schaden festgestellt werden¹³⁹. Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass eine T-Zell-Defizienz mit einer Reduktion des postischämischen Leberschadens einhergeht. Dieser hepatoprotektive Effekt konnte durch adoptiven Transfer von CD4- und CD8-positiven T-Zellen aufgehoben werden. In weitergehenden Studien unter Verwendung STAT-defizienter Mäuse konnte demonstriert werden, dass insbesondere Th₁-Lymphozyten eine wichtige Rolle bei der Induktion des hepatischen Ischämie-Reperfusionsschadens spielen¹¹⁵. STAT- (*signal transducer and activator of transcription*) Proteine sind Transkriptionsfaktoren, die eine Verbindung

zwischen Zytokinrezeptor und Zytokin-induzierter Transkription herstellen. Nur eine Stat6-Defizienz, die mit einer eingeschränkten Zellfunktion von Th₁-Zellen einhergeht, führt zu einer Hepatoprotektion, gemessen am Serum GPT. Die aufgeführten Studien geben Hinweise darauf, dass Th₁-Zellen eine wichtige Rolle bei der Induktion des hepatischen I/R-Schadens spielen.

Jedoch liegen über die Mechanismen einer T-Zell-Endothelzell-Interaktion bisher keine Daten vor. Ebenso sind die mikrovaskuläre Lokalisation, die Kinetik und die Art der Interaktion von T-Zellen mit dem postischämischen hepatischen Endothel bisher unklar. Die vorliegende Dissertationsarbeit zeigt zum ersten Mal *in vivo* die Interaktion von T-Zellen mit dem hepatischen Endothel nach I/R-induziertem Schaden und untersucht die beteiligten Subpopulationen von T-Zellen sowie die mikrovaskuläre Lokalisation, die Kinetik und die Art einer solchen Interaktion.

CD4⁺ T-Zellen akkumulieren nach I/R überwiegend in hepatischen Sinusoiden und nur zu geringem Teil in postsinusoidalen Venolen. Die Anzahl akkumulierter CD4⁺ T-Zellen in Sinusoiden ist nach 30- und nach 120-minütiger Ischämie und nachfolgender Reperfusion signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erhöht, in postsinusoidalen Venolen ist die Anzahl akkumulierter CD4⁺ T-Zellen nur tendenziell erhöht. Das endotheliale Repertoire an Adhäsionsmolekülen, das eine Akkumulation von CD4⁺ T-Zellen in den Sinusoiden medieren kann, beinhaltet neben der konstitutiven Expression von VAP-1 auch die v. a. im Rahmen der Inflammation verstärkte Expression von ICAM-1, VCAM-1 und PECAM (CD31)^{33, 72, 73}. Trotz des Fehlens von Selektinen in sinusoidalen Gefäßen findet hier eine verstärkte Akkumulation von CD4⁺ T-Zellen statt. Zum einen liegt in den Sinusoiden neben räumlicher Enge (Diameter der Sinusoide ca. 6-20 µm) ein langsamerer Blutfluss als in Arteriolen und Venolen vor^{65, 73}, zum anderen zeigen sinusoidale Endothelzellen Charakteristika von antigenpräsentierenden Zellen⁷⁸.

Die Anzahl postischämisch akkumulierter CD8⁺ T-Zellen ist, im Gegensatz zu CD4⁺ T-Zellen, nicht signifikant erhöht. Dies betont die in der Literatur bereits mehrfach zugesprochene Rolle von CD4⁺ T-Zellen als Mediatoren in der Induktion des hepatischen I/R Schadens^{13, 70, 73}. Im Gegensatz zu CD8⁺ T-Zellen zeigen überwiegend CD4⁺ T-Zellen die Fähigkeit der Expression induzierbarer kostimulatorischer Moleküle⁶⁹. Dieses, so konnte in der vorliegenden Studie gezeigt werden, unterstützt maßgeblich die Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen während der alloantigen-unabhängigen Aktivierung im Rahmen der hepatischen I/R. Ein weiterer Aspekt, welcher die selektive Akkumulation von CD4⁺ T-Zellen in postischämischen Sinusoiden unterstützt, ist, dass sinusoidale Endothelzellen Charakteristika

von antigenpräsentierenden Zellen zeigen ⁷⁸. Dabei ist zu betonen, dass das zentrale Dogma der 2-Signal Aktivierung (MHC-Klasse-II-Molekül und kostimulatorisches Signal) von CD4-Lymphozyten durch antigenpräsentierende Zellen nicht mehr gilt ⁶⁹. In der vorliegenden Studie wird anhand der Verwendung von MHC-II-Antikörpern *in vivo* demonstriert, dass kostimulatorische Signale CD4+ T-Zellen unabhängig einer Antigenpräsentation aktivieren können.

Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, findet die Akkumulation von CD4+ T-Zellen in hepatischen Sinusoiden früh während der Reperfusion statt. Es gibt Hinweise darauf, dass diese frühe Akkumulation maßgeblich die Ausbildung des hepatischen I/R-Schadens beeinflusst. So konnte nachgewiesen werden, dass CD4+ T-Zellen an der postischämischen Akkumulation der Neutrophilen beteiligt sind ¹². Dieses wird vermutlich über IL-17 getriggert, welches fast ausschließlich von aktivierten CD4+ T-Zellen freigesetzt wird und immunmodulatorische Effekte aufweist ¹³⁶.

CD4+ T-Zellen emigrieren während hepatischer I/R. Unter Verwendung von anti-ICAM-1- und anti-VAP-1-Antikörpern konnte gezeigt werden, dass diesen Adhäsionsmolekülen eine Bedeutung bei der transendothelialen Emigration von Lymphozyten zukommt. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass Blockade von VAP-1 die Transmigration von Lymphozyten durch Monolayer von sinusoidalen Endothelzellen *in vitro* komplett blockiert ⁷². Neben Adhäsionsmolekülen kommt dem Vorhandensein von endothelialen Zytokinen eine besondere Bedeutung während der Emigration zu. Nicht nur chemotaktische Effekte werden hierdurch ausgelöst, sondern auch Prozesse der Emigration an sich gesteuert. So fördern Zytokine z.B. das „*spreading*“ von Lymphozyten vor der Emigration ¹⁸. Interessanterweise, so konnten wir in weitergehenden Studien zeigen, unterstützt JAM-A (*junctional adhesion molecule-A*) nicht die Emigration von CD4+ T-Zellen, während eine JAM-Defizienz mit einer signifikanten Reduktion der Emigration von neutrophilen Granulozyten einhergeht ⁶². Dabei geht die attenuierte Emigration von Leukozyten nicht mit einer Reduktion des I/R Schadens einher, die Beteiligung von CD4+ T-Zellen bei der Ausbildung des hepatischen I/R Schadens wird durch diese Erkenntnisse untermauert.

In dieser Arbeit gelang es erstmals, die Interaktion von T-Zellen mit dem Endothel in der Leber nach I/R *in vivo* zu visualisieren und quantitativ zu analysieren. Es konnte gezeigt werden, dass die Anzahl akkumulierter CD4+ T-Zellen in Sinusoiden signifikant nach I/R zunimmt. Dieses erfolgt früh während der Reperfusion und setzt kein Rolling der Zellen voraus. Das fehlende Rolling wird durch die fehlende Expression von P-Selektin auf sinusoidalen Endothelzellen erklärt ³⁴. Mittels Intravitalmikroskopie konnte darüber hinaus

gezeigt werden, dass bereits nach 30 Minuten Reperfusion CD4⁺ T-Zellen in den perivaskulären Raum emigrieren. Dabei führt eine Verlängerung der Reperfusionszeit zu einer signifikanten Zunahme der Emigration. Im Gegensatz zu CD4⁺ T-Zellen ist die postischämische Rekrutierung von CD8⁺ T-Zellen in allen Segmenten der hepatischen Mikrozirkulation gering.

5.2.2. Beteiligung von CD4⁺ T-Zellen an der Ausbildung des I/R-Schadens der Leber

5.2.2.1. Interaktion von CD4⁺ T-Zellen mit Thrombozyten

Da die Akkumulation von Thrombozyten in der postischämischen hepatischen Mikrozirkulation ein wesentliches Element der Induktion des mikrovaskulären und hepatozellulären Schadens nach I/R der Leber darstellt^{26, 57-59, 118}, haben wir untersucht, inwieweit CD4⁺ T-Zellen an der Interaktion von Thrombozyten mit dem hepatischen Endothel beteiligt sind. Im Gegensatz zu Wildtyp-Mäusen war die postischämische Akkumulation von Thrombozyten in CD4-defizienten Tieren signifikant geringer. Darüber hinaus konnten wir zeigen, dass circa 30 % der akkumulierten CD4⁺ T-Zellen mit Thrombozyten in den Sinusoiden kolokalisiert sind. Es sind daher zwei Mechanismen zu diskutieren, die zu einer verstärkten Thrombozytenakkumulation durch Einfluss von CD4⁺ T-Zellen führen. Zum einen können, wie bereits *in vitro* gezeigt wurde²⁷, Thrombozyten direkt an CD4⁺ T-Zellen binden. Zum anderen könnten akkumulierte CD4⁺ T-Zellen lokal das hepatische Endothel durch Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren wie TNF- α , IFN- γ oder G-CSF aktivieren. Dies führt zu einer verstärkten Expression sowie Mobilisation von Adhäsionsmolekülen und einer konsekutiven Fibrinogendeposition. Diese Mechanismen protegieren in der Folge eine verstärkte Akkumulation von Thrombozyten^{57, 58}.

Um die Mechanismen einer direkten Interaktion von Thrombozyten und CD4⁺ T-Zellen während hepatischer I/R zu untersuchen, wurden intravitalmikroskopische Experimente durchgeführt, die eine Analyse der Kolokalisation zwischen Thrombozyten und CD4⁺ T-Zellen erlauben. Die Beteiligung kostimulatorischer sowie Adhäsionsmoleküle an der Ausbildung des hepatischen I/R-Schadens wurde unter Verwendung defizienter Tiere analysiert. Während CD4⁺ T-Zellen die kostimulatorischen Moleküle CD40Ligand als auch CD28 exprimieren und Thrombozyten die kostimulatorischen Moleküle CD40Ligand (bei aktivem Status) als auch CD40 exprimieren, finden sich auf sinusoidalen Endothelzellen die Rezeptoren CD40 und B7. In dieser Studie wurde die Rolle dieser kostimulatorischen

Moleküle auf die Interaktion von Thrombozyten mit CD4⁺ T-Zellen und sinusoidalen Endothelzellen untersucht.

Die Anzahl kolokalisierter Zellen in Sinusoiden ist im Falle von CD40Ligand-defizienten CD4⁺ T-Zellen und CD40Ligand-defizienten Thrombozyten gegenüber Wildtyp-Zellen tendenziell vermindert. Dieses deutet darauf hin, dass der CD40Ligand eine Rolle bei Thrombozyten-CD4⁺ T-Zell-Interaktionen spielt. Bestätigt wird dieser Hinweis dadurch, dass eine CD40Ligand-Defizienz, wie diese Studie zeigen konnte, zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl postischämisch adhärenter Thrombozyten im Vergleich zur Wildtyp-Gruppe führt. Erklärungsansätze bieten Hinweise aus der Literatur. CD40Ligand, ausgeschüttet von Lymphozyten und Thrombozyten², kann über α_{IIb}/β_3 -Integrinrezeptoren eine direkte Aktivierung von Thrombozyten hervorrufen⁹⁷. Neben einer spezifischen Hochregulation von Thrombozyten-relevanten Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen^{68, 108} kann der CD40Ligand hinzukommend auch das Milieu der Zytokine beeinflussen. Er stimuliert die Sekretion von Interleukin-8, MIP-1 (*macrophage inflammatory protein-1*) und RANTES und bietet somit auch Potential zur Beeinflussung der Emigration von Leukozyten in der postischämischen hepatischen Mikrozirkulation^{110, 111}. Diese Studie demonstriert, dass CD4⁺ T-Zellen CD40Ligand-abhängig an der Thrombozytenakkumulation nach hepatischer I/R beteiligt sind.

Aber auch die Verbindung der kostimulatorischen Moleküle CD28-B7 ist an den CD4⁺ T-Zell-induzierten Mechanismen im Rahmen der hepatischen I/R beteiligt. Nicht nur die Anzahl der akkumulierten Thrombozyten ist in CD28-defizienten Tieren signifikant gegenüber der Kontrollgruppe geringer, sondern auch das sinusoidale Perfusionsdefizit und die Anzahl der emigrierten Leukozyten. Eine direkte Thrombozytenaktivierung durch CD4⁺ T-Zellen über kostimulatorische CD28-B7 Verbindung kann aufgrund des Fehlens von B7 Molekülen auf Thrombozyten nicht stattfinden. Die in dieser Studie beobachteten Auswirkungen einer CD28-Defizienz lassen daher vermuten, dass CD4⁺ T-Zellen maßgeblich an der initialen Aktivierung des sinusoidalen Endothels über die kostimulatorische Verbindung CD28-B7 beteiligt sind. Im Rahmen dieser Aktivierung kann es zu einer verstärkten Thrombozytenakkumulation kommen. Die akkumulierten Thrombozyten könnten dann, so gibt es Hinweise in der Literatur, im Sinne einer positiven Feedback-Schleife über die Ausschüttung von RANTES zur einer verstärkten Aktivierung und Akkumulation von CD4⁺ T-Zellen führen²⁷.

Da die kostimulatorischen Moleküle CD40-CD40Ligand keine feste Adhäsion zwischen CD4⁺ T-Zellen und Thrombozyten erklären können, wurde in einem Teil dieser Studie der

Frage nachgegangen, ob P-Selektin auf Thrombozyten und PSGL-1 auf CD4⁺ T-Zellen eine feste Adhäsion zwischen beiden Zellarten bedingen können. Die Tatsache, dass eine P-Selektin-Defizienz auf Thrombozyten zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl von Kolokalisationsereignissen zwischen CD4⁺ T-Zellen und Thrombozyten führt, deutet darauf hin, dass thrombozytäres P-Selektin an der festen Interaktion zwischen CD4⁺ T-Zellen und Thrombozyten beteiligt ist. Der Befund, dass es bei einer CD40Ligand-Defizienz auf Thrombozyten und CD4⁺ T-Zellen zu einer tendenziellen Reduktion der Kolokalisationsereignisse zwischen den beiden Zellarten kommt, lässt sich am ehesten dadurch begründen, dass die kostimulatorische Verbindung zwischen CD40-CD40Ligand zu einer verstärkten Expression von thrombozytärem P-Selektin führt⁴⁸.

5.2.2.2. Beteiligung von CD4⁺ T-Zellen an der Ausbildung des mikrovaskulären und hepatozellulären Schadens nach I/R

CD4⁺ T-Zellen beeinflussen die Akkumulation und Emigration von neutrophilen Granulozyten in der postischämischen hepatischen Mikrozirkulation. Dieses konnte die vorliegende Arbeit anhand der quantitativen *in vivo* Analyse der Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen sowie der histologischen Quantifizierung der Neutrophilenemigration nachweisen. Dieser Sachverhalt wurde bisher in der Literatur lediglich als Hypothese formuliert und nicht quantitativ analysiert^{12, 139}. In dieser Dissertationsschrift wurde darüber hinaus erstmals nachgewiesen, dass die Beteiligung von CD4⁺ T-Zellen an der Rekrutierung von Leukozyten in der postischämischen hepatischen Mikrozirkulation von den kostimulatorischen Signalwegen CD40-CD40Ligand und CD28-B7 abhängig ist. Hierdurch werden Literaturangaben bestätigt, die zeigen konnten, dass im Falle einer CD40Ligand-Defizienz in postischämischen Lebern die Myeloperoxidaseaktivität signifikant reduziert ist¹¹⁴ und dass eine CD28-Inaktivierung zu einer signifikanten Reduktion der Makrophageninfiltration in postischämischen Nieren führt¹²⁴.

Wie in dieser Arbeit aufgeführt werden konnte, wird die Emigration von neutrophilen Granulozyten insbesondere über CD40L vermittelt. Die Emigration von Neutrophilen, so konnte hier gezeigt werden, ist in CD40L-defizienten Tieren fast vollständig aufgehoben. Einen möglichen Erklärungsansatz hierfür bieten Daten aus der Literatur, die belegen, dass CD40L auf die hepatische Expression und Sekretion von IL-8, MIP-1 und RANTES Einfluss nimmt^{110, 111}. Weitere Daten in der aktuellen Literatur unterstreichen, dass CD4⁺ T-Zellen die Emigration von neutrophilen Granulozyten modulieren und steuern: Es konnte gezeigt werden, dass die Ausschüttung von IL-17 durch aktivierte CD4⁺ T-Zellen über die

Produktion von MIP-2 zu einer Zunahme der Anzahl emigrierter neutrophiler Granulozyten nach hepatischer I/R führt¹².

Nebst der Beeinflussung der Leukozytenrekrutierung modulieren CD4⁺ T-Zellen auch die Ausbildung des mikrovaskulären I/R-Schadens der Leber. Das sinusoidale Perfusionsdefizit ist ein quantitativ messbares Korrelat des mikrovaskulären Schadens, die Verlegung der Sinusoide wird als wesentlicher Faktor des mikrovaskulären Schadens angesehen⁸⁵. Dabei führt nicht nur eine mechanische Obstruktion der Sinusoide durch Akkumulation von Leukozyten und Thrombozyten zu dessen Verlegung^{57, 59}, sondern die im Zuge dessen freigesetzten proinflammatorischen Mediatoren führen zu einer ödematösen Verdickung der Zellwände bzw. des sinusoidalen Endothels¹³¹. Der protektive Effekt einer CD4-Defizienz auf die Ausbildung des hepatischen mikrovaskulären Schaden nach I/R ist am ehesten als Konsequenz einer verminderten Leukozyten- und Thrombozytenakkumulation und das konsekutive Fehlen der freigesetzten proinflammatorischen Mediatoren zu betrachten. Ähnlich wie für Leukozyten konnte nämlich für Thrombozyten gezeigt werden, dass diese an der Ausbildung des hepatischen I/R-Schadens beteiligt sind^{57, 59}, vermutlich aufgrund der Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren und freier Radikale¹³¹. Darüber hinaus konnten wir im Rahmen der Versuche beobachten, dass intrasinusoidal gelegene CD4⁺ T-Zellen in der Lage sind, eine mechanische Obstruktion der Sinusoide hervorzurufen.

Schließlich beeinflussen CD4⁺ T-Zellen auch die Ausbildung des hepatozellulären Schadens nach I/R. Der hepatische I/R-Schaden manifestiert sich in letzter Instanz in Form von nekrotischem Zelltod und geht einher mit Erhöhung der Transaminasenwerte⁴⁰. In dieser Arbeit konnte demonstriert werden, dass CD4⁺ T-Zellen über kostimulatorische Wege (CD40-CD40Ligand und CD28-B7) an der Ausbildung des hepatozellulären Schadens nach I/R beteiligt sind. Dieser Befund steht in Einklang mit Daten aus der Literatur. Hier konnte z.B. gezeigt werden, dass auch zur Ausbildung des I/R-Schadens der Niere kostimulatorische Verbindung über CD28-B7 stattfinden muss¹²⁴.

5.2.2.3. Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen während der alloantigen-unabhängigen hepatischen I/R

Unklar bleibt jedoch, wie CD4⁺ T-Zellen in diesem Setting aktiviert werden, um die o. g. Mechanismen zu induzieren. Eine Möglichkeit ist, dass sich durch Hypoxie und Sauerstoffradikale degradierte Proteine als Antigene präsentieren und somit zu einer T-Zell-Aktivierung im Rahmen der I/R führen. Jedoch zeigt unsere Studie, dass eine T-Zell-

Aktivierung während I/R der Leber unabhängig von MHC Klasse II-Molekülen stattfindet. Wie in der Einleitung bereits erwähnt, setzt die Regulation der meisten T-Zell-Rezeptor-induzierten Gene keine Bindung des T-Zell-Rezeptor zum MHC Klasse II Molekül voraus, sondern kann alleinig über kostimulatorische Moleküle stattfinden^{102, 103}. Einen weiteren Erklärungsansatz zur alloantigen-unabhängigen Aktivierung von T-Zellen bieten zahlreiche Studien über den Einfluss von proinflammatorischen Mediatoren auf T-Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass CCL 5 (RANTES) zu einer Mobilisierung von Calcium und damit zu einer Aktivierung von T-Zellen führt³. Sauerstoffradikale können NF-κB-Signalwege in T-Zellen aktivieren⁶⁶, während auch IL-6 in der Abwesenheit von Antigenen T-Zellen aktivieren kann⁵⁴. In einer aktuellen immunhistologischen Studie wird hinzukommend davon ausgegangen, dass Chemokine wie z.B. CXCL 9, 10 und 11 direkt an der Aktivierung und Beeinflussung der Funktion von CD4+ T-Zellen während I/R beteiligt sind¹³⁸.

Der Aktivierung von CD4+ T-Zellen durch kostimulatorische Moleküle, wie z.B. CD28, unabhängig einer T-Zell-Rezeptor-MHC Klasse II-Interaktion¹⁰³ kommt eine besondere Bedeutung zu. Denn *vice versa* konnte gezeigt werden, dass sich auch antigenpräsentierende Zellen in der Expression von Adhäsionsmolekülen und Ihrem Aktivitätsstatus über kostimulatorische Moleküle, z.B. über das CD40 Molekül, beeinflussen lassen³⁵. Diese Erkenntnisse sind von Bedeutung im Kontext einer CD4+ T-Zell-Beteiligung am mikrovaskulären und hepatozellulären Schaden nach I/R, da gezeigt werden konnte, dass sinusoidale Endothelzellen der Leber alle Charakteristika von antigenpräsentierenden Zellen aufweisen⁷⁸. Während CD4+ T-Zellen die kostimulatorischen Moleküle CD40Ligand als auch CD28 exprimieren und Thrombozyten die kostimulatorischen Moleküle CD40Ligand (bei aktivem Status) als auch CD40 exprimieren, finden sich auf sinusoidalen Endothelzellen die Rezeptoren CD40 und B7. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass Interaktionen über diese kostimulatorischen Moleküle und die damit verbundene Aktivierung von CD4+ T-Zellen Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen sowie die Emigration von Leukozyten beeinflussen und damit an der Ausbildung des hepatischen zellulären und mikrovaskulären I/R Schadens beteiligt sind.

Das Konzept der Interaktion zwischen CD4+ T-Zellen, Thrombozyten und dem hepatischen sinusoidalen Endothel ist in der folgenden Abbildung (Abb. 25) nochmals dargestellt und gegenüber der Einleitung erweitert. Hinweise in der Literatur deuten darauf hin, dass das konstitutiv exprimierte kostimulatorische Molekül CD28 die Expression von CD40Ligand beeinflusst und die kostimulatorische Verbindung CD40-CD40Ligand wiederum den Gegenspieler des CD28 Moleküls, die B7-Moleküle, beeinflusst^{37, 69}.

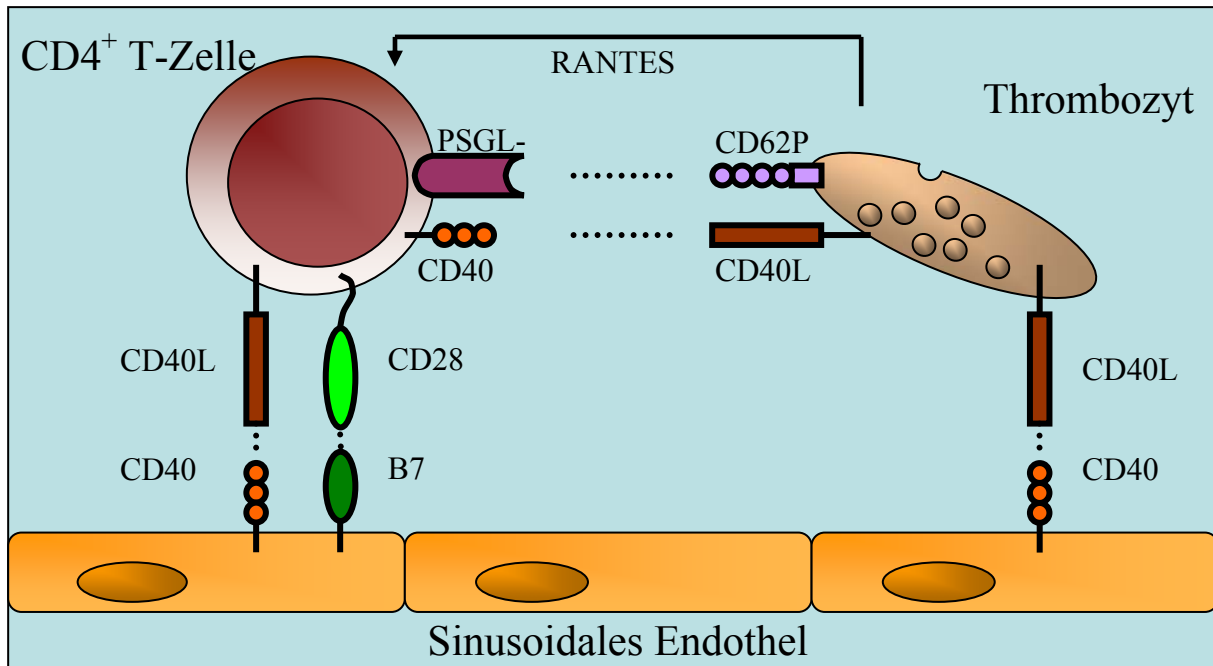


Abb. 25: Potentielle Interaktion zwischen CD4⁺ T-Zellen, Thrombozyten und dem sinusoidalen Endothel nach hepatischer I/R. CD4⁺ T-Zellen werden über kostimulatorische Verbindung mit dem sinusoidalen Endothel *via* CD40-CD40Ligand und CD28-B7 aktiviert. Die feste Adhäsion von Thrombozyten an CD4⁺ T-Zellen über P-Selektin-vermittelte Mechanismen erlaubt die Interaktion kostimulatorischer Moleküle zwischen den beiden Zellarten. Durch die in diesem Rahmen stattfindende Aktivierung von Thrombozyten werden proinflammatorische Mediatoren ausgeschüttet, wie z.B. RANTES, welche die Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen positiv verstärken. CD4⁺ T-Zellen und Thrombozyten aktivieren darüber hinaus über kostimulatorische Moleküle und über die Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren das sinusoidale Endothel. Dieses führt über verstärkte Expression von Adhäsionsmolekülen zu einer Zunahme der CD4⁺ T-Zell- und Thrombozytenakkumulation.

5.2.3. Interaktion von CD4⁺ T-Zellen und Kupffer-Zellen während hepatischer Ischämie-Reperfusion

Die Mechanismen einer alloantigen-unabhängigen Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen während I/R werden in der Literatur intensiv diskutiert. Freie Sauerstoffradikale, RANTES, IL-6 und Toll-Rezeptor-vermittelte Wege können T-Zellen *in vitro* aktivieren^{3, 13, 54, 66, 116}. Ebenso wird der Effekt lokal freigesetzter Chemokine auf die Aktivierung von T-Zellen während I/R diskutiert. Kürzlich konnte mittels Immunhistologie gezeigt werden, dass die Chemokine CXCL 9, 10 und 11 an der Akkumulation von CXCR3+CD4⁺ T-Zellen in der postschämischen hepatischen Mikrozirkulation beteiligt sind¹³⁸.

Diverse Studien haben in der Vergangenheit die Hypothese diskutiert, dass die Interaktion von Kupffer-Zellen und CD4⁺ T-Zellen ein wesentliches Element der Ausbildung des

hepatischen I/R-Schadens darstellt^{50, 74, 139}. In der Tat besteht seitens der Kupffer-Zellen mit dem breiten Repertoire an proinflammatorischen Mediatoren, die während hepatischer I/R ausgeschüttet werden, ein großes Potential zur Interaktion mit anderen Zellen^{51, 53}. So werden von Kupffer-Zellen nicht nur die proinflammatorischen Mediatoren TNF- α , IL-1 α und IL-6 freigesetzt¹³², sondern auch Sauerstoffradikale⁷.

5.2.3.1. Aktivierung von CD4+ T-Zellen durch Kupffer-Zellen während hepatischer I/R

Im ersten Schritt der Analyse der Interaktion von CD4+ T-Zellen und Kupffer-Zellen wurde untersucht, inwieweit Kupffer-Zellen an der Aktivierung von CD4+ T-Zellen während I/R der Leber beteiligt sind. Die Depletion von Kupffer-Zellen mittels GdCl₃ führte zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl akkumulierter CD4+ T-Zellen nach I/R. Die Applikation von GdCl₃ ist ein etabliertes Verfahren zur Depletion von Kupffer-Zellen *in vivo*, es konnte gezeigt werden, dass Monozyten und andere Makrophagen in ihrer Funktion von GdCl₃ nicht beeinflusst werden^{42, 51, 64, 130}. GdCl₃ führt hierbei nicht nur zu einer Blockade der Phagozytoseaktivität der Kupffer-Zellen¹⁵, sondern führt auch zu einer Verminderung der Anzahl der Kupffer-Zellen im Lebergewebe^{56, 90, 93}. In eigenen weitergehenden Studien konnten wir zeigen, dass in unserem Modell in der Tat Monozyten nicht in ihrer Anzahl durch die Applikation von GdCl₃ vermindert werden. Darüber hinaus konnten wir mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie quantitativ nachweisen, dass in dem verwendeten Modell eine signifikante Reduktion der Anzahl von Kupffer-Zellen nach Applikation von GdCl₃ auftritt⁴¹.

Die vorliegende Schrift konnte zeigen, dass Kupffer-Zellen nicht nur durch die Freisetzung freier Sauerstoffradikale, sondern auch durch die Ausschüttung proinflammatorischer Mediatoren wie TNF- α und IL-6 zu einer Aktivierung von CD4+ T-Zellen während hepatischer I/R beitragen: Nicht nur nach dem Abfangen von Sauerstoffradikalen mittels Glutathion, sondern auch nach selektiver Unterbrechung der Signaltransduktion von TNF- α und IL-6 wurde ein signifikanter Rückgang der Anzahl akkumulierter CD4+ T-Zellen in den hepatischen Sinusoiden nach I/R beobachtet. Darüber hinaus zeigte sich in dieser Dissertationsarbeit, dass die postischämische Emigration von CD4+ T-Zellen nach Depletion von Kupffer-Zellen, Abfangen von Sauerstoffradikalen und Unterbrechung der TNF- α - und IL-6-Signaltransduktionswege vermindert ist. Die oben genannten proinflammatorischen Mediatoren, die überwiegend von Kupffer-Zellen im Rahmen der hepatischen I/R freigesetzt werden¹³², können die verstärkte Akkumulation und Emigration von CD4+ T-Zellen in der hepatischen Mikrozirkulation entweder über direkte Aktivierung von T-Zellen bedingen, oder

über die Aktivierung des sinusoidalen Endothels. Es konnte in der Tat gezeigt werden, dass z.B. Sauerstoffradikale in der Lage sind, unabhängig der Anwesenheit von Antigenstimuli, eine Aktivierung von T-Zellen herbeizuführen⁶⁶. In weitergehenden Untersuchungen konnten wir zeigen, dass freie Sauerstoffradikale sowie die proinflammatorischen Mediatoren TNF- α und IL-6 im Rahmen der I/R der Leber die Aktivierung nicht nur von CD4+ T-Zellen, sondern auch von sinusoidalen Endothelzellen bedingen⁴¹: Die Inkubation von isolierten CD4+ T-Zellen und von sinusoidalen Endothelzellen mit den o. g. proinflammatorischen Mediatoren führte *in vitro* zu einer Aktivierung beider Zelltypen, gemessen anhand der veränderten Expression von Aktivitätsmarkern (CD4+ T-Zellen: L-Selektin, CD69, CD44; sinusoidale Endothelzellen: ICAM-1, VCAM-1, VAP-1) mittels Durchflusszytometrie. Darüber hinaus konnten wir immunhistochemisch zeigen, dass die postischämisch verstärkte Expression von VAP-1 nach Depletion von Kupffer-Zellen vermindert ist.

Die aktuelle Literatur identifiziert Kupffer-Zellen als hauptsächliche Produzenten der o. g. proinflammatorischen Mediatoren (Sauerstoffradikale, TNF- α und IL-6) während hepatischer I/R^{28, 109, 125, 132}. Jedoch können diese proinflammatorischen Mediatoren auch von anderen Zelltypen in diesem Setting freigesetzt werden, wie z.B. von zirkulierenden neutrophilen Granulozyten, Monozyten oder aktivierten Thrombozyten. Eine Limitierung dieser Studie ist daher, dass diese Kupffer-Zell-unabhängige Freisetzung der proinflammatorischen Mediatoren nicht berücksichtigt wird. Dieses bedarf einer weitergehenden Betrachtung in zukünftigen Experimenten.

5.2.3.2. Aktivierung von Kupffer-Zellen durch CD4+ T-Zellen während hepatischer I/R

In einem weiteren Abschnitt der Untersuchung der Interaktion von CD4+ T-Zellen und Kupffer-Zellen während hepatischer I/R wurde analysiert, ob CD4+ T-Zellen die Phagozytoseaktivität von Kupffer-Zellen beeinflussen können. In Konkordanz mit vorhergehenden Studien konnten wir bestätigen, dass die Phagozytoseaktivität von Kupffer-Zellen nach I/R vermindert ist¹²⁷. Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass die Phagozytoseaktivität in CD4-defizienten Tieren stärker vermindert ist. Zwei potentielle Hypothesen können diesen Sachverhalt erklären: Einerseits können Unterschiede im Vorhandensein des zu phagozytierenden Materials nach I/R in Wildtyp- und CD4-defizienten Tieren zu einer stärker verminderten Phagozytoseaktivität führen. Dies erscheint jedoch unwahrscheinlich, da wir in unseren Untersuchungen zeigen konnten, dass der hepatozelluläre und der mikrovaskuläre Schaden nach I/R in CD4-defizienten Tieren sogar weniger ausgeprägt ist. Andererseits können CD4+ T-Zellen wichtige Stimulatoren der

Phagozytoseaktivität von Kupffer-Zellen darstellen. Diese Hypothese wird erstens gestützt von der Erkenntnis, dass IFN- γ , welches vornehmlich von aktivierten CD4⁺ T-Zellen freigesetzt wird, eine Aktivierung von Makrophagen und Kupffer-Zellen bedingen kann ³⁰. Darüber hinaus wurde bereits gezeigt, dass T-Zellen die Ausschüttung von TNF- α durch Kupffer-Zellen während hepatischer I/R modulieren ⁷⁴. Drittens, so konnte *in vitro* nachgewiesen werden, führen Zytokin-vermittelte Signalwege zwischen CD4⁺ T-Zellen und Kupffer-Zellen zu einer verstärkten Freisetzung von TNF- α und proinflammatorischen Mediatoren durch Kupffer-Zellen ³⁸. Zusammenfassend gibt diese Studie Hinweise darauf, dass im Rahmen der hepatischen I/R die Interaktion zwischen CD4⁺ T-Zellen und Kupffer-Zellen zu einer verstärkten Phagozytoseaktivität der Kupffer-Zellen führt.

6. SCHLUSSFOLGERUNG

Der hepatische I/R-Schaden manifestiert sich nicht nur im Rahmen der Lebertransplantation, sondern ist auch Folge Leber-erhaltender operativer Eingriffe unter Anwendung einer temporären Abbindung des Blutflusses sowie bei Trauma und Schockereignissen. Die protektiven Effekte von Immunsuppressiva auf den alloantigen-unabhängigen Schaden nach I/R gaben in der Vergangenheit wiederholt Anlass zu vermuten, dass während der Ausbildung des hepatischen I/R-Schadens eine Lymphozytenbeteiligung vorliegt. In der Tat konnten *in vitro* Studien nachweisen, dass eine postischämische Akkumulation von T-Zellen in der Leber stattfindet^{21, 139}.

In der aktuellen Arbeit wurde die Rolle von CD4+ T-Zellen während hepatischer I/R *in vivo* analysiert. Erstmals konnte über die Art, die Kinetik und die Lokalisation von CD4+ T-Zell-Endothelzell-Interaktionen Auskunft gegeben werden. Es konnte in dieser Dissertationsschrift demonstriert werden, dass CD4+ T-Zellen mit Thrombozyten während der hepatischen I/R interagieren und die Ausbildung des hepatischen I/R-Schadens über kostimulatorische Signalwege, wie CD40-CD40L und CD28-B7, modulieren. Dieses findet MHC-Klasse II-unabhängig statt. Des Weiteren konnte in diesen Untersuchungen erstmals gezeigt werden, dass eine reziproke Aktivierung von CD4+ T-Zellen und Kupffer-Zellen während hepatischer I/R stattfindet.

Die aktuell gewonnenen Daten geben Anlass, das klinische Management der I/R und der Lebertransplantation kritisch zu diskutieren. Es ist bekannt, dass die Leber in Bezug auf die immunologische Reaktion nach Transplantation ein privilegiertes Organ ist, d.h. Allografts der Leber sind resistenter gegenüber einer Abstoßungsreaktion und benötigen nur eine geringe Dosierung an Immunsuppressiva^{39, 101}. Dennoch entwickeln 60-80% der lebertransplantierten Patienten eine akute Abstoßungsreaktion, 5% der Transplantationen sind mit einer chronischen Abstoßung assoziiert^{32, 94}. Wie in der Einleitung bereits erwähnt, konnte gezeigt werden, dass 10% aller frühzeitigen Organversagen nach Lebertransplantation alleinig durch den I/R-Schaden zu erklären sind³⁶. Mittels immunhistochemischer Analyse an 8 Tage nach Transplantation gewonnenen Leberbiopsien konnte bereits 1998 gezeigt werden, dass CD4+ T-Zellen während der akuten Abstoßungsreaktion in der humanen Leber akkumulieren, trotz immunsuppressiver Therapieinduktion nach der Transplantation³². In dieser Arbeit beschrieben wir den Typ, die mikrovaskuläre Lokalisation und die Kinetik der CD4+ T-Zell-Endothelzell-Interaktion. Es konnte gezeigt werden, dass eine T-Zell-Akkumulation frühzeitig während der Reperfusion auftritt, Akkumulation und Emigration von CD4+ T-Zellen nehmen im Verlauf der Reperfusion zu. Eine frühzeitige immunsuppressive

Behandlung, möglichst noch vor Induktion der Reperfusion (d.h. während der Transplantation), erscheint somit sinnvoll und bedarf einer weiteren experimentellen und klinischen Abklärung.

Um einer Abstoßungsreaktion zu begegnen, stehen der Transplantationsmedizin aktuell diverse Immunsuppressiva zur Verfügung: Corticosteroide, Calcineurininhibitoren (Cyclosporin, Tacrolimus), Antimetabolite (MMF, Azathioprin), TOR-Inhibitoren (Sirolimus, Everolimus), Antikörper (OKT3, IL-2R, Campath 1H) und neue Immunsuppressiva, wie z.B. FTY720. Die Gratwanderung zwischen ausreichender Immunsuppression und minimaler Toxizität hat zu einer Kombinationstherapie geführt, aktuell werden bei Lebertransplantation vorwiegend Corticosteroide mit Calcineurininhibitoren sowie Antiproliferativa eingesetzt. Auch wenn die toxischen Effekte der Immunsuppressiva mittlerweile durch Dosisreduktion und angepasste Kombinationsstrategien weitgehend minimalisiert wurden, führt der Einsatz der etablierten Immunsuppressiva dennoch zu einer Suppression der Reaktion gegen alle Antigene. Zukünftiges Ziel, so ist sich die Literatur einig, besteht in der Induktion einer selektiven Toleranz gegenüber dem transplantierten Organ, während die bestehende immunologische Kapazität des Patienten unangetastet bleibt ^{83, 94}. Einen potentiellen Ansatzpunkt zur Induktion von Toleranz stellen die kostimulatorischen Signalwege (CD28-B7 und CD40-CD40L) dar ⁹⁴. In unseren eigenen Studien konnten wir zeigen, dass CD4+ T-Zellen über die kostimulatorischen Signalwege nicht nur die Aktivierung und Akkumulation von Thrombozyten, sondern auch die Ausbildung des hepatischen mikrovaskulären und hepatozellulären Schadens beeinflussen. Die präsentierten Daten unterstreichen die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen zur Optimierung immunsuppressiver Therapien bzw. zur Etablierung Toleranz-induzierender Pharmazeutika.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Die protektive Wirkung von Immunsuppressiva auf den hepatischen I/R-Schaden deutet darauf hin, dass T-Zellen bei diesem alloantigen-unabhängigen Ereignis eine Rolle spielen. Die Mechanismen der Aktivierung bzw. der mikrovaskulären Rekrutierung von CD4⁺ T-Zellen bei alloantigen-unabhängiger I/R der Leber sind jedoch weitgehend ungeklärt.

Ziele der vorliegenden Arbeit waren daher (1) die Rekrutierung von T-Zell-Subpopulationen in den postischämischen hepatischen Mikrogefäßen *in vivo* zu untersuchen, (2) die Mechanismen einer Interaktion von CD4⁺ T-Zellen und Thrombozyten während hepatischer I/R zu analysieren, (3) die Rolle von CD4⁺ T-Zellen an der Ausbildung des hepatischen I/R-Schadens zu beurteilen, (4) zu untersuchen, ob die postischämische Rekrutierung von CD4⁺ T-Zellen MHC Klasse II-abhängig stattfindet und (5) zu analysieren, ob CD4⁺ T-Zellen während hepatischer I/R mit Kupffer-Zellen interagieren.

In der vorliegenden Studie konnte erstmals *in vivo* der Typ, die mikrovaskuläre Lokalisation und die Kinetik der Lymphozyten-Endothelzell-Interaktion während hepatischer I/R intravitalmikroskopisch charakterisiert werden. So konnte gezeigt werden, dass insbesondere CD4⁺ T-Zellen, und nicht CD8⁺ T-Zellen, während I/R in der hepatischen Mikrozirkulation akkumulieren. Diese Akkumulation tritt hauptsächlich in den Sinusoiden auf, nur zu einem geringeren Teil in den postsinusoidalen Venolen. Bereits nach 30-minütiger Reperfusion ist gegenüber der schein-operierten Gruppe eine signifikante Zunahme der Anzahl akkumulierter CD4⁺ T-Zellen in den Mikrogefäßen der Leber zu beobachten, die Anzahl emigrierter CD4⁺ T-Zellen nimmt im Verlauf der Reperfusionszeit signifikant zu.

Im Rahmen der Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass CD4⁺ T-Zellen an der Ausbildung des hepatischen I/R-Schadens beteiligt sind. Über CD40L- und CD28-abhängige Signalwege ist die postischämische Akkumulation von Thrombozyten und Leukozyten in der hepatischen Mikrozirkulation von CD4⁺ T-Zellen abhängig. Darüber hinaus wird die Ausbildung des mikrovaskulären Schadens, gemessen anhand des sinusoidalen Perfusionsdefizites, sowie die Ausbildung des hepatozellulären Schadens, gemessen anhand der hepatischen Transaminasen, CD40L- und CD28-abhängig über CD4⁺ T-Zellen mediiert.

Mittels simultaner Visualisierung zweier Zellpopulationen *in vivo* konnte in dieser Dissertationsschrift erstmals nachgewiesen werden, dass CD4⁺ T-Zellen und Thrombozyten während hepatischer I/R kolokalisieren. Unter Verwendung P-Selektin- und CD40L-defizienter Mäuse konnte *in vivo* nachgewiesen werden, dass eine feste Adhärenz zwischen Thrombozyten und CD4⁺ T-Zellen über P-Selektin und PSGL-1 vermittelt wird, während die

kostimulatorischen Moleküle CD40 und CD40L eine reziproke Aktivierung unter Thrombozyten und CD4⁺ T-Zellen bedingen.

In einem weiteren Abschnitt dieser Studie konnte unter Verwendung von blockierenden Antikörpern schließlich erstmals *in vivo* gezeigt werden, dass die im Rahmen der hepatischen I/R stattfindende Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen MHC-Klasse II-unabhängig abläuft.

Schließlich wurde in einem weiteren Abschnitt dieser Dissertationsschrift erstmals *in vivo* nachgewiesen, dass eine reziproke Aktivierung von Kupffer-Zellen und CD4⁺ T-Zellen während hepatischer I/R vorliegt. Die Anzahl postischämisch akkumulierter CD4⁺ T-Zellen ist nicht nur nach vollständiger Depletion von Kupffer-Zellen, sondern auch nach selektiver Unterbindung der Signalwege über TNF- α und IL-6 sowie des Abfangens freier Sauerstoffradikaler signifikant vermindert. *Vice versa* konnte hier Anhand der Untersuchung der Phagozytoseaktivität von Kupffer Zellen mittels Latex-Beads gezeigt werden, dass CD4⁺ T-Zellen die Aktivität von Kupffer-Zellen beeinflussen. Weitergehende Untersuchungen zur reziproken Aktivierung von Kupffer-Zellen und CD4⁺ T-Zellen konnten unter Verwendung von Durchflusszytometrie zeigen, dass proinflammatorische Mediatoren wie TNF- α und IL-6, vornehmlich freigesetzt durch Kupffer-Zellen während hepatischer I/R, nicht nur direkt aktivierend auf CD4⁺ T-Zellen wirken, sondern auch sinusoidale Endothelzellen aktivieren können. Eine Aktivierung der sinusoidalen Endothelzellen mit entsprechender Alteration der Expression von Adhäsionsmolekülen, wie z.B. ICAM-1, VCAM-1 und VAP-1 stellt wiederum einen pathophysiologischen Mechanismus dar, der mit einer konsekutiven Verstärkung der Akkumulation von CD4⁺ T-Zellen nach I/R verbunden ist.

Zusammenfassend weisen diese *in vivo* Daten darauf hin, dass hepatische I/R die Akkumulation und Emigration von CD4⁺ T-Zellen, jedoch nicht von CD8⁺ T-Zellen induziert. Adhärenente CD4⁺ T-Zellen sind in Sinusoiden mit Thrombozyten kolokalisiert; dies lässt eine gegenseitige Aktivierung beider Zelltypen durch direkten Zellkontakt oder über die Aktivierung des Endothels vermuten. Eine CD4 T-Zell-Defizienz geht mit einer Verminderung der postischämischen Thrombozytenakkumulation und mit einer Reduktion des mikrovaskulären I/R-Schadens einher. Die postischämische Rekrutierung von CD4⁺ T-Zellen in hepatischen Mikrogefäßen wird durch Kupffer-Zellen, wahrscheinlich über die Freisetzung von Sauerstoffradikalen, TNF- α und IL-6, vermittelt.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Anselmo DM, Amersi FF, Shen XD, Gao F, Katori M, Lassman C, Ke B, Coito AJ, Ma J, Brinkmann V, Busuttill RW, Kupiec-Weglinski JW, Farmer DG. FTY720 pretreatment reduces warm hepatic ischemia reperfusion injury through inhibition of T-lymphocyte infiltration. *Am J Transplant* 2002;2(9):843-9.
- (2) Aukrust P, Muller F, Ueland T, Berget T, Aaser E, Brunsvig A, Solum NO, Forfang K, Froland SS, Gullestad L. Enhanced levels of soluble and membrane-bound CD40 ligand in patients with unstable angina. Possible reflection of T lymphocyte and platelet involvement in the pathogenesis of acute coronary syndromes. *Circulation* 1999;100(6):614-20.
- (3) Bacon KB, Premack BA, Gardner P, Schall TJ. Activation of dual T cell signaling pathways by the chemokine RANTES. *Science* 1995;269(5231):1727-30.
- (4) Belzer FO, Southard JH. Principles of solid-organ preservation by cold storage. *Transplantation* 1988;45(4):673-6.
- (5) Biberthaler P, Luchting B, Massberg S, Teupser D, Langer S, Leiderer R, Krombach F, Messmer K. Ischemia at 4 degrees C: a novel mouse model to investigate the effect of hypothermia on postischemic hepatic microcirculatory injury. *Res Exp Med (Berl)* 2001;200(2):93-105.
- (6) Biberthaler P, Luchting B, Massberg S, Teupser D, Langer S, Leiderer R, Messmer K, Krombach F. The influence of organ temperature on hepatic ischemia-reperfusion injury: a systematic analysis. *Transplantation* 2001;72(9):1486-90.
- (7) Bilzer M, Baron A, Schauer R, Steib C, Ebensberger S, Gerbes AL. Glutathione treatment protects the rat liver against injury after warm ischemia and Kupffer cell activation. *Digestion* 2002;66(1):49-57.
- (8) Bilzer M, Gerbes AL. Preservation injury of the liver: mechanisms and novel therapeutic strategies. *J Hepatol* 2000;32(3):508-15.
- (9) Brown MF, Zibari G, Burney D, Granger DN, McDonald JC. Hepatic ischemia/reperfusion affects leukocyte rolling and velocity. *Clin Transplant* 1997;11(5 Pt 2):511-5.
- (10) Bugeon L, Dallman MJ. Costimulation of T cells. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162(4 Pt 2):S164-S168.
- (11) Caglayan F, Caglayan O, Gunel E, Elcuman Y, Cakmak M. Intestinal ischemia-reperfusion and plasma enzyme levels. *Pediatr Surg Int* 2002;18(4):255-7.
- (12) Caldwell CC, Okaya T, Martignoni A, Husted T, Schuster R, Lentsch AB. Divergent functions of CD4+ T Lymphocytes in Acute Liver Inflammation and Injury after Ischemia/Reperfusion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005;289(5):G969-76

- (13) Caldwell CC, Tschoep J, Lentsch AB. Lymphocyte function during hepatic ischemia/reperfusion injury. *J Leukoc Biol* 2007;82(3):457-64.
- (14) Caldwell-Kenkel JC, Currin RT, Tanaka Y, Thurman RG, Lemasters JJ. Kupffer cell activation and endothelial cell damage after storage of rat livers: effects of reperfusion. *Hepatology* 1991;13(1):83-95.
- (15) Callery MP, Kamei T, Flye MW. Kupffer cell blockade increases mortality during intra-abdominal sepsis despite improving systemic immunity. *Arch Surg* 1990;125(1):36-40.
- (16) Chaib E, Saad WA, Fujimura I, Saad WA, Jr., Gama-Rodrigues J. The main indications and techniques for vascular exclusion of the liver. *Arq Gastroenterol* 2003;40(2):131-6.
- (17) Chappell D, Beiras-Fernandez A, Hammer C, Thein E. In vivo visualization of the effect of polyclonal antithymocyte globulins on the microcirculation after ischemia/reperfusion in a primate model. *Transplantation* 2006;81(4):552-8.
- (18) Cinamon G, Grabovsky V, Winter E, Franitza S, Feigelson S, Shamri R, Dwir O, Alon R. Novel chemokine functions in lymphocyte migration through vascular endothelium under shear flow. *J Leukoc Biol* 2001;69(6):860-6.
- (19) Clary JJ, Groth DH, Stokinger HE. Comparative changes in serum enzyme levels in beryllium- or carbon tetrachloride-induced liver necrosis. *Proc Soc Exp Biol Med* 1973;143(4):1207-10.
- (20) Clavien PA, Harvey PR, Sanabria JR, Cywes R, Levy GA, Strasberg SM. Lymphocyte adherence in the reperfused rat liver: mechanisms and effects. *Hepatology* 1993;17(1):131-42.
- (21) Clavien PA, Morgan GR, Sanabria JR, Petrunka C, Levy GA, Robert P, Harvey C, Strasberg SM. Effect of cold preservation on lymphocyte adherence in the perfused rat liver. *Transplantation* 1991;52(3):412-7.
- (22) Clemens MG, Bauer M, Pannen BH, Bauer I, Zhang JX. Remodeling of hepatic microvascular responsiveness after ischemia/reperfusion. *Shock* 1997;8(2):80-5.
- (23) Colletti LM, Remick DG, Burtch GD, Kunkel SL, Strieter RM, Campbell DA, Jr. Role of tumor necrosis factor-alpha in the pathophysiologic alterations after hepatic ischemia/reperfusion injury in the rat. *J Clin Invest* 1990;85(6):1936-43.
- (24) Crockett ET, Spielman W, Dowlatshahi S, He J. Sex differences in inflammatory cytokine production in hepatic ischemia-reperfusion. *J Inflamm (Lond)* 2006;3:16.
- (25) Cywes R, Mullen JB, Stratis MA, Greig PD, Levy GA, Harvey PR, Strasberg SM. Prediction of the outcome of transplantation in man by platelet adherence in donor liver allografts. Evidence of the importance of prepreservation injury. *Transplantation* 1993;56(2):316-23.
- (26) Cywes R, Packham MA, Tietze L, Sanabria JR, Harvey PR, Phillips MJ, Strasberg SM. Role of platelets in hepatic allograft preservation injury in the rat. *Hepatology* 1993;18(3):635-47.

- (27) Danese S, de la MC, Reyes BM, Sans M, Levine AD, Fiocchi C. Cutting edge: T cells trigger CD40-dependent platelet activation and granular RANTES release: a novel pathway for immune response amplification. *J Immunol* 2004;172(4):2011-5.
- (28) Decker K. Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells). *Eur J Biochem* 1990;192(2):245-61.
- (29) Delves PJ, Roitt IM. The immune system. First of two parts. *N Engl J Med* 2000;343(1):37-49.
- (30) Delves PJ, Roitt IM. The immune system. Second of two parts. *N Engl J Med* 2000;343(2):108-17.
- (31) Deuel TF, Senior RM, Chang D, Griffin GL, Henrikson RL, Kaiser ET. Platelet factor 4 is chemotactic for neutrophils and monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981;78(7):4584-7.
- (32) Dollinger MM, Howie SE, Plevris JN, Graham AM, Hayes PC, Harrison DJ. Intrahepatic proliferation of 'naive' and 'memory' T cells during liver allograft rejection: primary immune response within the allograft. *FASEB J* 1998;12(11):939-47.
- (33) Edwards S, Lalor PF, Nash GB, Rainger GE, Adams DH. Lymphocyte traffic through sinusoidal endothelial cells is regulated by hepatocytes. *Hepatology* 2005;41(3):451-9.
- (34) Essani NA, Fisher MA, Simmons CA, Hoover JL, Farhood A, Jaeschke H. Increased P-selectin gene expression in the liver vasculature and its role in the pathophysiology of neutrophil-induced liver injury in murine endotoxin shock. *J Leukoc Biol* 1998;63(3):288-96.
- (35) Evans DE, Munks MW, Purkerson JM, Parker DC. Resting B lymphocytes as APC for naive T lymphocytes: dependence on CD40 ligand/CD40. *J Immunol* 2000;164(2):688-97.
- (36) Fondevila C, Busuttill RW, Kupiec-Weglinski JW. Hepatic ischemia/reperfusion injury--a fresh look. *Exp Mol Pathol* 2003;74(2):86-93.
- (37) Frauwirth KA, Thompson CB. Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation. *J Clin Invest* 2002;109(3):295-9.
- (38) Gantner F, Leist M, Kusters S, Vogt K, Volk HD, Tiegs G. T cell stimulus-induced crosstalk between lymphocytes and liver macrophages results in augmented cytokine release. *Exp Cell Res* 1996;229(1):137-46.
- (39) Goddard S, Adams DH. New approaches to immunosuppression in liver transplantation. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17(2):116-26.
- (40) Gujral JS, Bucci TJ, Farhood A, Jaeschke H. Mechanism of cell death during warm hepatic ischemia-reperfusion in rats: apoptosis or necrosis? *Hepatology* 2001;33(2):397-405.

- (41) Hanschen M, Zahler S, Krombach F, Khandoga A. Reciprocal activation between CD4+ T cells and Kupffer cells during hepatic ischemia-reperfusion. *Transplantation* 2008;86(5):710-8.
- (42) Hardonk MJ, Dijkhuis FW, Hulstaert CE, Koudstaal J. Heterogeneity of rat liver and spleen macrophages in gadolinium chloride-induced elimination and repopulation. *J Leukoc Biol* 1992;52(3):296-302.
- (43) Hervig T, Volundardottir T, Bakken AM, Farstad M. Thrombin-induced serotonin release as an in vitro indicator of the functional integrity of stored platelets. *Clin Chem* 1990;36(1):28-31.
- (44) Heyer J, Kneitz B, Schuh K, Jankevics E, Siebelt F, Schimpl A, Serfling E. Inefficient termination of antigen responses in NF-ATp-deficient mice. *Immunobiology* 1997;198(1-3):162-9.
- (45) Hogg N, Laschinger M, Giles K, McDowall A. T-cell integrins: more than just sticking points. *J Cell Sci* 2003;116(Pt 23):4695-705.
- (46) Horie Y, Wolf R, Granger DN. Role of nitric oxide in gut ischemia-reperfusion-induced hepatic microvascular dysfunction. *Am J Physiol* 1997;273(5 Pt 1):G1007-G1013.
- (47) Huss R, Beckham C, Storb R, Deeg HJ. Major histocompatibility complex class II expression is required for posttransplant immunological but not hemopoietic reconstitution in mice. *Transplantation* 1994;58(12):1366-71.
- (48) Inwald DP, McDowall A, Peters MJ, Callard RE, Klein NJ. CD40 is constitutively expressed on platelets and provides a novel mechanism for platelet activation. *Circ Res* 2003;92(9):1041-8.
- (49) Jaeschke H. Mechanisms of reperfusion injury after warm ischemia of the liver. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 1998;5(4):402-8.
- (50) Jaeschke H. Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;284(1):G15-G26.
- (51) Jaeschke H, Farhood A. Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Am J Physiol* 1991;260(3 Pt 1):G355-G362.
- (52) Jaeschke H, Farhood A, Smith CW. Neutrophils contribute to ischemia/reperfusion injury in rat liver in vivo. *FASEB J* 1990;4(15):3355-9.
- (53) Jones EA, Summerfield JA. Kupffer Cells. In: Arias IM, Jakoby WB, Popper H, Schachter D, Shafritz DA, eds. *The Liver: Biology and Pathobiology, Second Edition*. New York: Raven Press, Ltd.; 1988. p. 683-704.
- (54) Jones SA, Richards PJ, Scheller J, Rose-John S. IL-6 transsignaling: the in vivo consequences. *J Interferon Cytokine Res* 2005;25(5):241-53.
- (55) Kawano K, Bowers JL, Clouse ME. Protective effect of FK 506 on hepatic injury following cold ischemic preservation and transplantation: influence on hepatic microcirculation. *Transplant Proc* 1995;27(1):362-3.

- (56) Keller SA, Paxian M, Lee SM, Clemens MG, Huynh T. Kupffer cell ablation attenuates cyclooxygenase-2 expression after trauma and sepsis. *J Surg Res* 2005;124(1):126-33.
- (57) Khandoga A, Biberthaler P, Enders G, Axmann S, Hutter J, Messmer K, Krombach F. Platelet adhesion mediated by fibrinogen-intercellular adhesion molecule-1 binding induces tissue injury in the postischemic liver in vivo. *Transplantation* 2002;74(5):681-8.
- (58) Khandoga A, Biberthaler P, Enders G, Teupser D, Axmann S, Luchting B, Hutter J, Messmer K, Krombach F. P-selectin mediates platelet-endothelial cell interactions and reperfusion injury in the mouse liver in vivo. *Shock* 2002;18(6):529-35.
- (59) Khandoga A, Biberthaler P, Messmer K, Krombach F. Platelet-endothelial cell interactions during hepatic ischemia-reperfusion in vivo: a systematic analysis. *Microvasc Res* 2003;65(2):71-7.
- (60) Khandoga A, Enders G, Luchting B, Axmann S, Minor T, Nilsson U, Biberthaler P, Krombach F. Impact of intraischemic temperature on oxidative stress during hepatic reperfusion. *Free Radic Biol Med* 2003;35(8):901-9.
- (61) Khandoga A, Hanschen M, Kessler JS, Krombach F. CD4(+) T cells contribute to postischemic liver injury in mice by interacting with sinusoidal endothelium and platelets. *Hepatology* 2006;43(2):306-15.
- (62) Khandoga A, Kessler JS, Meissner H, Hanschen M, Corada M, Motoike T, Enders G, Dejana E, Krombach F. Junctional adhesion molecule-A deficiency increases hepatic ischemia-reperfusion injury despite reduction of neutrophil transendothelial migration. *Blood* 2005;106(2):725-33.
- (63) Klugewitz K, Topp SA, Dahmen U, Kaiser T, Sommer S, Kury E, Hamann A. Differentiation-dependent and subset-specific recruitment of T-helper cells into murine liver. *Hepatology* 2002;35(3):568-78.
- (64) Knolle PA, Gerken G, Loser E, Dienes HP, Gantner F, Tiegs G, Meyer zum Buschenfelde KH, Lohse AW. Role of sinusoidal endothelial cells of the liver in concanavalin A-induced hepatic injury in mice. *Hepatology* 1996;24(4):824-9.
- (65) Knolle PA, Schmitt E, Jin S, Germann T, Duchmann R, Hegenbarth S, Gerken G, Lohse AW. Induction of cytokine production in naive CD4(+) T cells by antigen-presenting murine liver sinusoidal endothelial cells but failure to induce differentiation toward Th1 cells. *Gastroenterology* 1999;116(6):1428-40.
- (66) Kokura S, Wolf RE, Yoshikawa T, Granger DN, Aw TY. T-lymphocyte-derived tumor necrosis factor exacerbates anoxia-reoxygenation-induced neutrophil-endothelial cell adhesion. *Circ Res* 2000;86(2):205-13.
- (67) Kondo T, Okamoto S, Todoroki T, Hirano T, Schildberg FW, Messmer K. Application of a novel method for subsequent evaluation of sinusoids and postsinusoidal venules after ischemia-reperfusion injury of rat liver. *Eur Surg Res* 1998;30(4):252-8.

- (68) Kotowicz K, Dixon GL, Klein NJ, Peters MJ, Callard RE. Biological function of CD40 on human endothelial cells: costimulation with CD40 ligand and interleukin-4 selectively induces expression of vascular cell adhesion molecule-1 and P-selectin resulting in preferential adhesion of lymphocytes. *Immunology* 2000;100(4):441-8.
- (69) Kroczek RA, Mages HW, Hutloff A. Emerging paradigms of T-cell co-stimulation. *Curr Opin Immunol* 2004;16(3):321-7.
- (70) Kubes P, Payne D, Woodman RC. Molecular mechanisms of leukocyte recruitment in postischemic liver microcirculation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;283(1):G139-G147.
- (71) Kupiec-Weglinski JW, Busuttill RW. Ischemia and reperfusion injury in liver transplantation. *Transplant Proc* 2005;37(4):1653-6.
- (72) Lalor PF, Edwards S, McNab G, Salmi M, Jalkanen S, Adams DH. Vascular adhesion protein-1 mediates adhesion and transmigration of lymphocytes on human hepatic endothelial cells. *J Immunol* 2002;169(2):983-92.
- (73) Lalor PF, Shields P, Grant A, Adams DH. Recruitment of lymphocytes to the human liver. *Immunol Cell Biol* 2002;80(1):52-64.
- (74) Le Moine O, Louis H, Demols A, Desalle F, Demoor F, Quertinmont E, Goldman M, Deviere J. Cold liver ischemia-reperfusion injury critically depends on liver T cells and is improved by donor pretreatment with interleukin 10 in mice. *Hepatology* 2000;31(6):1266-74.
- (75) Leverkus M, McLellan AD, Heldmann M, Eggert AO, Brocker EB, Koch N, Kampgen E. MHC class II-mediated apoptosis in dendritic cells: a role for membrane-associated and mitochondrial signaling pathways. *Int Immunol* 2003;15(8):993-1006.
- (76) Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 2007;7(9):678-89.
- (77) Lindenblatt N, Platz U, Hameister J, Klar E, Menger MD, Vollmar B. Distinct effects of acute and chronic nicotine application on microvascular thrombus formation and endothelial function in male and female mice. *Langenbecks Arch Surg* 2007;392(3):285-95.
- (78) Lohse AW, Knolle PA, Bilo K, Uhrig A, Waldmann C, Ibe M, Schmitt E, Gerken G, Meyer zum Buschenfelde KH. Antigen-presenting function and B7 expression of murine sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells. *Gastroenterology* 1996;110(4):1175-81.
- (79) MacPhee PJ, Schmidt EE, Groom AC. Intermittence of blood flow in liver sinusoids, studied by high-resolution in vivo microscopy. *Am J Physiol* 1995;269(5 Pt 1):G692-G698.
- (80) Marzi I, Cowper K, Takei Y, Lindert K, Lemasters JJ, Thurman RG. Methyl palmitate prevents Kupffer cell activation and improves survival after orthotopic liver transplantation in the rat. *Transpl Int* 1991;4(4):215-20.

- (81) Massberg S, Enders G, Leiderer R, Eisenmenger S, Vestweber D, Krombach F, Messmer K. Platelet-endothelial cell interactions during ischemia/reperfusion: the role of P-selectin. *Blood* 1998;92(2):507-15.
- (82) Massberg S, Gawaz M, Gruner S, Schulte V, Konrad I, Zohlhofer D, Heinzmann U, Nieswandt B. A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo. *J Exp Med* 2003;197(1):41-9.
- (83) Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* 1994;12:991-1045.:991-1045.
- (84) Menger MD, Marzi I, Messmer K. In vivo fluorescence microscopy for quantitative analysis of the hepatic microcirculation in hamsters and rats. *Eur Surg Res* 1991;23(3-4):158-69.
- (85) Menger MD, Richter S, Yamauchi J, Vollmar B. Role of microcirculation in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepatology* 1999;46 Suppl 2:1452-7.
- (86) Menger MD, Steiner D, Messmer K. Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of "no reflow". *Am J Physiol* 1992;263(6 Pt 2):H1892-H1900.
- (87) Messmer K, Krombach F. [Microcirculation research in experimental surgery]. *Chirurg* 1998;69(4):333-8.
- (88) Miltenyi S, Muller W, Weichel W, Radbruch A. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* 1990;11(2):231-8.
- (89) Nolte D, Zeintl H, Steinbauer M, Pickelmann S, Messmer K. Functional capillary density: an indicator of tissue perfusion? *Int J Microcirc Clin Exp* 1995;15(5):244-9.
- (90) O'Neill PJ, Ayala A, Wang P, Ba ZF, Morrison MH, Schultze AE, Reich SS, Chaudry IH. Role of Kupffer cells in interleukin-6 release following trauma-hemorrhage and resuscitation. *Shock* 1994;1(1):43-7.
- (91) Oberhammer FA, Pavelka M, Sharma S, Tiefenbacher R, Purchio AF, Bursch W, Schulte-Hermann R. Induction of apoptosis in cultured hepatocytes and in regressing liver by transforming growth factor beta 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89(12):5408-12.
- (92) Parra E, Wingren AG, Hedlund G, Kalland T, Dohlsten M. The role of B7-1 and LFA-3 in costimulation of CD8+ T cells. *J Immunol* 1997;158(2):637-42.
- (93) Pendino KJ, Meidhof TM, Heck DE, Laskin JD, Laskin DL. Inhibition of macrophages with gadolinium chloride abrogates ozone-induced pulmonary injury and inflammatory mediator production. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995;13(2):125-32.
- (94) Perry I, Neuberger J. Immunosuppression: towards a logical approach in liver transplantation. *Clin Exp Immunol* 2005;139(1):2-10.
- (95) Pflueger E, Mueller EA, Anderer FA. Preservation of cytotoxic function during multi-cycle immunomagnetic cell separations of human NK cells using a new type of magnetic bead. *J Immunol Methods* 1990;129(2):165-73.

- (96) Piccardoni P, Evangelista V, Piccoli A, de GG, Walz A, Cerletti C. Thrombin-activated human platelets release two NAP-2 variants that stimulate polymorphonuclear leukocytes. *Thromb Haemost* 1996;76(5):780-5.
- (97) Prasad KS, Andre P, He M, Bao M, Manganello J, Phillips DR. Soluble CD40 ligand induces beta3 integrin tyrosine phosphorylation and triggers platelet activation by outside-in signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(21):12367-71.
- (98) Preissler G, Massberg S, Waldner H, Messmer K. Intermittent capillary perfusion in rat pancreas grafts following short- and long-term preservation in University of Wisconsin solution. *Transpl Int* 2006;19(4):325-32.
- (99) Pringle JH. Notes on the arrest of hepatic hemorrhage due to trauma. *Ann.Surg.* 48, 541-549. 1908.
- (100) Rahemtulla A, Fung-Leung WP, Schilham MW, Kundig TM, Sambhara SR, Narendran A, Arabian A, Wakeham A, Paige CJ, Zinkernagel RM, . Normal development and function of CD8+ cells but markedly decreased helper cell activity in mice lacking CD4. *Nature* 1991;353(6340):180-4.
- (101) Reding R, Gras J, Truong DQ, Wieers G, Latinne D. The immunological monitoring of alloreactive responses in liver transplant recipients: a review. *Liver Transpl* 2006;12(3):373-83.
- (102) Riley JL, June CH. The CD28 family: a T-cell rheostat for therapeutic control of T-cell activation. *Blood* 2005;105(1):13-21.
- (103) Riley JL, Mao M, Kobayashi S, Biery M, Burchard J, Cavet G, Gregson BP, June CH, Linsley PS. Modulation of TCR-induced transcriptional profiles by ligation of CD28, ICOS, and CTLA-4 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(18):11790-5.
- (104) Ruttinger D, Vollmar B, Wanner GA, Messmer K. In vivo assessment of hepatic alterations following gadolinium chloride-induced Kupffer cell blockade. *J Hepatol* 1996;25(6):960-7.
- (105) Saetzler RK, Jallo J, Lehr HA, Philips CM, Vasthare U, Arfors KE, Tuma RF. Intravital fluorescence microscopy: impact of light-induced phototoxicity on adhesion of fluorescently labeled leukocytes. *J Histochem Cytochem* 1997;45(4):505-13.
- (106) Samson CM, Schrum LW, Bird MA, Lange PA, Brenner DA, Rippe RA, Behrns KE. Transforming growth factor-beta1 induces hepatocyte apoptosis by a c-Jun independent mechanism. *Surgery* 2002;132(3):441-9.
- (107) Saxton NE, Barclay JL, Clouston AD, Fawcett J. Cyclosporin A pretreatment in a rat model of warm ischaemia/reperfusion injury. *J Hepatol* 2002;36(2):241-7.
- (108) Schonbeck U, Libby P. The CD40/CD154 receptor/ligand dyad. *Cell Mol Life Sci* 2001;58(1):4-43.
- (109) Schumann J, Wolf D, Pahl A, Brune K, Papadopoulos T, van RN, Tiegs G. Importance of Kupffer cells for T-cell-dependent liver injury in mice. *Am J Pathol* 2000;157(5):1671-83.

- (110) Schwabe RF, Bataller R, Brenner DA. Human hepatic stellate cells express CCR5 and RANTES to induce proliferation and migration. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;285(5):G949-G958.
- (111) Schwabe RF, Schnabl B, Kweon YO, Brenner DA. CD40 activates NF-kappa B and c-Jun N-terminal kinase and enhances chemokine secretion on activated human hepatic stellate cells. *J Immunol* 2001;166(11):6812-9.
- (112) Shao T, Cai W, Yang W, Zhang M, Chen H, Di Z, Zhou G, Li H. Whether the impairment of grafted liver was induced by the inflammatory cells in cold and warm ischemia after transplantation. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2002;10(6):455-8.
- (113) Shapiro HM. Practical flow cytometry. 2. ed. 1988. New York, Alan R. Liss.
- (114) Shen XD, Ke B, Zhai Y, Amersi F, Gao F, Anselmo DM, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. CD154-CD40 T-cell costimulation pathway is required in the mechanism of hepatic ischemia/reperfusion injury, and its blockade facilitates and depends on heme oxygenase-1 mediated cytoprotection. *Transplantation* 2002;74(3):315-9.
- (115) Shen XD, Ke B, Zhai Y, Gao F, Anselmo D, Lassman CR, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. Stat4 and Stat6 signaling in hepatic ischemia/reperfusion injury in mice: HO-1 dependence of Stat4 disruption-mediated cytoprotection. *Hepatology* 2003;37(2):296-303.
- (116) Shen XD, Ke B, Zhai Y, Gao F, Tsuchihashi S, Lassman CR, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. Absence of toll-like receptor 4 (TLR4) signaling in the donor organ reduces ischemia and reperfusion injury in a murine liver transplantation model. *Liver Transpl* 2007;13(10):1435-43.
- (117) Shigematsu T, Wolf RE, Granger DN. T-lymphocytes modulate the microvascular and inflammatory responses to intestinal ischemia-reperfusion. *Microcirculation* 2002;9(2):99-109.
- (118) Sindram D, Porte RJ, Hoffman MR, Bentley RC, Clavien PA. Platelets induce sinusoidal endothelial cell apoptosis upon reperfusion of the cold ischemic rat liver. *Gastroenterology* 2000;118(1):183-91.
- (119) Srivastava AR, Kumar S, Agarwal GG, Ranjan P. Blunt abdominal injury: serum ALT-A marker of liver injury and a guide to assessment of its severity. *Injury* 2007;38(9):1069-74.
- (120) St Croix CM, Leelavanichkul K, Watkins SC. Intravital fluorescence microscopy in pulmonary research. *Adv Drug Deliv Rev* 2006;58(7):834-40.
- (121) Steinbauer M, Harris AG, Abels C, Messmer K. Characterization and prevention of phototoxic effects in intravital fluorescence microscopy in the hamster dorsal skinfold model. *Langenbecks Arch Surg* 2000;385(4):290-8.
- (122) Stenberg PE, McEver RP, Shuman MA, Jacques YV, Bainton DF. A platelet alpha-granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation. *J Cell Biol* 1985;101(3):880-6.

- (123) Suzuki S, Toledo-Pereyra LH. Interleukin 1 and tumor necrosis factor production as the initial stimulants of liver ischemia and reperfusion injury. *J Surg Res* 1994;57(2):253-8.
- (124) Takada M, Chandraker A, Nadeau KC, Sayegh MH, Tilney NL. The role of the B7 costimulatory pathway in experimental cold ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest* 1997;100(5):1199-203.
- (125) Teoh NC, Farrell GC. Hepatic ischemia reperfusion injury: Pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection. *J Gastroenterol Hepatol* 2003;18(8):891-902.
- (126) Vollmar B, Glasz J, Menger MD, Messmer K. Leukocytes contribute to hepatic ischemia/reperfusion injury via intercellular adhesion molecule-1-mediated venular adherence. *Surgery* 1995;117(2):195-200.
- (127) Vollmar B, Glasz J, Post S, Menger MD. Depressed phagocytic activity of Kupffer cells after warm ischemia-reperfusion of the liver. *J Hepatol* 1994;20(2):301-4.
- (128) Vollmar B, Menger MD, Glasz J, Leiderer R, Messmer K. Impact of leukocyte-endothelial cell interaction in hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol* 1994;267(5 Pt 1):G786-G793.
- (129) Vollmar B, Richter S, Menger MD. Leukocyte stasis in hepatic sinusoids. *Am J Physiol* 1996;270(5 Pt 1):G798-G803.
- (130) Vollmar B, Ruttinger D, Wanner GA, Leiderer R, Menger MD. Modulation of kupffer cell activity by gadolinium chloride in endotoxemic rats. *Shock* 1996;6(6):434-41.
- (131) Wagner DD, Burger PC. Platelets in inflammation and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23(12):2131-7.
- (132) Wanner GA, Ertel W, Muller P, Hofer Y, Leiderer R, Menger MD, Messmer K. Liver ischemia and reperfusion induces a systemic inflammatory response through Kupffer cell activation. *Shock* 1996;5(1):34-40.
- (133) Weyrich AS, Elstad MR, McEver RP, McIntyre TM, Moore KL, Morrissey JH, Prescott SM, Zimmerman GA. Activated platelets signal chemokine synthesis by human monocytes. *J Clin Invest* 1996;97(6):1525-34.
- (134) Wu AH. Cardiac markers: from enzymes to proteins, diagnosis to prognosis, laboratory to bedside. *Ann Clin Lab Sci* 1999;29(1):18-23.
- (135) Yadav SS, Howell DN, Steeber DA, Harland RC, Tedder TF, Clavien PA. P-Selectin mediates reperfusion injury through neutrophil and platelet sequestration in the warm ischemic mouse liver. *Hepatology* 1999;29(5):1494-502.
- (136) Yao Z, Painter SL, Fanslow WC, Ulrich D, Macduff BM, Spriggs MK, Armitage RJ. Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells. *J Immunol* 1995;155(12):5483-6.
- (137) Zeintl H, Sack FU, Intaglietta M, Messmer K. Computer assisted leukocyte adhesion measurement in intravital microscopy. *Int J Microcirc Clin Exp* 1989;8(3):293-302.

- (138) Zhai Y, Shen XD, Hancock WW, Gao F, Qiao B, Lassman C, Belperio JA, Strieter RM, Busuttill RW, Kupiec-Weglinski JW. CXCR3+CD4+ T cells mediate innate immune function in the pathophysiology of liver ischemia/reperfusion injury. *J Immunol* 2006;176(10):6313-22.
- (139) Zwacka RM, Zhang Y, Halldorson J, Schlossberg H, Dudus L, Engelhardt JF. CD4(+) T-lymphocytes mediate ischemia/reperfusion-induced inflammatory responses in mouse liver. *J Clin Invest* 1997;100(2):279-89.

8. DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. med. Alexander Baethmann, ehemaligem kommissarischem Direktor des Institutes für Chirurgische Forschung, danke ich für die Aufnahme in das Institut. Dies ermöglichte mir das Erlernen und Durchführen von Forschungsarbeiten in einer hochmotivierten und professionellen Umgebung. Die vielen nationalen und internationalen Kontakte des Institutes für Chirurgische Forschung stellten darüber hinaus einen Garant für einen effektiven Wissensaustausch während meiner Forschungszeit dar. Besonderer Dank gilt auch seinem Nachfolger, Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Pohl. Die im Zuge der Nachfolge stattgefundenene Fusion des Lehrstuhles der Vegetativen Physiologie und des Institutes für Chirurgische Forschung zum Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin mit den neu entstandenen Schnittstellen zum Austausch und Wissenstransfer förderte nachhaltig das wissenschaftliche Arbeitsklima und bettet junge Nachwuchswissenschaftler in ein Netzwerk voller Möglichkeiten.

Herrn Prof. Dr. med. vet. Dr. med. habil. Fritz Krombach danke ich für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe „Entzündungsforschung“. Die Politik der offenen Bürotür erlaubte es mir, viele Stationen der experimentellen Studien intensiv zeitnah und direkt zu diskutieren. Nicht nur Fragen zur Durchführung und Planung von Versuchen, sondern auch wissenschaftliche Basics konnten stets unprätentiös mit einer außerordentlichen Fachkenntnis kritisch und sachlich diskutiert werden. Besonderer Dank gilt der Vermittlung der Feinheiten des wissenschaftlichen Arbeitens, von der Idee über die Implementierung bis hin zur Präsentation von Studienergebnissen auf nationalem und internationalem Parkett.

Herr Dr. med. Andrej Khandoga avancierte als Betreuer dieser Arbeit von einem fachkundigen Lehrer zum Mentor während meiner Studienzeit. Mit Hingabe und Geduld wies er mich in die Grundlagen des experimentellen Modells ein, lehrte mich das wissenschaftliche

Arbeiten, korrigierte differenziert Abstracts und Manuskripte sowie unterstützte mich mit Geduld bei der Erstellung von Kongressbeiträgen. Seine Kompetenz und Kreativität sowie das Hohe Maß an Begeisterung an der Forschung waren für mich eine Inspiration und unerschöpfliche Motivationsquelle während der Durchführung dieser Studie.

Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Siess bin ich für die Aufnahme in das Graduiertenkolleg 438 „Vaskuläre Biologie in der Medizin“ der Deutschen Forschungsgemeinschaft dankbar. Die Interaktion mit den Kollegiaten während regelmäßiger Seminare sowie die Diskussion mit unzähligen Gastrednern im Rahmen dieser waren eine wertvolle Ressource des Neuerwerbs von Kenntnissen und Anregungen.

Den medizinisch-technischen Assistentinnen Frau Christine Csapo, Frau Silvia Münzing sowie Frau Alke Schropp bin ich wegen tatkräftiger Unterstützung zu Dank verpflichtet. Den vielen Kolleginnen und Kollegen des Institutes, die für fruchtbare Diskussionen immer zur Verfügung standen sowie deren Zusammenhalt den Teamgeist im Institut für Chirurgische Forschung ausmachte, möchte ich an dieser Stelle ebenso danken.

Meinen Eltern, die mir das Studium der Humanmedizin in München ermöglicht haben sowie mir in allen Lebenslagen stärkend zur Seite standen, gilt ebenso wie meinem immer hilfsbereit zur Seite stehendem Bruder ganz besonderer Dank.

Die vorliegende Arbeit wurde unterstützt durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG-FOR 440/2 sowie DFG-GRK 438).

9. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ALT	Alanin-Amino-Transferase
AST	Aspartat-Amino-Transferase
CAMAS	<i>Computer assisted microcirculation analysis system</i>
CCD	<i>Charge-coupled device</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CFDA-SE	Carboxyfluoreszein-Diazetat-Succinimidyl-Ester
CXCL	CXC chemokine ligand
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FiO ₂	O ₂ -Fraktion der Einatemluft
FITC	Fluoreszeinisothicyanat
FSC	<i>Forward light scatter</i>
G-CSF	<i>Granulocyte colony-stimulating factor</i>
GdCl ₃	Gadolinium-Chlorid
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
GSH	Glutathion
HPF	<i>High power field</i>
i.a.	intraarteriell
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule-1</i>
IFN-gamma	Interferon-gamma
IL-6	Interleukin-6
I/R	Ischämie / Reperfusion
i.v.	intravenös
MACS	<i>Magnetic associated cell sorting</i>
MAP	Mittlerer arterieller Blutdruck
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PECAM-1	<i>Platelet endothelial cell adhesion molecule - 1</i>
PSGL-1	P-Selektin-Glykoprotein-Ligand-1
RANTES	<i>Regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted</i>
SEM	<i>Standard error of the mean</i>

Sham	sham-operierte Kontrollgruppe
SSC	<i>Side light scatter</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TOR	<i>target of rapamycin</i>
VAP-1	<i>vascular adhesion protein-1</i>
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule-1</i>
WT	Wildtyp

10. CURRICULUM VITAE

Persönliche Daten

Name	Marc Patrick Hanschen
Geburtsdatum	26.12.1980
Geburtsort	Delmenhorst
Familienstand	ledig
Eltern	Ewa Violetta Hanschen, Dipl.-Ing., Architektin Walter Hanschen, Bankdirektor (†2005)
Geschwister	Ralf Hanschen, Dipl.-Oec., Angestellter

Schulausbildung

1987-1997	Besuch der Schule St.-Johann in Bremen
1997-1998	Besuch der Highschool Roy C. Ketcham, NY, USA
Juni 2000	Schulabschluss am Gymnasium in Bremen

Zivildienst

2000-2001	Ausbildung zum Rettungshelfer in Bremen
-----------	---

Studium

April 2001 – Juni 2007	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München Auslandsaufenthalte im Rahmen des Praktischen Jahres: Oxford University, GB University of Wisconsin, USA
Seit Juni 2003	Doktorand am Institut für Chirurgische Forschung in der Arbeitsgruppe „Entzündungsforschung“ bei Prof. Dr. med. vet. Dr. med. habil. F. Krombach
Jan. 2005 - Febr. 2006	Stipendiat im Rahmen des Graduiertenkollegs „Vaskuläre Biologie in der Medizin“ (DFG-GRK438)
20. Juni 2007	Approbation als Arzt

Berufliche Tätigkeit

Seit Juli 2007	Assistenzarzt Chirurgische Klinik und Poliklinik Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität München, Prof. Dr. med. W. Mutschler
----------------	---

11. PUBLIKATIONEN

ORIGINALARBEITEN

Khandoga A, Kessler JS, Meissner H, **Hanschen M**, Corada M, Motoike T, Enders G, Dejana E, Krombach F. (2005) Junctional adhesion molecule – A deficiency increases hepatic ischemia-reperfusion injury despite reduction of neutrophil transendothelial migration. *Blood* 106(2): 725-33

Khandoga A, **Hanschen M**, Kessler JS, Krombach F. (2006) CD4⁺ T cells contribute to postischemic liver injury in mice by interacting with sinusoidal endothelium and platelets. *Hepatology* 43(2): 306-15

Khandoga A, Kessler JS, **Hanschen M**, Khandoga AG, Burggraf D, Reichel C, Hamann GF, Enders G, Krombach F. (2006) Matrix metalloproteinase-9 promotes neutrophil and T cell recruitment and migration in the postischemic liver. *J Leukoc Biol* 79(6): 1295-305

Hanschen M, Zahler S, Krombach F, Khandoga A. (2008) Reciprocal Activation Between CD4⁺ T Cells and Kupffer Cells During Hepatic Ischemia-Reperfusion. *Transplantation* 86(5): 710-8

BUCHBEITRÄGE

Khandoga A, **Hanschen M**, Krombach F. Rekrutierung von T-Zellen bei Ischämie-Reperfusion der Leber *in vivo*. In: Chirurgisches Forum 2004. Editor: Ulrich. Springer Verlag, Berlin – New York. Vol. 33, 295-296.

Hanschen M, Khandoga A, Kessler J, Krombach F. T-Zell-Rekrutierung und Interaktionen mit Thrombozyten bei hepatischer Ischämie-Reperfusion *in vivo*. In: Chirurgisches Forum 2005. Editor: Rothmund. Springer Verlag, Berlin – New York. Vol. 34, 297-298

Khandoga A, Kessler J, **Hanschen M**, Meissner H, Corada M, Sato T, Dejana E, Krombach F. JAM-A-Defizienz verstärkt den hepatischen Ischämie-Reperfusionsschaden trotz Verminderung der transendothelialen Migration von Leukozyten. In: Chirurgisches Forum 2005. Editor: Rothmund. Springer Verlag, Berlin – New York. Vol. 34, 295-296

Khandoga A, **Hanschen M**, Kessler J, Krombach F. Mechanismen der CD4⁺ T-Zell-Thrombozyten-Interaktion in der postischämischen Leber. In: Chirurgisches Forum 2006. Editor: Saeger. Springer Verlag, Berlin – New York. Vol 35, 281-282

Hanschen M, Krombach F, Khandoga A. Reziproke Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen und Kupffer-Zellen bei hepatischer Ischämie-Reperfusion. In: Chirurgisches Forum 2008. Editor: Arbogast. Springer Verlag, Berlin – New York. Vol 37, 225-226

ABSTRACTS

Khandoga A, **Hanschen M**, Krombach F. (2004) T-cell recruitment during ischemia-reperfusion of the liver in vivo. *Shock* 21 : 87

Khandoga A, **Hanschen M**, Krombach F. (2004) T-cell recruitment during ischemia/reperfusion induced hepatic inflammation in vivo. *Cardiovascular Pathology* 13 (Suppl. I) : 100

Khandoga A, **Hanschen M**, Krombach F. T cell-endothelial cell interactions in the postischemic hepatic microcirculation. (2004) In: Kongressband XII International Symposium on Cells of the Hepatic Sinusoids, Bilbao, Spain

Khandoga A, Kessler J, **Hanschen M**, Meissner H, Corada M, Sato T, Motoike T, Dejana E, Krombach F. (2004) Leukocyte transmigration in the postischemic liver: role of JAM-A and impact on tissue injury. *Journal of Vascular Research* 41 : 456

Hanschen M, Khandoga A, Kessler J, Krombach F. (2004) T cell recruitment and interaction with platelets during hepatic ischemia-reperfusion in vivo. *Journal of Vascular Research* 41 : 455

Khandoga A, Kessler J, **Hanschen M**, Meissner H, Corada M, Motoike T, Dejana E, Krombach F. (2005) Role of junctional adhesion molecule-A for leukocytes and tissue injury in the postischemic liver. *J Hepatol*, Vol 42, suppl. 2 p6.

Kessler J, Khandoga A, **Hanschen M**, Khandoga AG, Reichel C, Krombach F. (2005) Matrix Metalloproteinases 2 and 9 Are Required for Neutrophil and T Cell Migration during Hepatic Ischemia-Reperfusion *Journal of Vascular Research* 43 : 32

Hanschen M, Khandoga A, Kessler JS, Krombach F. (2005) CD4⁺ T Cells Aggravate Microvascular Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury by Interactions with Sinusoidal Endothelium and Platelets via CD40-CD40L- and CD28-B7-Dependent Pathways. *Journal of Vascular Research* 43 : 35

Khandoga A, **Hanschen M**, Kessler JS, Krombach F. (2005) CD4⁺ T Cells Interacting with Sinusoidal Endothelium and Platelets Aggravate Microvascular Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury via CD40-CD40L- and CD28-B7-dependent Pathways *Hepatology* 42(4) (Suppl. 1) : 217A

Hanschen M, Krombach F, Khandoga A. (2005) Interactions between Kupffer Cells and CD4⁺ T Cells during Hepatic Ischemia-Reperfusion in vivo *Hepatology* 42(4) (Suppl. 1) : 312A

Hanschen M, Krombach F, Khandoga A. (2006) Interaktionen zwischen CD4⁺ T-Zellen und Kupfferzellen bei Ischämie-Reperfusion der Leber *Transplantationsmedizin* 18 : 40